

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 632**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09774388 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2294225**

54 Título: **Método de amplificación directa a partir de muestras de ácido nucleico en bruto**

30 Prioridad:

**30.06.2008 US 77113 P**

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

**30.03.2015**

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)  
5791 Van Allen Way  
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**CHANG, CHIEN-WEI;  
WANG, DENNIS Y. y  
HENNESSY, LORI K.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 532 632 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

Método de amplificación directa a partir de muestras de ácido nucleico en bruto

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad conforme a 35 U.S. C. § 119(e) sobre la solicitud de EE.UU. Nº 61/077/113 presentada el 30 de junio de 2008.

10 **Campo**

Las presentes enseñanzas generalmente se refieren a métodos para amplificar directamente ácidos nucleicos a partir de muestras en bruto.

15 **Introducción**

Una detección rápida y precisa de perfiles de ADN es un aspecto clave del análisis de muestras de casos forenses. Las muestras en bruto, tales como la sangre y los frotis bucales, contiene sustancias que pueden inhibir la actividad de las polimerasas usadas para el tipado de repeticiones cortas en tándem basado en PCR. Históricamente ha sido necesario retirar los inhibidores y purificar el ADN antes de realizar manipulaciones enzimáticas aguas abajo, tales como amplificación por PCR. Comercialmente se dispone de muchos tipos de métodos de aislamiento y purificación de ADN y kits. El documento WO 00/50564 A2 se refiere a una composición y a un método para extraer el ADN. El documento WO 2008/002740 A2 proporciona métodos y composiciones para extraer ARN de las células. El documento WO 2006/090987 A1 describe métodos para realizar una reacción enzimática directa que implica una molécula de ácido nucleico y usa un tampón zwitteriónico y/o un carbohidrato no reductor para impedir que la muestra biológica inhiba la reacción enzimática. El documento EP 1 050 587 B1 describe composiciones y métodos para la generación de ácidos nucleicos a partir de un molde de ácido ribonucleico y adicionalmente la replicación de ácido nucleico. No obstante, su uso añade tiempo y gastos a la preparación de muestras para el posterior análisis.

30 **Sumario**

La invención se puede definir mediante las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5, 7 y 9. De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 8. Las presentes enseñanzas proporcionan un método de realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende proporcionar una muestra en bruto, que comprende: ácido desoxirribonucleico; opcionalmente incubar la muestra en bruto con NaOH a de 5 mM de 25 mM; mezclar la muestra en bruto con un tampón directo para formar una solución que contiene ácido nucleico y realizar una PCR con el ácido desoxirribonucleico, en el que el tampón directo comprende al menos un 3 % - 8 % de glicerol, 0,2 % - 0,9 % de tensioactivos no iónicos y 1000 - 3000 ug/ml de BSA. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, entre otros, polisorbato (Tween), Tween 20, Triton-X 100 y similares.

Las presentes enseñanzas proporcionan métodos para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende proporcionar una muestra en bruto que comprende: ácido desoxirribonucleico; incubar opcionalmente la muestra en bruto con NaOH a de 5 mM a 25 mM; mezclar la muestra en bruto con un tampón directo para formar una solución que contiene ácido nucleico y realizar la PCR con la solución, en el que el tampón directo comprende al menos 5 pares de cebadores para PCR, Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1000 - 3000 ug/ml de BSA y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa.

En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan métodos de determinación de la identidad de un ser humano, que comprende proporcionar una muestra en bruto que comprende ácido desoxirribonucleico del ser humano; incubar opcionalmente la muestra en bruto con NaOH de 5 mM a 25 mM; mezclar la muestra en bruto con el tampón directo que forma una solución que contienen ácido nucleico, en los que el tampón directo comprende una pluralidad de pares de cebadores; en los que cada par de cebador flanquea a un locus genómico que contiene una repetición corta en tándem (STR); realizar una PCR con la solución para formar una pluralidad de amplicones de PCR; en los que cada amplicón de PCR tiene un tamaño determinable; e identificar el ser humano con referencia al tamaño de los amplicones de PCR; en los que el tampón directo comprende adicionalmente Tris - HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1000 - 3000 ug/ml de BSA; y 0,101 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa.

En algunas de las realizaciones se incluyen métodos de preparar ácidos nucleicos para una manipulación enzimática aguas abajo que comprenden proporcionar una muestra en bruto, que comprende: ácido desoxirribonucleico; incubar opcionalmente la muestra en bruto con NaOH a de 5 mM a 25 mM; mezclar la muestra en bruto con un tampón directo para formar una solución que contiene ácido nucleico y realizar una manipulación enzimática aguas abajo en la solución, en el que el tampón directo comprende Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30

- 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1000 - 3000 ug/ml de BSA y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa. En algunas realizaciones, la manipulación enzimática aguas abajo es PCR.

- 5 Las presentes enseñanzas también proporcionan kits para análisis genético, comprendiendo los kits una pluralidad de pares de cebadores, en los que cada par de cebadores flanquea un locus genómico que contiene una repetición corta en tándem (STR), y un tampón directo, en el que el tampón directo comprende Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1000 - 3000 ug/ml de BSA y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa. En algunas realizaciones, los kits como se han expuesto anteriormente pueden incluir opcionalmente NaOH u otros compuestos alcalinos fuertes u otros agentes para lisis celular.

15 Otras realizaciones son mezclas de reacción que comprenden un tampón directo y una pluralidad de pares de cebadores, en los que cada par de cebadores flanquea un locus genómico que contiene una repetición corta en tándem (STR), y en los que el tampón directo comprende Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1200 - 3000 ug/ml de BSA y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa. En algunas realizaciones, los kits como se han expuesto anteriormente pueden incluir opcionalmente NaOH u otros compuestos alcalinos fuertes u otros agentes para lisis celular.

20 **Breve descripción de las figuras**

*El experto en la técnica entenderá que las figuras, que se describen más adelante, son con fines ilustrativos únicamente.*

- 25 La Figura 1 es un electroferograma de un perfil de STR de ADN genómico de una muestra de sangre.  
Las Figuras 2A-2D son electroferogramas de perfiles de STR fallados de muestras de sangre que se han transferido a papel de FTA.  
30 Las Figuras 3A a 12B son electroferogramas comparativos de perfiles de STR de 10 individuos cuya sangre se transfirió a papel FTA, una perforación de la cual se introdujo en tampón directo de las presentes enseñanzas en el presente documento y de ha denominado "A". Al tiempo que los electroferogramas designados "B" representan perfiles de STR de la sangre de los mismos 10 individuos preparada usando el sistema de purificación PowerPlex 16 HS comercializado por Promega.

35 **Descripción de las realizaciones de ejemplo**

En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que específicamente se indique lo contrario. En esta solicitud, la palabra "un" o "uno/a" significa "al menos uno/a" a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante.

