

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 230**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11161659 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2374874**

54 Título: **Polimerasas libres de detergente**

30 Prioridad:

12.04.2010 EP 10159673

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.02.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, ULRIKE;
GREIF, MICHAEL;
SOBEK, HARALD y
THALHOFER, JOHANN-PETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 528 230 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polimerasas libres de detergente

5 La presente invención se refiere al campo técnico de la preparación y aplicación de ADN polimerasas termoestables. De forma más precisa, la presente invención se refiere a proporciona un nuevo procedimiento para la producción y el uso de ADN polimerasas termoestables sin ninguna adición de detergente durante su producción, almacenamiento o durante la aplicación de la enzima.

10 Antecedentes de la invención

15 Las ADN polimerasas termoestables son enzimas que se han aislado y expresado de forma recombinante durante mucho tiempo desde el establecimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, como es el caso para otras reacciones enzimáticas, se sabe que también el rendimiento de la PCR está obstaculizado al menos en parte por la presencia de cantidades mínimas de varios reactivos diferentes, tales como detergentes. Por otra parte, se sabe que la presencia de detergentes es esencial para muchos protocolos de purificación de las polimerasas y para la estabilización a largo plazo de enzimas en general y de las ADN polimerasas en particular.

20 Lawyer, F.C. et al. (JBC 264 (1989) 6427-6434) divulgan por primera vez la clonación y la expresión recombinante de Taq ADN polimerasa. De forma similar, el documento US 5.127.155 divulga formulaciones de polimerasas que se estabilizan con detergentes iónicos que son particularmente útiles para aplicaciones de PCR. Los detergentes estabilizantes usados como detergentes son Triton X100, Tween 20 y Nonidet P-40.

25 Además, de acuerdo con las observaciones de los inventores del documento US 5.127.155, la presencia de detergentes dentro de las formulaciones divulgadas no se requiere sólo para mantener la estabilidad enzimática, sino también para potenciar la actividad de la polimerasa.

30 Se han divulgado procedimientos y formulaciones de purificación alternativos. Por ejemplo, el documento WO 08/077017 divulga formulaciones de polimerasas con detergentes e iónicos dipolares en lugar de detergentes no iónicos.

35 Lawyer et al. (PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor, p. 275-287 (1993)) proporcionan una mejora en los protocolos, en los que se reduce la presencia de detergentes durante la purificación de la enzima. Engelke, D.R. et al. (Anal. Biochem. 191 (1990) 396-400) divulgan formulaciones de Taq polimerasa recombinante sólo con cantidades mínimas de detergente, debido a que el tampón de almacenamiento añadido finalmente está libre de compuestos de detergente.

40 En vista de la técnica anterior expuesta, era un objetivo de la presente invención proporcionar una mejora en la formulación de polimerasas con un rendimiento optimizado en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40 Sumario de la invención

45 Por tanto, la presente invención se basa en una formulación de una ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes. Se puede obtener una formulación de este tipo, si el procedimiento de purificación seleccionado no requiere la adición de un detergente en ninguna etapa de purificación.

50 La presente invención se refiere al uso de las formulaciones de polimerasas como de divulga anteriormente. Dichas formulaciones son predominantemente ventajosas, cuando se usan para la amplificación de un ácido nucleico diana por medio de PCR en tiempo real, en la que se detecta el producto de amplificación por al menos un par de sondas de hibridación de FRET.

La presente invención se basa en un procedimiento para la preparación de ADN polimerasas termoestables, en el que todas las etapas de la preparación se ejecutan en ausencia de cualquier detergente.

55 Por ejemplo, un procedimiento de este tipo puede comprender las siguientes etapas:

- a) proporcionar un lisado complementado con inhibidores de proteasas,
- b) precipitación de sulfato de amonio
- c) una primera separación cromatográfica usando una primera matriz de cromatografía de afinidad
- 60 d) una segunda separación cromatográfica usando una segunda matriz de cromatografía de afinidad
- e) una tercera separación cromatográfica usando una matriz de hidroxipatita.

De forma alternativa, un procedimiento de este tipo puede requerir que la ADN polimerasa termoestable se exprese de forma recombinante en forma de una proteína de fusión que comprende una marca His. Entonces, la preparación comprende la etapa de purificar dicha proteína de fusión usando una columna de afinidad iónica cargada con níquel.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se origina a partir de la hipótesis teórica de que parte de la actividad enzimática de las cantidades mínimas de los detergentes podría afectar de algún modo al rendimiento de las ADN polimerasas termoestables bajo al menos algunas condiciones específicas. Como se mostrará en los ejemplos, en realidad se pudo probar que la hipótesis es cierta.

Formulaciones enzimáticas

Por lo tanto, la presente invención se basa en una formulación de una ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes. En el contexto de la presente invención, el término "formulación de una ADN polimerasa termoestable" se entiende como cualquier preparación de una ADN polimerasa termoestable purificada al menos parcialmente, que se ha aislado a partir de un lisado celular. El lisado se puede obtener a partir de organismos que contienen de forma natural dicha ADN polimerasa termoestable, o preferentemente de células huésped modificadas de forma recombinante, que expresan el gen que codifica dicha ADN polimerasa termoestable.

Las ADN polimerasas termoestables son enzimas termoestables que originalmente se han aislado y clonado a partir de bacterias termófilas. Estas enzimas catalizan la extensión del cebador dependiente del molde por medio de la creación de un enlace fosfodiéster entre el grupo OH 3' libre de dicho cebador y el resto alfa-fosfato de un desoxinucleótido, mientras que se genera de forma simultánea pirofosfato como producto secundario. Preferentemente, dicho molde es un molde de ADN. De forma alternativa, el molde puede ser ARN.

El ejemplo más destacado de una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable es la Taq ADN polimerasa que se origina de *Thermos aquaticus*. Posee dos actividades enzimáticas: una actividad 5'-3' polimerasa y una actividad 5'-3' exonucleasa específica bicatenaria, que proporciona la enzima con capacidad de desplazamiento de hebra.

Se pueden formular una gran variedad de ADN polimerasas termoestables de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la ADN polimerasa termoestable se selecciona de un grupo que consiste en *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfurococcus* sp. Tok., *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus* sp. (por ejemplo, *jannaschii*, *voltae*), *Methanothermus fervidus*., especies *Pyrococcus* (*furiosus*, especie GB-D, *woesii*, *abyssii*, *horikoshii*, KOD), *Pyrodictium abyssii*, *Pyrodictium occultum*, *Sulfolobus* sp. (por ejemplo, *acidocaldarius*, *solfataricus*), especies *Thermococcus* (*zilligii*, *barossii*, *fumicolans*, *gorgonarius*, JDF-3, *kodakaraensis* KOD1, *litoralis*, species 9 degrees North-7, species JDF-3, *gorgonarius*, TY), *Thermoplasma acidophilum*, *Thermosiphon africanus*, *Thermotoga* sp. (por ejemplo, *maritima*, *neapolitana*), *Methanobacterium thermoautotrophicum*, especies *Thermus* (por ejemplo, *aquaticus*, *brockianus*, *filiformis*, *flavus*, *lacteus*, *rubens*, *ruber*, *thermophilus*, ZO5).

En un modo de realización, la ADN polimerasa termoestable es una polimerasa dependiente del molde de ADN. En otro modo de realización, la ADN polimerasa termoestable tiene una actividad de transcriptasa inversa adicional y se puede usar para RT-PCR. Un ejemplo para dicha enzima es Tth ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Roche Diagnostics, N.º Cat. 11 480 014 001).

Muchas ADN polimerasas dependientes de ADN termoestables, tales como Taq ADN polimerasa, carecen de actividad 3'-5' exonucleasa dependiente bicatenaria, lo que también se conoce como actividad de corrección de errores. El alcance de la presente invención aún incluye además otras enzimas termoestables que poseen una actividad de corrección de errores de este tipo, tales como Pwo polimerasa (Roche Applied Science, N.º Cat. 04 743 750 001), Tgo polimerasa y Pfu polimerasa.

Además, dentro del alcance de la presente invención están mutantes, variantes o derivados de las mismas, quiméricas o "polimerasas de fusión" por ejemplo, Phusion (Finnzymes o New England Biolabs, N.º Cat. F-530S) o iProof (Biorad, N.º Cat. 172-5300), Pfx Ultima (Invitrogen, N.º Cat. 12355012) o Herculase II Fusion (Stratagene, N.º Cat. 600675).

Además, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender combinaciones de una o más de las polimerasas mencionadas anteriormente.

La ADN polimerasa termoestable también se puede inactivar de forma reversible como resultado de una modificación química. De forma más precisa, se introducen grupos bloqueantes termolábiles en la Taq ADN polimerasa que hacen que la enzima sea inactiva a temperatura ambiente (documento US 5.773.258). Estos grupos bloqueantes se retiran a temperatura elevada durante una etapa pre-PCR de modo que la enzima se vuelve activa. Una modificación termolábil de este tipo, por ejemplo, se puede obtener acoplado anhídrido citracónico o anhídrido aconítrico a los residuos de lisina de la enzima (documento US 5.677.152). Las enzimas que llevan dichas modificaciones están comercialmente

disponibles por ahora como Amplitaq Gold (Moretti, T., et al., Biotechniques 25 (1998) 716-22) o FastStart DNA polymerase (Roche Applied Science N.º Cat. 04 738 284 001).

5 En un modo de realización específico, dicha ADN polimerasa termoestable de acuerdo con la presente invención es Taq ADN polimerasa o bien delta 288 Taq ADN polimerasa, como se divulga en el documento US 2005/0037412 o dicha delta 288 Taq ADN polimerasa asociada con un aptámero como se divulga en el documento 6.020.130.

10 De forma ideal, una formulación de una ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes se obtiene por un procedimiento de purificación que no requiere la adición de un detergente en ninguna etapa de purificación. Después de que se obtenga un grado suficiente de purificación, la formulación puede comprender un sistema de tampón y otros complementos sin detergente. Una formulación de este tipo puede comprender, varios o todos de los siguientes componentes: tampón Tris, EDTA, DTT, sal y glicerol. Por ejemplo, una formulación de este tipo puede comprender, varias o todas de las siguientes cantidades de los componentes: Tris/HCl 10 a 50 mM pH 7,5, EDTA 0,05-0,2 mM, DTT 0,5-2 mM, cloruro de potasio 50-200 mM y glicerol al 20-80 %.

15 Mezclas de reacción

Una mezcla de reacción de acuerdo con la presente invención es una mezcla de reacción de PCR libre de cualquier detergente y comprende

- 20
- una formulación de a ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes
 - un ácido nucleico de molde, que preferentemente es un ADN
 - al menos uno o varios pares de cebadores de amplificación, diseñados de tal modo que se amplifique una región específica del ADN diana a partir del ácido nucleico de molde, y

25

 - los trifosfatos desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, y dTTP/o dUTP, y al menos un par de sondas de hibridación de FRET.

Procedimientos de uso

30 Las formulaciones de ADN polimerasas termoestables sin ningún detergente son útiles para cualquier tipo de reacción de amplificación de ácido nucleico. En un modo de realización, se pueden usar para la amplificación aleatoria tal como una reacción de cebado aleatoria o amplificación de genoma completo. En un modo de realización particular, dichas formulaciones de la invención son particularmente útiles para la amplificación de un ácido nucleico diana específico por medio de la realización de una reacción PCR, que puede ser una reacción PCR en tiempo real.