Los títulos de las secciones usadas en el presente documento son sólo para propósitos de organización y no deben interpretarse como una limitación del objeto descrito.

45 **Algunas definiciones**

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra en bruto" hace referencia a una muestra de origen biológico que se sospecha que contiene ácidos nucleicos, que no ha sufrido procedimientos para aislamiento o purificación de dichos ácidos nucleicos. Por ejemplo, una muestra de sangre es una muestra en bruto. Las células en la muestra en bruto pueden opcionalmente lisarse. Adicionalmente, una muestra de sangre transferida a papel que contiene un reactivo de lisis, tal como papel FTA (disponible comercialmente en Whatman), es una muestra en bruto. Un frotis bucal de las células del carrillo es otro ejemplo de una muestra en bruto. Las muestras en bruto incluyen, entre otras, sangre, sangre diluida, sangre sobre papel, frotis bucales y frotis bucales sobre un sustrato para almacenamiento de muestras, tales como papel FTA. Un experto en la técnica reconocerá una enorme variedad de otras muestras en bruto cuyo análisis se verá facilitado por las presentes enseñanzas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tampón directo" hace referencia a un tampón en el que se puede introducir una muestra en bruto. El tampón directo contiene cebadores y enzima para realizar una manipulación enzimática aguas abajo, tal como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tampón directo permite la liberación de los ácidos nucleicos y para su amplificación directamente en el tampón directo, sin la necesidad de aislar o purificar el ácido nucleico. Los tiempos y temperaturas de ciclado ilustrativos para PCR se pueden encontrar en Sambrook et al., Molecular Cloning, 3ª edición, 1993. Mientras que las presentes enseñanzas se centran en el uso del tampón directo para PCR, se apreciará que un experto en la técnica pueda emplear el tampón directo de las presentes enseñanzas como procedimiento frontal para otros tipos de manipulaciones enzimáticas aguas abajo, por ejemplo transcripción inversa usando una transcriptasa inversa, o un ensayo de unión de oligonucleótidos usando una ligasa.

- 5 Como se usa en el presente documento, “aguas abajo”, cuando se usa en referencia a métodos y manipulaciones realizados en ácidos nucleicos diana, hace referencia a métodos y manipulaciones realizadas con una muestra de ácido nucleico diana después de un método para liberar un ácido nucleico de una muestra biológica, incluyendo, entre otros, lisis de una célula para liberar el ácido nucleico de la célula.
- 10 Como se usa en el presente documento, “manipulación enzimática aguas abajo” hace referencia a procedimientos realizados sobre una muestra de ácido nucleico incluyendo, entre otros, PCR usando una polimerasa, transcripción inversa usando una transcriptasa inversa o un ensayo de unión de oligonucleótidos usando una ligasa.
- 15 La expresión “compuesto alcalino fuerte”, como se usa en el presente documento incluye, entre otros, NaOH. Los compuestos alcalinos fuertes se pueden usar para lisar células antes de la adición de algunas realizaciones del tampón directo.
- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión “ADN genómico” hace referencia a la secuencia de ADN cromosómico de un gen o segmento de un gen, incluyendo las secuencias de ADN de no codificación, así como regiones codificantes. El ADN genómico también se refiere a ADN aislado directamente de las células o cromosomas o las copias clonadas de todo o parte de dicho ADN.
- 25 El término “alelo”, como se usa en el presente documento, hace referencia a una variación genética asociada con un gen o segmento de ADN, es decir una de dos o más formas alternativas de una secuencia de ADN que ocupa el mismo locus.
- 30 El término “locus”, como se usa en el presente documento, hace referencia a una posición específica en un cromosoma o una molécula de ácido nucleico. Los alelos de un locus se localiza en sitios idénticos en cromosomas homólogos.
- 35 Como se usa en el presente documento, la expresión “locus de repetición corta en tándem (STR)” hace referencia a cualquier región del genoma humano que contiene elementos cortos de secuencia repetitiva de una longitud de 3 a 7 pares de bases.
- 40 Como se usa en el presente documento, la expresión “locus genómico que contiene una repetición corta en tándem (STR)” hace referencia a un locus de STR en el que el número de elementos de secuencia repetitivos (y longitud neta de la secuencia) en una región concreta del ADN genómico varía de un alelo a otro y de un individuo a otro.
- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión “cebador de amplificación” y “cebador” hace referencia a un oligonucleótido que es capaz de hibridar de forma específica de sitio con una región de ARN o ADN adyacente a una secuencia diana y de servir como cebador de iniciación para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador, por ejemplo en presencia de nucleótidos y un agente inductor de la polimerización tal como una ADN polimerasa dependiente de ADN y a una temperatura, pH, concentración de metales y concentración de sales adecuadas. Normalmente, una reacción de PCR usa un par de cebadores de amplificación también conocidos como “pares de cebadores” que incluyen un cebador “aguas arriba” o “directo” o un cebador “aguas abajo” o “inverso”, que delimitan una región del ARN o ADN que se va a amplificar.
- 50 Como se usa en el presente documento, el término “amplificar” hace referencia a un proceso por el cual una porción de un ácido nucleico se replica usando, por ejemplo, cualquiera de una amplia gama de reacciones de extensión del cebador. Reacciones de extensión del cebador de ejemplo incluyen, entre otros, PCR. A menos que se indique específicamente, “amplificar” hace referencia a una única replicación o a una amplificación aritmética, logarítmica o exponencial.
- 55 Los términos “amplicón” y “amplicón de PCR”, como se usan en el presente documento, hacen referencia a una amplia gama de técnicas para aumentar las secuencias polinucleotídicas, lineal o exponencialmente, y pueden ser el producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser bicatenario o monocatenario y puede incluir las hebras componentes separadas obtenidas mediante desnaturalización de un producto de la amplificación bicatenario. En determinadas realizaciones, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como molde en un ciclo de amplificación posterior. Técnicas de amplificación de ejemplo incluyen, entre otras, PCR o cualquier otro método que usa una etapa de extensión del cebador. Otros ejemplos no limitantes de amplificación incluyen, entre otros, reacción de detección de la ligasa (LDR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR). Los métodos de amplificación pueden comprender termociclador o se pueden realizar isotérmicamente. En varias realizaciones, la expresión “producto de amplificación” incluye productos de cualquier número de ciclos de reacciones de amplificación.
- 60 La expresión “secuencia de ácido nucleico” como se usa en el presente documento puede hacer referencia al propio material de ácido nucleico y no está restringido a la información de la secuencia (es decir, la sucesión de letras elegidas entre las cinco letras de bases A, C, G T o U) que caracteriza bioquímicamente un ácido nucleico específico, por ejemplo una molécula de ADN o ARN.
- 65

Como se usa en el presente documento, los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico” u “oligonucleótido” hace referencia a un polímero lineal de monómeros o enlaces naturales o modificados, incluyendo ácido desoxirribonucleico, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, ácidos nucleicos poliamida y similares, unidos por enlaces internucleosídicos y tienen la capacidad de unirse específicamente a un polinucleótido diana mediante un patrón regular de interacciones monómero-monómero, tal como el tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, y capaces de unirse a otro oligonucleótido en una reacción dirigida por molde. Normalmente, los monómeros están unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos de tamaño variable desde unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo 3 - 4, a varios cientos de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido, tal como un oligonucleótido, está representado por una secuencia de letras, tales como "ATGCCTG," se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'→ 3' de izquierda a derecha y que “A” indica desoxiadenina, “C” indica desoxicitidina, “G” indica desoxiguanosina y “T” indica desoxitimidina, a menos que se indique lo contrario. Las letras A, C, G y T se pueden usar para hacer referencia a las propias bases, a nucleósidos o a nucleótidos que comprenden las bases, como es convencional en la técnica. En los polinucleótidos de origen natural, el enlace internucleosídico normalmente es un enlace fosfodiéster y las subunidades se denominan “nucleótidos”.

Como se usa en el presente documento, “determinación de la secuencia”, “determinar una secuencia de bases nucleotídicas”, “secuenciación”, identificación y términos similares incluyen la determinación de la información de secuencia tanto parcial como completa. Es decir, el término incluye comparaciones de secuencia, huellas y niveles similares de información sobre un polinucleótido diana, así como la identificación y orden expresos de cada nucleósido del polinucleótido diana dentro de una región de interés. En determinadas realizaciones, “determinación de secuencia” comprende identificar un único nucleótido, mientras que en otras realizaciones de identifica más de un nucleótido. La identificación de nucleósidos, nucleótidos y/o bases se considera equivalente en el presente documento. Cabe destacar que la realización de una determinación de secuencia en un polinucleótido normalmente da información equivalente con respecto a la secuencia de un polinucleótido perfectamente complementario y, por tanto, es equivalente a la determinación de la secuencia realizada directamente sobre un polinucleótido perfectamente complementario.

Como se usa en el presente documento, “pluralidad” en referencia a sondas oligonucleotídicas incluye conjuntos de dos o más sondas oligonucleotídicas en las que puede haber un único oligonucleótido “común” que normalmente es específico de una región no variable de un polinucleótido diana y una o más sondas oligonucleotídicas “silvestres” y/o “mutantes” que normalmente son específicas de una región de un polinucleótido diana que contiene variantes alélicas o mutacionales en la secuencia.

Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico polimerasa” o “polimerasa” hace referencia a cualquier polipéptido que cataliza la síntesis de un polinucleótido usando un polinucleótido existente como molde.

Como se usa en el presente documento, “ADN polimerasa” hace referencia a una ácido nucleico polimerasa que cataliza la síntesis de ADN usando un polinucleótido existente como molde.

#### 40 Descripción detallada

Se realizó un gran número de experimentos variando la concentración respectiva de cada uno de los ingredientes de un tampón directo deseado, incluyendo Tris-HCl, KCl, dNTP, BSA, ADN polimerasa AmpliTaq Gold, MgCl<sub>2</sub> y la proteína de unión monocatenaria (SSB), glicerol y tensioactivo no iónico. Estos experimentos usaron, por ejemplo, ácido húmico como representativo de los inhibidores normalmente presentes en muestras difíciles de analizar de material biológico y, por tanto, sirvieron como una aproximación fácil de producir para muestras en bruto. Los resultados de estos experimentos indicaron que las siguientes formulaciones eran particularmente eficaces en la producción de resultados de calidad alta cuando se analizaron las muestras para identificar alelos STR.

Las presentes enseñanzas incluyen tampones directos que comprenden el 3 % - 8 % de glicerol, el 0,2 % - 0,9 % de tensioactivos no iónicos y 1.200 – 3.000 ug/ml de BSA.

Las presentes enseñanzas incluyen tampones directos que comprenden Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, un 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, un 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, un 0,2 % - 0,9 % de tensioactivos no iónicos, 1.200 – 3.000 ug/ml de BSA y 0,101 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa.

En algunas realizaciones, los tensioactivos no iónicos pueden ser polisorbato (Tween, Tween 20), Triton-X 100 y similares.

Los reactivos usados en el tampón directo están disponibles comercialmente de proveedores comerciales. Por ejemplo, la ADN polimerasa está disponible comercialmente en Applied Biosystems. ADN polimerasas adecuadas incluyen las ADN polimerasas Pol A, Pol B, Pol C, Pol D, Pol X y Pol Y y una ADN polimerasa de tipo I, de tipo II y de tipo III. En general, se usa ADN polimerasas termoestables tales como Taq, Pfu, Vent™DeepVent™, 9<sup>o</sup> North™, en PCR. Las ADN polimerasas se pueden modificar para que sean inactivas antes del tratamiento posterior, por ejemplo calor; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.773.258 (ADN polimerasas modificadas químicamente), ADN polimerasas unidas a anticuerpo de la patente de EE.UU. 5.338.671. Los expertos en la técnica conocen ADN

polimerasas. Las ADN polimerasas incluyen polimerasas dependientes de ADN que usan ADN como molde o polimerasas dependientes de ARN, tales como transcriptasa inversa, que usan ARN como molde.

5 Basándose en la homología de secuencia, las ADN polimerasas bacterianas se pueden subdividir en siete familias diferentes: A, B, C, D, X, Y y RT. Las ADN polimerasas dependientes de ADN entran dentro de una de seis familias (A, B, C, D, X e Y), entrando la mayoría en una de tres familias (A, B y C). Véase, por ejemplo, Ito et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4045 - 4057; Braithwaite et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:787 - 802; Filee et al. (2002) *J. Mol. Evol.* 54:763 - 773; y Alba (2001) *Genome Biol.* 2:3002.1 - 3002.4. Determinadas ADN polimerasas pueden ser  
10 múltiples subunidades (p. ej., determinadas polimerasas de la familia C) teniendo una de las subunidades actividad polimerasa. *Id.* Una proteína de fusión puede comprender una ADN polimerasa seleccionada de una polimerasa de la familia A, B, C, D, X o Y.

15 Las polimerasas de la familia A ("Pol A") incluyen polimerasas tanto de replicación como de reparación. Los miembros replicativos de esta familia incluyen la ADN polimerasa de T7 y la ADN polimerasa  $\gamma$  mitocondrial eucariota. Entre las polimerasas de reparación se encuentran la ADN Pol I de *E. coli*, la Pol I de *Thermus aquaticus* (ADN polimerasa Taq) y Pol I de *Bacillus stearothermophilus*. La reparación por escisión y el procesamiento de los fragmentos de Okazaki generados durante la síntesis retardada de la hebra lo realizan las polimerasas de reparación. Dado que las enzimas Pol A más termoestables no poseen actividad exonucleasa 3' a 5', son incapaces  
20 de comprobar la hebra de ácido nucleico recién sintetizado y, en consecuencia, tienen tasas de error.