35 Con fines analíticos, una reacción PCR de este tipo se puede monitorizar en tiempo real. En una PCR en tiempo real, el análisis de la muestra se produce simultáneamente con la amplificación en el mismo tubo dentro del mismo instrumento. La formación de los productos de la PCR se monitoriza en cada ciclo de la PCR. Normalmente, se mide en termociclos que tienen dispositivos adicionales para medir las señales de fluorescencia durante la reacción de amplificación. Se pueden añadir sondas fluorescentes a la mezcla de PCR antes de la amplificación y se pueden usar para analizar los productos de la PCR durante la amplificación. Este enfoque combinado disminuye el manejo de la muestra, ahorra tiempo y reduce enormemente el riesgo de contaminación del producto para reacciones posteriores, ya que no es necesario retirar las muestras de sus recipientes cerrados para un análisis posterior.

45 Por lo tanto, en un cuarto aspecto, la presente invención también se refiere al uso de una formulación de una ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes para la amplificación por medio de PCR en tiempo real.

50 De forma alternativa, se pueden usar sondas de hibridación de FRET marcadas con fluorescencia que sólo emiten fluorescencia tras la unión a su ácido nucleico diana.

De acuerdo con la presente invención, se usa una formulación de una ADN polimerasa termoestable que sea completamente libre de detergentes para la amplificación de un ácido nucleico diana por medio de una PCR, caracterizada por que dicha PCR en tiempo real se monitoriza en tiempo real por medio de sondas de hibridación de FRET.

55 El formato de prueba de sonda de hibridación de FRET es útil para todos los tipos de ensayos de hibridación homogéneos (Matthews, J.A., y Kricka, L.J., Analytical Biochemistry 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondas de hibridación monocatenarias que se usan simultáneamente y son complementarias con sitios adyacentes de la misma hebra del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas están marcadas con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de modo que se puede medir una emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondas de hibridación se unen en posiciones adyacentes de la molécula diana que se va a detectar. De forma

alternativa a la monitorización del incremento en la fluorescencia del componente aceptor de FRET, también es posible monitorizar la disminución en la fluorescencia del componente dador de FRET como una medida cuantitativa del acontecimiento de hibridación.

5 En particular, el formato de sonda de hibridación de FRET se puede usar en la PCR en tiempo real, con el fin de detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de la PCR en tiempo real, se ha probado que el formato de sonda de hibridación de FRET es altamente sensible, exacto y fiable (documento US 6.174.670). Como alternativa al uso de dos sondas de hibridación de FRET, también es posible el uso de un cebador marcado fluorescente y sólo una sonda oligonucleotídica marcada (Bernard, P.S., et al., Analytical Biochemistry 255 (1998) 101-107). A este respecto, se pueden elegir arbitrariamente, tanto si el cebador está marcado con el compuesto dador de FRET o el aceptor de FRET.

15 Similar a otros formatos de detección basados en sondas, también se puede "multiplexar" el formato de detección de sonda de hibridación de FRET. De forma más precisa, en un recipiente de reacción, se pueden amplificar múltiples dianas con múltiples pares de cebadores de amplificación y detectar con múltiples sondas de hibridación. En este caso, dichas múltiples sondas se marcan con diferentes tintes fluorescentes detectables con el fin de detectar y discriminar las múltiples dianas que se supone que se encuentran en la muestra.

20 Para la detección múltiple con el formato de sonda de hibridación de FRET, es posible que se use fluoresceína o derivados de fluoresceína como un resto dador de FRET en combinación con diferentes restos aceptores de FRET tales como Cy-5, LC-Red-640, o LC-red 705.

25 Un ejemplo típico para un instrumento que puede realizar una PCR en tiempo real múltiple es el Roche Diagnostics LightCycler (N.º Cat. 3 531 414 201). Es un sistema de PCR rápido que permite una cuantificación de PCR en línea cinética y un posterior análisis de las curvas de fusión del producto de PCR. El sistema óptico del actual LightCycler versión 2.0 que está disponible comercialmente contiene una fuente de luz, un diodo emisor de luz azul (LED 470 nm) y seis canales de detección. Se determina un valor umbral de señal definido para todas las reacciones que se van a analizar y se determina el número de ciclos Cp requeridos para alcanzar este valor umbral para el ácido nucleico diana así como para los ácidos nucleicos de referencia tales como el gen constitutivo o estándar. Se pueden determinar los números de copia absolutos o relativos de la molécula diana en base a los valores de Cp obtenidos para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de referencia.

35 La fluorescencia emitida por una muestra se separa por un conjunto de espejos y filtros dicróicos en diferentes longitudes de onda que se pueden registrar en uno de los seis canales de detección. Debido a los compuestos fluorescentes que están disponibles en el mercado, esto permite la detección del tinte de unión a ADN bicatenario SybrGreen1, la detección de dos colores con el formato de sonda TaqMan y la detección de 4 colores con el formato de sonda de hibridación (HybProbe). Los detalles del sistema LightCycler se divulgan en los documentos WO 97/46707, WO 97/46712 y WO 97/46714.

40 Sin embargo, en las últimas fases de los ensayos de PCR en tiempo real basados en FRET, y en particular los respectivos ensayos múltiples, se observa con frecuencia una disminución en la fluorescencia. Esta desventaja de la PCR en tiempo real que usa sondas de hibridación de FRET se denomina efecto de "gancho". Los ejemplos se dan en la fig. 2 y 3. De forma sorprendente, se puede eliminar este efecto, si se usa una formulación de polimerasa de acuerdo con la presente invención y la mezcla de reacción está libre de cualquier cantidad mínima de detergente.