25 Las polimerasas de la familia B ("Pol B") son polimerasas sustancialmente replicativas, incluyendo las principales ADN polimerasas eucariotas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , así como la ADN polimerasa  $\zeta$ . Las polimerasas Pol B también incluyen las ADN polimerasas codificadas por algunas bacterias y bacteriófagos, de los cuales los mejores caracterizados son de los bacteriófagos T4, Phi29 y RB69. Las enzimas Pol B están implicadas en la síntesis de hebra principal y retardada y son notables por su excelente precisión durante la replicación, ya que muchas tienen una fuerte actividad exonucleasa 3'-5', siendo las excepciones las ADN polimerasas  $\alpha$  y  $\zeta$  que carecen de actividad de corrección.

30 BSA está disponible comercialmente en una serie de Fuentes, por ejemplo el número de catálogo 10711454001 de Roche. El papel FTA está disponible comercialmente en Whatman. En algunas realizaciones, el papel de FTA se usa en el presente documento con tinciones con sangre. Por ejemplo, Bloodstain Card de Whatman (nº de cat. WB 10 0014).

35 En algunas realizaciones, el papel FTA que contiene sangre o células bucales se corta para eliminar una región pequeña que contiene material biológico, por ejemplo una perforación circular de 0,5 mm a 1,2 mm de diámetro o de 1,0 - 1,5 mm de diámetro o de 1,5 - 2,0 mm de diámetro.

40 En algunas realizaciones, el papel se coloca directamente en la mezcla de PCR que comprende el tampón directo para la reacción de PCR. En algunas realizaciones no se requiere un lavado del papel FTA antes de colocar el papel FTA en el tampón directo.

45 En algunas realizaciones, cuando las células no se lisan inicialmente, por ejemplo cuando se usa papel que no es FTA, una solución de NaOH 5 - 25 mM se incuba con no FTA antes de mezclar con el tampón directo y realizar una reacción de PCR. En otras realizaciones, las células se pueden lisar mediante exposición a reactivos distintos a NaOH.

50 En algunas realizaciones, el tampón directo comprende además una pluralidad de pares de cebadores para PCR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tampón directo comprende 5 pares de cebadores. En algunas realizaciones, el tampón directo comprende 10 pares de cebadores. En algunas realizaciones, el tampón directo comprende más de 10 pares de cebadores. En algunas realizaciones, el tampón directo no comprende pares de cebadores para PCR, sino que los pares de cebadores para PCR se añaden a tiempos separados.

55 Algunas realizaciones de los métodos sujeto eliminan la necesidad de un procedimiento de purificación de las muestras antes de realizar la PCR. El mismo protocolo se puede aplicar a las muestras tanto de sangre como de células bucales sobre tarjetas FTA. Además, la manipulación de muestras físicas se reduce significativamente, por tanto, se puede prevenir la posible contaminación cruzada entre muestras, así como eliminar la posibilidad de errores humanos. En algunas realizaciones, la cantidad de tiempo requerida desde la tarjeta de FTA a perfiles de STR se puede reducir en al menos 11/2 horas. El método es compatible con los instrumentos de automatización actuales disponibles en el mercado forense. Los costes asociados con la purificación de ADN de FTA se pueden  
60 eliminar. La tasa de éxito de obtención de un perfil STR completo es comparable cuando se comparó con el método de preparación de muestras estándar tradicional.

65 Como se muestra en la Figura 1, una muestra de ADN genómico usada directamente con el kit Applied Biosystems Identifiler HID v.1 Kit proporciona un perfil de STR completo. No obstante, el perfil de STR es parcial o indetectable cuando se obtiene sangre de ADN genómico de la sangre transferida en un disco perforado en FTA (perforación de 1,2 mm) sin lavar el disco para eliminar los materiales que interfieren con los ensayos posteriores de las muestras,

por ejemplo perfil de STR mediante PCR directa, véanse las Figuras 2A - 2D.

Datos comparativos adicionales entre la invención reivindicada y un producto disponible comercialmente de otro revela, en todos los casos, que el tampón directo de la invención reivindicada proporciona un perfil de STR completo mediante PCR directa en 10 de 10 muestras de sangre trasferidas a papel FTA usando un perforación de 1,2 mm de tamaño (específicamente, las Figuras 3-12, electroferogramas marcados como "A"). Se observaron perfiles de STR completos con otro kit de STR en solo cuatro de 10 muestras analizadas (Figuras 3B, 4B, 7B y 8B), perfiles de STR parciales en cinco de las 10 muestras analizadas (Figuras 5B - 7B y 9B - 10B) y ningún perfil STR en una muestra (Figura 6B).

### Ejemplos

En un primer ejemplo se aplicó sangre a papel FTA (Whatman) y se secó al aire. Se realizó una perforación en disco de 0,5 mm del papel FTA y se colocó en el tampón directo que contiene cebadores para PCR del kit Identifier® Human Identity Kit disponible comercialmente (Applied Biosystems). Después se realizó la PCR.

En un segundo ejemplo se realizaron diluciones por 100 con tampón TE (Tris-Cl 10 mM y EDTA 0,1 mM a pH 8,0). Se usó 1 ul de sangre diluida para establecer una PCR en el tampón directo.

En un tercer ejemplo se recogieron muestras de frotis bucales y se introdujeron en 500 ul de tampón TE. La suspensión resultante se calentó a 97 °C durante 5 minutos. Se usaron 10 ul de la suspensión resultante para establecer una PCR en el tampón directo.

### Kits de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de las presentes enseñanzas

Las presentes enseñanzas proporcionan kits diseñados para la realización acelerada de determinados métodos. En algunas realizaciones, los kits sirven para acelerar el funcionamiento de los métodos de interés ensamblando dos o más componentes usados en la realización de los métodos. En algunas realizaciones, los kits pueden contener componentes en cantidades unitarias previamente medidas para minimizar la necesidad de mediciones por los usuarios finales. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir instrucciones para realizar uno o más métodos de las presentes enseñanzas. En determinadas realizaciones, los componentes del kit se optimizan para operar uno con otro.

Aunque las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas realizaciones de ejemplo y los datos experimentales, el experto entenderá fácilmente que se pueden realizar numerosas variaciones y modificaciones de estas realizaciones de ejemplo sin experimentación indebida.

Por tanto, en algunas realizaciones, las presentes enseñanzas proporcionan un kit que comprende una pluralidad de pares de cebadores, en los que cada par de cebadores flanquea un locus genómico que contiene una repetición corta en tándem (STR), y en un tampón directo, en el que el tampón directo comprende Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de tensioactivos no iónicos, 1200 - 3000 ug/ml de BSA y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa AmpliTaq Gold.