45 Procedimientos de preparación

50 La presente invención se basa en un procedimiento para la preparación de ADN polimerasas termoestables, caracterizado por que todas las etapas de la preparación se ejecutan en ausencia de cualquier detergente. En términos generales, se puede aplicar cualquier procedimiento de preparación que se pueda implementar exitosamente para la purificación de una ADN polimerasa termoestable sin ninguna adición de detergente en cada una de las etapas necesarias.

55 Por ejemplo, un procedimiento de purificación de este tipo puede comprender las etapas de:

- a) proporcionar un lisado complementado con inhibidores de proteasas,
- b) precipitación de sulfato de amonio
- c) una primera separación cromatográfica usando una primera matriz de cromatografía de afinidad
- d) una segunda separación cromatográfica usando una segunda matriz de cromatografía de afinidad
- 60 e) una tercera separación cromatográfica usando una matriz de hidroxiapatita.

El lisado se deriva preferentemente de una célula procariota recombinante, tal como E. coli, que se modifica genéticamente para expresar el gen que codifica la ADN polimerasa termoestable deseada en un alto rendimiento. Después de recoger las células a partir de un medio de fermentación por medio de centrifugación, se puede congelar el

sedimento y en el exceso, se pueden romper las células por procedimientos físicos tales como sonicación o, preferentemente por tratamiento con una celda a presión French. Antes, durante o inmediatamente después de la lisis, se puede añadir un tampón que ya contenga inhibidores de proteasas apropiados tales como por ejemplo, PMSF, leupeptina y similares.

5 Paralelo a la etapa de precipitación con sulfato de amonio, se pueden retirar los ácidos nucleicos contenidos en el lisado, enzimáticamente o bien preferentemente por medio de precipitación, por ejemplo con Polymin P. Ambos, los precipitados de ácido nucleico y los precipitados de proteína se pueden retirar por centrifugación.

10 A continuación, el sobrenadante se puede someter a una primera etapa cromatográfica, usando una columna de cromatografía de afinidad, que está en funcionamiento preferentemente de acuerdo con el principio de cromatografía por interacción hidrófoba. Lo más preferentemente, la matriz de afinidad es una Phenyl-Sepharose, tal como Phenyl-Sepharose CL-4B.

15 Posteriormente, se puede realizar una segunda cromatografía de afinidad usando una segunda matriz de afinidad que es diferente de la primera matriz de afinidad. Por ejemplo, se puede purificar la muestra sobre una columna de Heparin Sepharose, que contenga Heparin Sepharose CL-6B.

20 Después, se puede lograr una purificación adicional por medio de una tercera etapa cromatográfica que es preferentemente una purificación por medio de cromatografía con hidroxipatita.

25 Es posible un protocolo de purificación simplificado, si la ADN polimerasa termoestable expresada de forma recombinante comprende una denominada marca poli-His. A menudo se usan marcas polihistidina para la purificación por afinidad de proteínas recombinantes marcadas con polihistidina en sistemas procariotas y otros sistemas de expresión. Se recogen las células bacterianas recombinantes por medio de centrifugación y se lisa el sedimento celular resultante, por ejemplo por medios físicos bajo condiciones como las divulgadas anteriormente.

30 En esta fase, el extracto bruto contiene la proteína recombinante entre diversas otras proteínas y ácidos nucleicos que se originan a partir del huésped bacteriano. Opcionalmente, se pueden digerir los ácidos nucleicos contenidos en la muestra en esta fase por DNAsa I.

35 A continuación, se carga la mezcla sobre una columna que comprende una matriz de afinidad específica tal como Sepharose cargada con níquel o cobalto o similares. Una matriz de Sepharose o agarosa contiene iones de níquel o cobalto unidos a los que se une la marca polihistidina con alta afinidad. Posteriormente, se lava la resina con un tampón para retirar otras proteínas que no interaccionan específicamente con el ion cobalto o níquel.

40 Posteriormente, se puede lograr una purificación adicional por medio de una segunda etapa cromatográfica, que es preferentemente una cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, se puede usar una columna de Q-Sepharose ff.

Por tanto, un procedimiento de purificación típico para purificar ADN polimerasas termoestables marcadas con His puede comprender las etapas de

- 45
- a) proporcionar un lisado de células congeladas derivadas de una célula que expresa de forma recombinante una ADN polimerasa termoestable marcada con His complementada con un inhibidor de proteasas
 - b) digestión de ácidos nucleicos contenidos en la muestra con DNAsa I
 - c) separación cromatográfica usando una matriz de Sepharose cargada con níquel
 - d) separación cromatográfica usando una matriz de intercambio aniónico, que es preferentemente Q-Sepharose ff.

50 Como es obvio para un experto en la técnica, se puede realizar una etapa de diálisis después de cada elución cromatográfica, si se requiere. En particular, una diálisis de este tipo es particularmente ventajosa con el fin de transferir la ADN polimerasa termoestable purificada en un tampón de almacenamiento apropiado. Un sistema de tampón adecuado para un almacenamiento a largo plazo a - 20 °C es Tris/HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, cloruro de potasio 100 mM, DTT 1 mM, glicerol al 50 %, pH 8,0.

55 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del espíritu de la invención.

60 Descripción de las figuras

Figura 1: Resultado del experimento divulgado en el ejemplo 6. Se usó ADN diana en varias cantidades y se valoró a partir de 300 ng (A), 30 ng (B), 3 ng (C), 0,3 ng (D) 0,03 ng (E) y sin ADN (F). Se preparó la Taq ADN polimerasa usada sin la adición de detergentes.

Figura 2: Resultado del experimento divulgado en el ejemplo 6. Se usó ADN diana en varias cantidades y se valoró a partir de 300 ng (A), 30 ng (B), 3 ng (C), 0,3 ng (D) 0,03 ng (E) y sin ADN (F). La Taq ADN polimerasa usada contenía detergentes (Tween 20 al 0,5 %, Nonidet NP-40 al 0,5 %).

Figura 3: Resultado del experimento divulgado en el ejemplo 6. Se usó ADN diana en varias cantidades y se valoró a partir de 300 ng (A), 30 ng (B), 3 ng (C), 0,3 ng (D) 0,03 ng (E) y sin ADN (F). Se usó la Taq ADN polimerasa Roche Applied Science N.º Cat. : 11 146 165 001 para este experimento

Ejemplos

Ejemplo 1:

Purificación de Taq ADN polimerasa

Se purificó la Taq ADN polimerasa recombinante hasta homogeneidad a partir de células de *E. coli* congeladas K12LE392 que albergaban los plásmidos pUBS520 y pT5-Taq. Se midieron las concentraciones de proteínas a 280 nm. Se usó un factor de extinción molar de 1,64.

Se descongelaron células congeladas (25 gramos) y se suspendieron en 60 ml de tampón A (Tris/HCl 50 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 0,5 mM (PMSF), EDTA 1 mM, leupeptina 0,64 µg/ml, pH 8,0). Se rompieron las células usando una celda a presión French.

A la solución se le añadió sulfato de amonio (2,4 g/100 ml). Se reajustó el valor de pH a pH 8,0. Se precipitaron los ácidos nucleicos por adición de Polymix P. Se retiraron los ácidos nucleicos precipitados por centrifugación (30 min a 5000 rpm). Se incubó el sobrenadante transparente a 75 °C durante 15 min. se retiraron las proteínas precipitadas por centrifugación (30 min a 5000 rpm).

A la solución de sobrenadante transparente se le añadió sulfato de amonio (10,57 g/100 ml). Se reajustó el valor de pH a pH 8,0. Se aplicó la solución sobre una Phenyl Sepharose CL-4B (1,6 x 12 cm) equilibrada con tampón B (Tris/HCl 50 mM, EDTA 1 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 8,0). Se lavó la columna con tampón B, después con tampón C (Tris/HCl 50 mM, pH 8,0) y finalmente con tampón D (Tris/HCl 50 mM, EDTA 1 mM, etilenglicol al 20 %, pH 8,0). Se eluyó la enzima con un gradiente lineal de tampón D y tampón D + urea 4 M. Se agruparon las fracciones que contenían la enzima.

Se aplicó el conjunto en una columna de Heparin Sepharose CL-6B (1,6 x 12,5 cm) equilibrada con tampón E (Tris/HCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 100 mM, glicerol al 5 %, pH 8,0). Se lavó la columna usando el tampón E. Se eluyó la enzima con un gradiente lineal tampón E y tampón E + cloruro de potasio 650 mM. Se analizaron las fracciones por electroforesis en gel de SDS y se agruparon las fracciones que contenían la enzima. Se dializaron las fracciones agrupadas frente al tampón F (fosfato de potasio 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, glicerol al 5 %, pH 8,0). Se cargó el conjunto dializado en una HA Ultrogel (Pall, 1,6 x 8,5 cm). Se lavó la columna con tampón F. Se eluyó la enzima con un gradiente lineal de tampón F y tampón G (fosfato de potasio 500 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, glicerol al 5 %, pH 8,0). Se agruparon las fracciones que contenían la enzima y se dializaron frente a tampón de almacenamiento libre de detergente (Tris/HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, cloruro de potasio 100 mM, DTT 1 mM, glicerol al 50 %, pH 8,0).

Ejemplo 2:

Purificación de delta 288 Taq ADN polimerasa

Se purificó la versión truncada recombinante de Taq ADN polimerasa, delta 288 Taq ADN polimerasa (véase el documento US 20050037412) hasta homogeneidad a partir de células de *E. coli* K12XL1 Blue congeladas que albergaban el plásmido pQE80-L. Se midieron las concentraciones de proteínas a 280 nm. Se usó un factor de extinción molar de 1.117.

Se descongelaron las células congeladas (20 gramos) y se suspendieron en 240 ml de tampón A (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 0,1 mM (PMSF), DTT 1 mM, pH 8,0). Se rompieron las células usando una celda a presión French.

A la solución, se le añadió MgCl₂ hasta una concentración final de 4 mM. Después de la adición de DNasa (50 u/ml) se incubó la solución a temperatura ambiente durante 30 min. Se incubó la solución a 72 °C durante 30 min. Después de enfriar la solución hasta 2-8 °C, se retiraron las proteínas precipitadas por centrifugación (10 min a 13 000 rpm).

Se aplicó el sobrenadante transparente a una columna Sepharose ff quelante cargada con níquel (5 x 4 cm) equilibrada en tampón B (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0). Se eluyó la enzima con un

gradiente lineal de tampón B y tampón C (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Se analizaron las fracciones por electroforesis en gel de SDS y se agruparon las fracciones que contenían la enzima.

5 Después de la diálisis frente al tampón D (Tris/HCl 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 15 mM, glicerol al 5 %, pH 8,5) se aplicó la solución en una columna Q-Sepharose ff (1,6 x 4 cm). Después de lavar la columna con tampón D, se eluyó la enzima usando un gradiente lineal de sal (NaCl 15-200 mM). Se analizaron las fracciones por electroforesis en gel de SDS y se agruparon las fracciones que contenían la enzima.

10 Se dializó el conjunto final frente a tampón de almacenamiento libre de detergente (Tris/HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, cloruro de potasio 100 mM, glicerol al 50 %, pH 8,0)

Ejemplo 3:

15 Preparación de delta 288 AptaTaq ADN polimerasa

Se combinó la delta 288 Taq ADN polimerasa purificada (véase el ejemplo 1) con aptámero.