Dicho kit se puede usar, por ejemplo, en la identificación de un organismo tal como un ser humano mediante la recolección de microsatélites polimórficos analizados usando, por ejemplo, electroforesis capilar. Procedimientos ilustrativos para realizar dicha identificación humana se pueden hallar en, por ejemplo, el kit Identifier HID disponible comercialmente en Applied Biosystems, así como en las patentes de EE.UU. 6.221.598, 6.479.235, 5.843.660 y 7.008.771. En algunas realizaciones, los kits, métodos y mezclas de reacción proporcionados por las presentes enseñanzas se pueden usar con procedimientos para PCR multiplexada de muestras degradadas, como se encuentran en, por ejemplo, el documento WO05054515 de Dimsoski y Woo.

En algunas realizaciones, el tampón directo en el kit comprende 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 3 % - 8 % de glicerol, 1200 - 3000 ug/ml de BSA.

En algunas realizaciones, el tampón directo en el kit comprende además Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, 1.200 - 3.000 ug/ml de BSA y 0,101 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa AmpliTaq Gold.

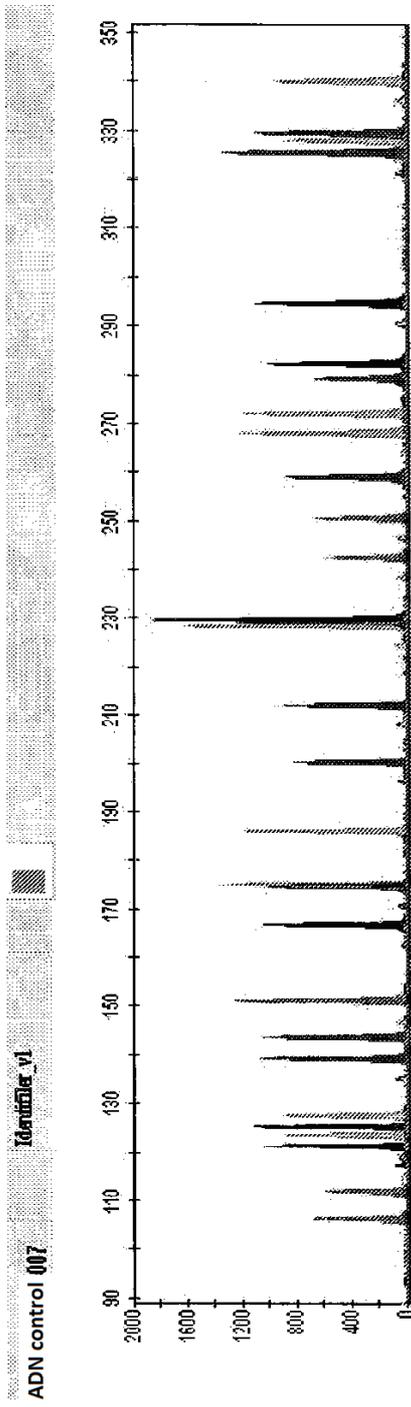
En algunas realizaciones, el tampón directo en las características del kit comprende NaOH 5 mM - 25 mM. En algunas realizaciones, el NaOH se suministra en un vial separado del tampón directo.

**REIVINDICACIONES**

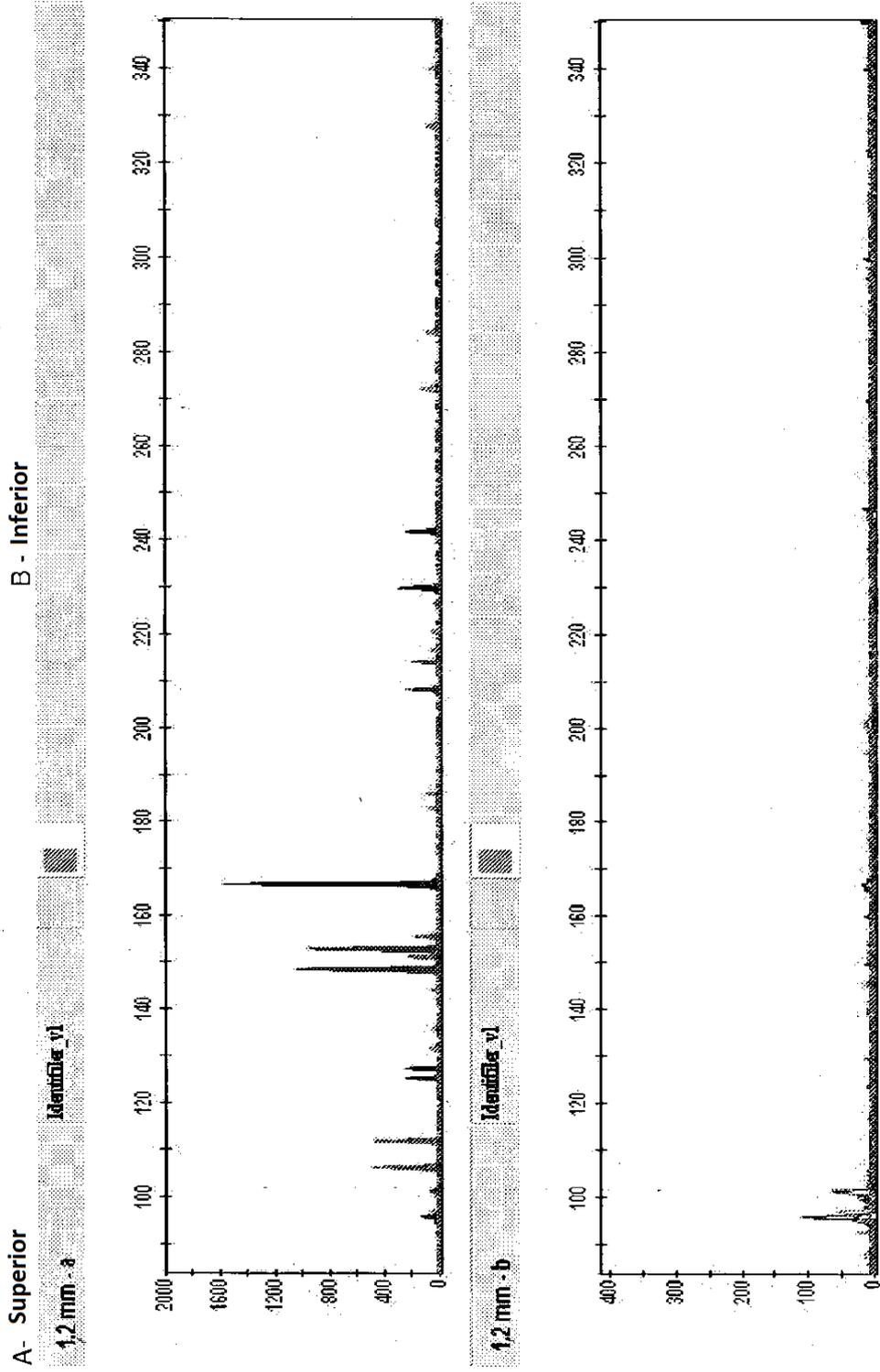
1. Un método que comprende:

- 5        proporcionar sangre sobre papel o un frotis bucal sobre papel, en donde el papel contiene un reactivo de lisis; colocar la sangre sobre papel o el frotis bucal sobre papel en un tampón directo para formar una solución que contiene ácido nucleico; y
- 10        realizar una PCR en la solución que contiene ácido nucleico, en donde el tampón directo comprende el 0,2 % - 0,9 % de polisorbato, el 3 % - 8 % de glicerol y 1000 - 3000 ug/ml de BSA.
- 15        2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tampón directo comprende además Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 100 - 350 uM de cada dNTP y 0,10 - 0,35 U/ul de ADN polimerasa.
- 15        3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polisorbato es polisorbato 20.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón directo comprende adicionalmente una pluralidad de pares de cebadores.
- 20        5. El método de la reivindicación 4, en el que se proporciona sangre humana o un frotis bucal humano, en el que cada par de cebadores flanquea un locus genómico que contiene una repetición corta en tándem, en el que la PCR se realiza con la solución que contiene ácido nucleico para formar una pluralidad de amplicones de PCR, en donde cada amplicón de PCR tiene un tamaño determinable; y el método comprende además identificar el ser humano con referencia al tamaño de los amplicones de PCR.
- 25        6. Una mezcla de reacción que comprende un tampón directo, sangre sobre papel o un frotis bucal sobre papel y una pluralidad de pares de cebadores, en donde el papel contiene un reactivo de lisis y en donde el tampón directo comprende Tris-HCl 10 - 50 mM (pH 8,3), KCl 30 - 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,4 - 2,4 mM, 0,01 % - 0,04 % de azida sódica, 3 % - 8 % de glicerol, 100 - 350 uM de cada dNTP, 0,2 % - 0,9 % de polisorbato 20, 1.200 - 3.000 ug/ml de BSA y 0,10 - 30        0,35 U/ul de ADN polimerasa.
7. El método de la reivindicación 1, en el que el papel es papel FTA.
8. La mezcla de la reivindicación 6, en donde el papel es papel FTA.
- 35        9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que proporcionar sangre sobre papel o un frotis bucal sobre papel comprende proporcionar un papel de FTA y transferir sangre o recolectar células bucales sobre el papel.