20 La secuencia del aptámero era: CGA TCA TCT CAG AAC ATT CTT AGC GTT TTG TTC TTG TGT ATG ATC G-PO₄ (SEQ. ID. NO: 2)

Se combinó una solución enzimática altamente concentrada con aptámero y se diluyó con tampón de almacenamiento libre de detergente hasta concentraciones finales de 50 U/μl polimerasa y 4,33 pmol aptámero/unidad de polimerasa. Adicionalmente, se produjo una versión que tenía una actividad de volumen de 5 U/μl de la misma forma. Se almacenaron las combinaciones de enzimas a -20 °C.

Ejemplo 4:

Prueba de actividad de la polimerasa

30 Se determinó la actividad de la ADN polimerasa en un ensayo de extensión de cebador usando procedimientos estándar. Se usó un híbrido cebador/molde como sustrato. El cebador/molde consistió en un cebador de secuenciación M13 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' (SEQ. ID. NO: 1) hibridado a un molde de ADN M13 mp9ss. Se extendió el cebador por la incorporación de dNTP. La mezcla de dNTP contenía α³²dCTP marcado radioactivamente. Se precipitó el producto sintetizado con TCA y se cuantificó el α³²dCTP incorporado usando un contador de centelleo.

35 Se llevaron a cabo reacciones en un volumen de 50 μl que contenía los siguientes reactivos: Tris 67 mM (pH 8,3), MgCl₂ 5 mM, mercaptoetanol 10 mM, polidocanol al 0,2 %, 0,2 mg/ml de gelatina, dATP 200 μM, dCTP 100 μM, dGTP 200 μM, dTTP 200 μM, híbrido ADN/cebador (ADN 1 μg, cebador 0,3 μg) y α³²dCTP (1 μC). Se añadieron alícuotas de enzima diluida a la mezcla, se mezcló y se incubó durante 60 min a 65 °C. Después de la incubación, se dispusieron las muestras en hielo y se precipitó el ADN con solución TCA al 10 %. Se filtraron las muestras a través de filtros GFC (Whatman), se lavaron tres veces los filtros con TCA al 5 %, se secaron y se contaron en un contador β en 2 ml de líquido de centelleo.

Ejemplo 5:

45 Amplificación de ADN genómico humano usando diferentes formulaciones de ADN polimerasa

Se amplificó un fragmento del gen tPA a partir de ADN genómico humano (Roche Applied Science, Mat. N.º 11 691 112). Se realizó la detección y cuantificación de los productos cuantificados usando sondas de hibridación de FRET (documento US 6.174.670).

50 Para demostrar el efecto de los detergentes, se usaron una preparación de delta 288 Taq ADN polimerasa preparada sin detergentes de acuerdo con el ejemplo 2, una preparación de delta 288 AptaTaq ADN polimerasa de acuerdo con el ejemplo 3 y una preparación de Taq ADN polimerasa preparada con Tween 20 al 0,5 %. Las tres formulaciones diferentes de polimerasa fueron las siguientes:

formulación 1: delta 288 AptaTaq ADN polimerasa sin detergente

formulación 2: delta 288 Taq ADN polimerasa sin detergente

formulación 3: delta 288 Taq ADN polimerasa con detergente (Tween 20 al 0,5 %)

60 Se usaron los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

tPA7 inverso: GGA AGT ACA GCT CAG AGT TCT (SEQ. ID. NO: 3)

tPA7 directo: CTC CAT TCA TTC TCA AAA GGA CT (SEQ. ID. NO: 4)

ES 2 528 230 T3

Los oligonucleótidos de detección fueron:

tPA Fluos: GGG AAA GGC GGG GTG G-Fluo (SEQ. ID. NO: 5)

5 tPA LC-Red 640: LC-Red 640-GCC ACT TAC CCT CAG AGC AGG CA (SEQ. ID. NO: 6)

Se llevaron a cabo reacciones (20 µl) en placas de 384 pocillos en una plataforma Light Cycler LC480 (Roche Applied Science, N.º Cat. : 05 015 278 001). Se usaron 2,95 unidades de la respectiva polimerasa por reacción de 20 µl.

10 Las concentraciones finales de los reactivos fueron:

Tris/HCl	30 mM
MgCl ₂	3,2 mM
KCl	30 mM
dATP	0,2 mM
dCTP	0,2 mM
dGTP	0,2 mM
dUTP	0,6 mM
Caseína	0,5 g/l
tPA7 directo	0,5 µM
tPA7 inverso	0,5 µM
tPA7 Fluos	0,2 µM
tPA7 Red640	0,2 µM
ADN genómico humano	0,03 ng - 300 ng

Se usó el siguiente programa de ciclación en el instrumento LC 480:

1. Desnaturalización	Ciclos	1
	Modo de análisis	ninguna
	Dianas molde	Segm. 1
	Diana (°C)	95
	Modo de adquisición	ninguno
	Retención (hh:mm:ss)	00:00:30
	Tasa de aumento (°C/s)	4,8
	Adquisición (por °C)	
	Diana sec. (°C)	0
	Tamaño etapa (°C)	0,0
Retraso etapa (ciclos)	0	

15

2. Amplificación	Ciclos	45		
	Modo de análisis	Cuantificación		
	Temp. Dianas	Segm. 1	Segm. 2	Segm. 3
	Diana (°C)	95	60	72
	Modo de adquisición	ninguno	individual	ninguno
	Retención (hh:mm:ss)	0:00:10	0:00:15	0:00:20
	Tasa de aumento (°C/s)	4,8	2,5	4,8
	Adquisición (por °C)			
	Sec. Diana (°C)	0	0	0
	Tamaño etapa (°C)	0,0	0,0	0,0
Retraso etapa (ciclos)	0	0	0	

3. Enfriamiento	Ciclos	1
	Modo de análisis	ninguna
	Temp. Dianas	Segm. 1
	Diana (°C)	40
	Modo de adquisición	ninguna
	Retención (hh:mm:ss)	0:00:30
	Tasa de aumento (°C/s)	2,5
	Adquisición (por °C)	
	Sec. Diana (°C)	0
	Tamaño etapa (°C)	0,0
Retraso etapa (ciclos)	0	

5 La siguiente tabla muestra los puntos de cruce calculados obtenidos para las tres formulaciones diferentes de polimerasa estudiadas:

Un número de punto de cruce bajo corresponde a un alto grado de ácido nucleico amplificado.

ng molde/reacción	300	30	3	0,3	0,03
Delta 288 Apta Taq sin detergente:	21,5	24,9	28,2	31,6	35,2
Delta 288 Taq sin detergente	22,8	26,7	29,5	30,6	32,5
Delta 288 con detergente	23,7	27,9	31,0	33,3	34,1

10 Los resultados demuestran que con la excepción del uso de Delta 288 Apta Taq sin detergente conjuntamente con cantidades mínimas de molde ADN, se mejora la reacción de amplificación en ausencia de un detergente tal como Tween 20.

Ejemplo 6:

15 El experimento se llevó a cabo básicamente como se divulga en el ejemplo 5 con la excepción de que se sometieron a prueba las actividades de diferentes formulaciones de Taq ADN polimerasa:

- 20 A) una formulación de polimerasa preparada sin detergentes de acuerdo con el ejemplo 1 (véase la fig. 1)
- B) una formulación de polimerasa preparada sin detergentes de acuerdo con el ejemplo 1, pero suplementada finalmente con Nonidet NP-40 y Tween 20; detergentes cada uno al 0,5 % (véase la fig. 2)

C) una formulación de polimerasa preparada con detergentes (Roche Applied Science N.º Cat. 11 146 165 001) (véase la fig. 3).

5 Los resultados, como se muestran en las figuras 1-3 que representan curvas de amplificación de PCR en tiempo real, demuestran que se obtienen señales de amplificación buenas con cada una de las 3 formulaciones diferentes. Por tanto, se puede concluir que el rendimiento de Taq ADN polimerasa no requiere la presencia de detergentes durante la propia reacción de amplificación, ni tampoco la adición de detergentes durante el procedimiento de purificación da como resultado una mejora en el rendimiento de la enzima.

10 Las 2 últimas formulaciones mostraron un efecto de gancho característico para todas las concentraciones de ADN diana sometidas a prueba (véanse las figuras 2 y 3), es decir, la señal de amplificación disminuyó de nuevo en ciclos de amplificación tardíos. Por el contrario, la polimerasa preparada sin la adición de detergentes no mostró ningún efecto de gancho en absoluto (véase la figura 1). Se puede concluir que el efecto de gancho observado con la formulación B) se debe predominantemente a la presencia de detergentes, y, de forma similar, el efecto de gancho en la formulación C) se debe a la presencia de cantidades mínimas de detergentes aún presentes dentro del ensayo debido a los detergentes que se han usado durante la purificación de la Taq ADN polimerasa. Por tanto, el efecto de gancho sólo se evita si se usa una polimerasa de acuerdo con la presente invención, cuando se realiza la amplificación en ausencia de cualquier detergente.

20 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE)

<120> Polimerasas libres de detergente

25

<130> 26670 FT

<150> EP10159673

<151> 12/04/2010

30

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

35

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> ADN artificial, monocatenario

<400> 1

gtaaaacgac ggccagt 17

45

<210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> ADN artificial, monocatenario

<400> 2

55

cgatcatctc agaacattct tagcgttttg ttctgtgta tgatc 45

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN artificial, monocatenario

<400> 3
 ggaagtacag ctcaagattc t 21

5 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> ADN artificial, monocatenario

<400> 4
 ctccattcat tctcaaaagg act 23

15 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> ADN artificial, monocatenario

<400> 5
 25 gggaaaggcg gggtagg 16

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN artificial, monocatenario

35 <400> 6
 gccacttacc ctcaagagcag gca 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mezcla de reacción libre de cualquier detergente que comprende una formulación de una ADN polimerasa termoestable que está completamente libre de detergentes, que comprende Tris/HCl 10 a 50 mM, EDTA 0,05-0,2 mM, DTT 0,5-2 mM, cloruro de potasio 50-200 mM y glicerol al 20-80 %,
- un ácido nucleico de molde, que preferentemente es un ADN,
 - al menos un cebador que es un oligonucleótido que se puede unir a dicho ADN, y
 - 4 dNTP,
- 10 que comprende adicionalmente al menos un par de sondas de hibridación de FRET.
- 15 2. Uso de una mezcla de reacción de acuerdo con la reivindicación 1, para la amplificación de un ácido nucleico diana por medio de una PCR, en el que la PCR se monitoriza en tiempo real.