Figura 1



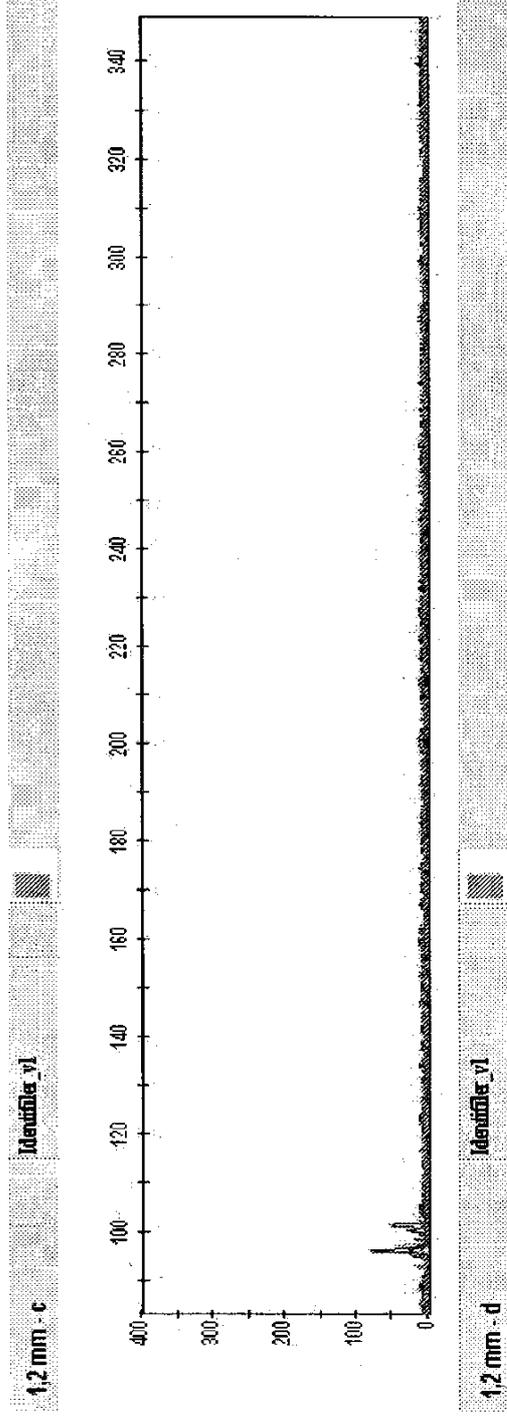
Figuras 2A y 2B



### Figuras 2C y 2D

C - Superior

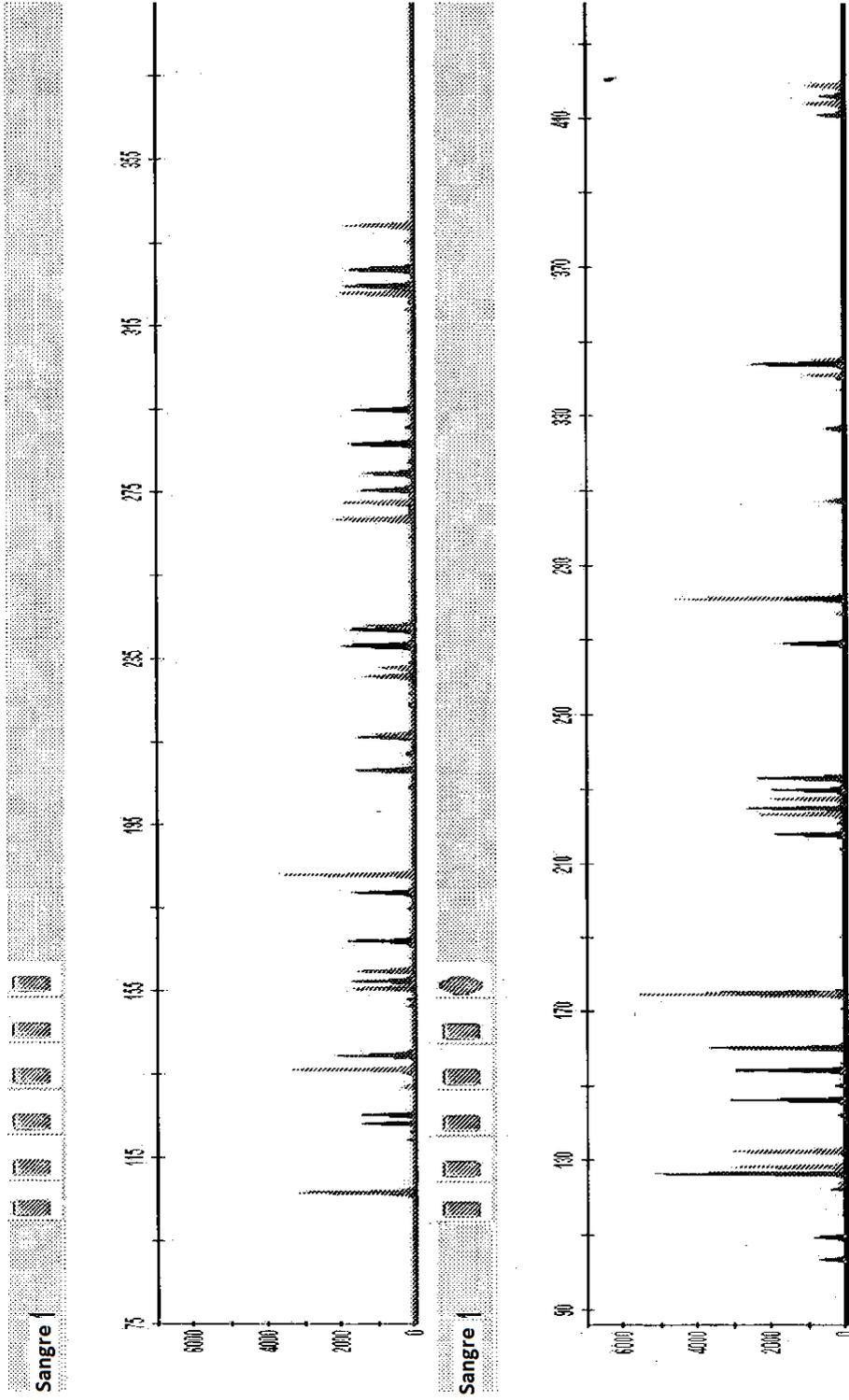
D - Inferior



Figuras 3A y 3B

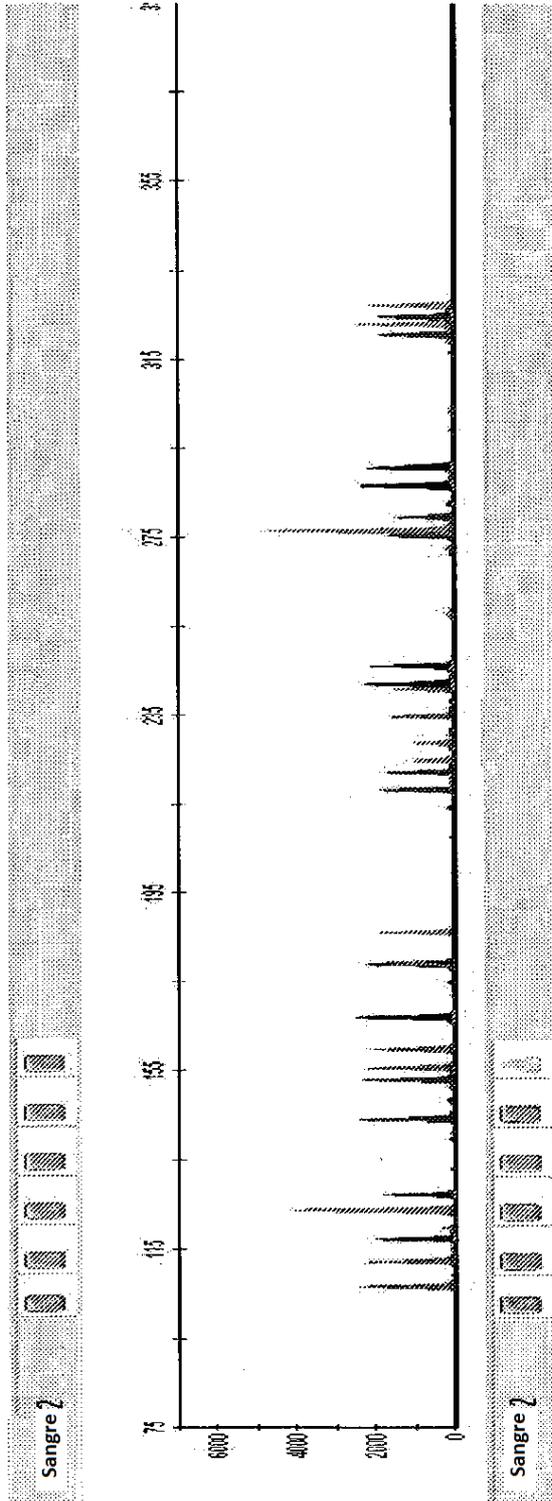
C - Superior

D - Inferior