Figura 1

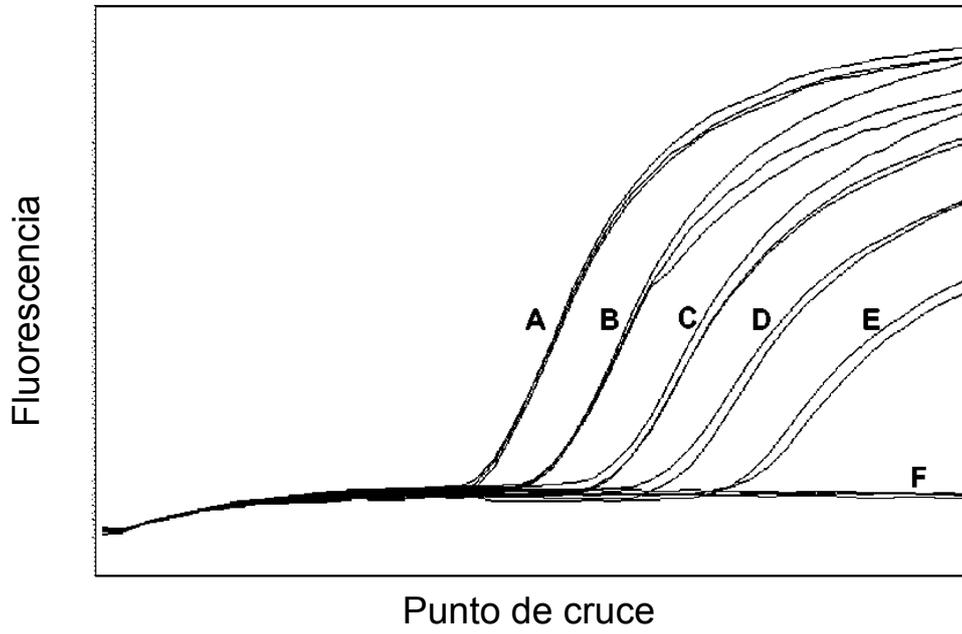


Figura 1: Taq ADN polimerasa (libre de detergente)

A = 300 ng, B = 30 ng, C = 3 ng, D = 0,3 ng, E = 0,03 ng, F = NTC

Figura 2

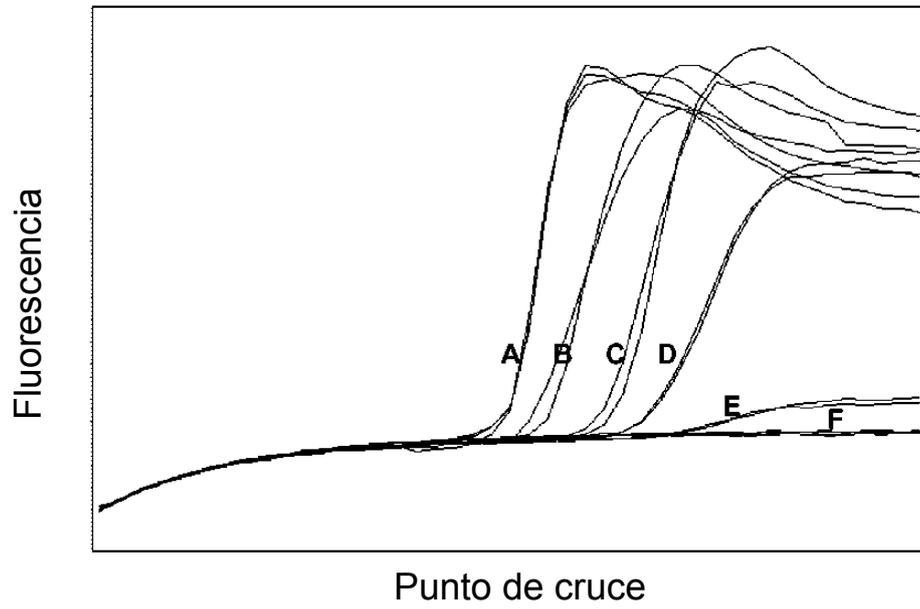


Figura 2: Taq ADN polimerasa

A = 300 ng, B = 30 ng, C = 3 ng, D = 0,3 ng, E = 0,03 ng, F = NTC

Figura 3

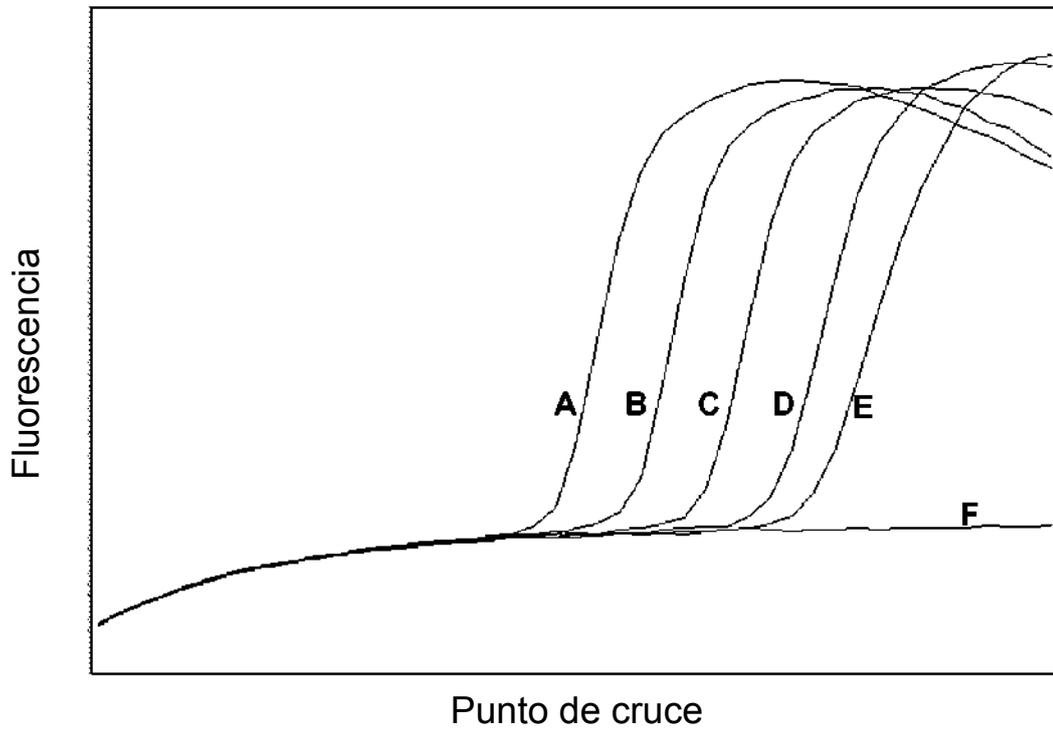


Figura 3: Taq ADN polimerasa

A = 300 ng, B = 30 ng, C = 3 ng, D = 0,3 ng, E = 0,03 ng, F = NTC