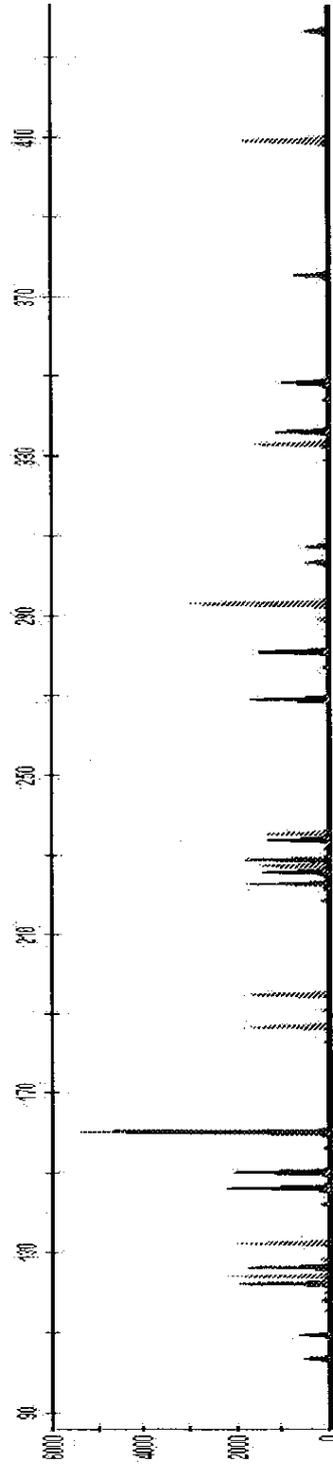


**Figuras 4A y 4B**

C - Superior



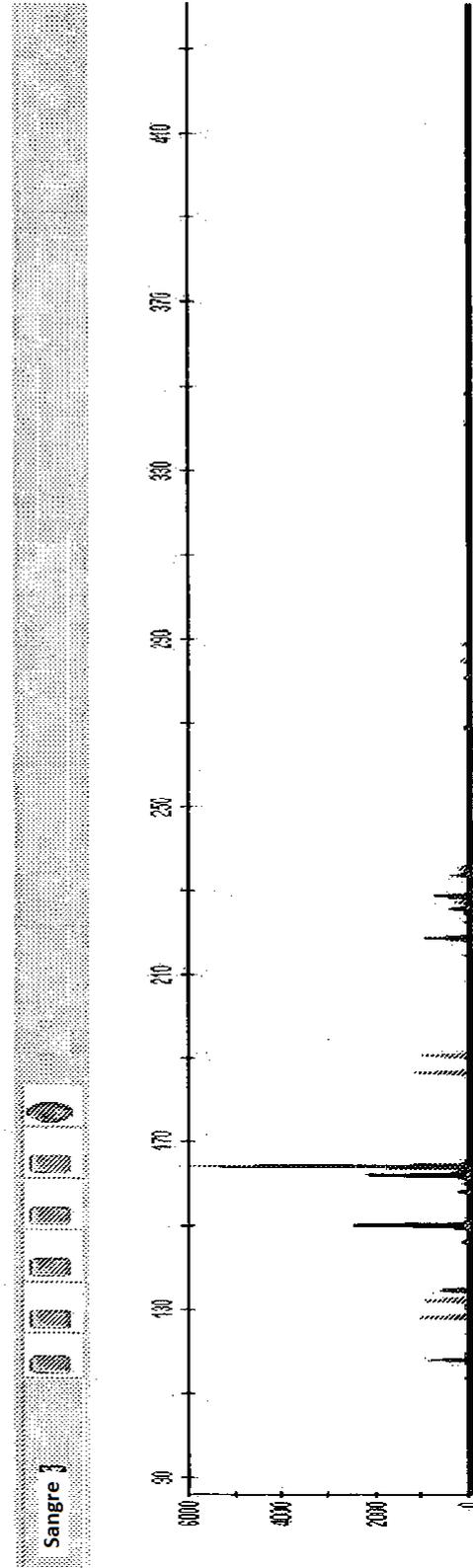
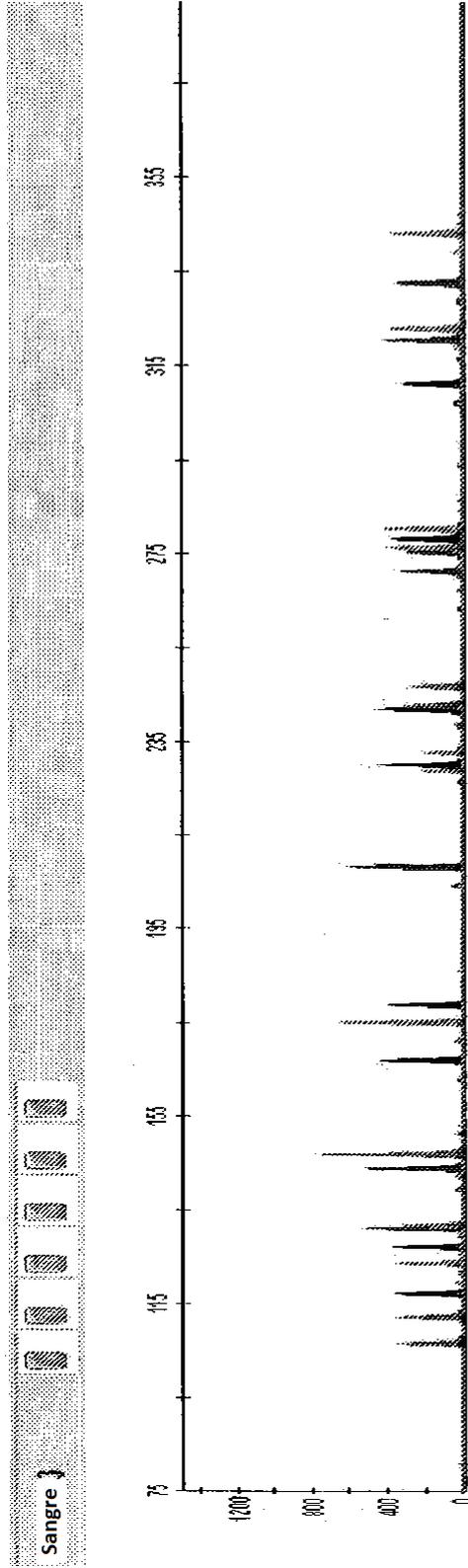
D - Inferior



# Figuras 5A y 5B

C - Superior

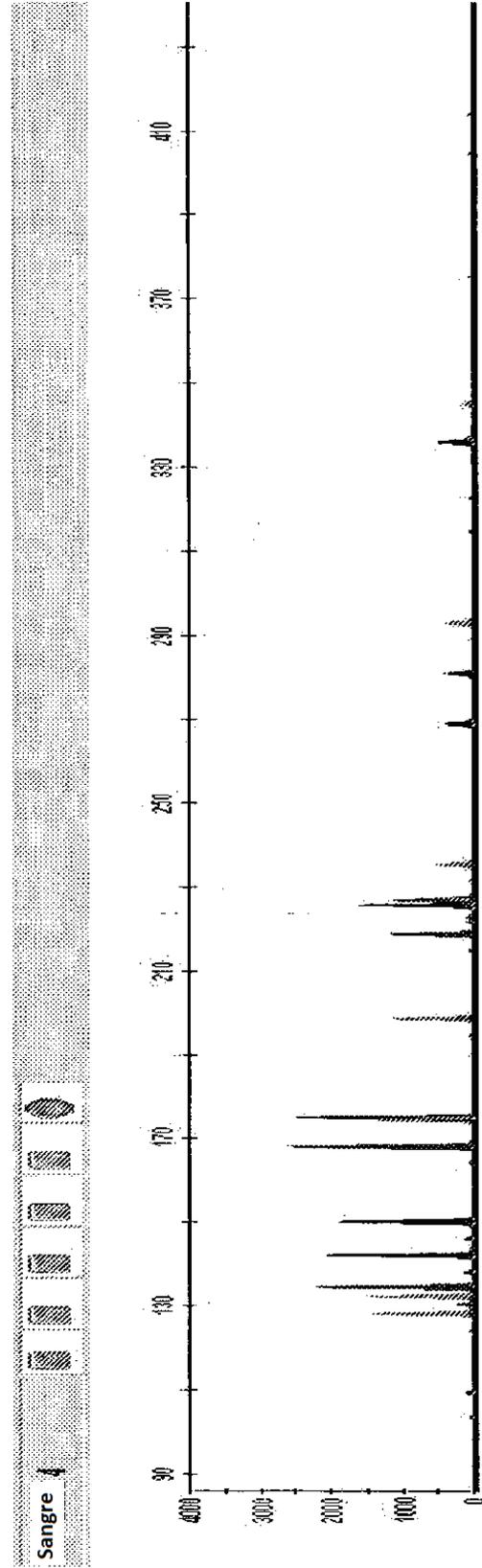
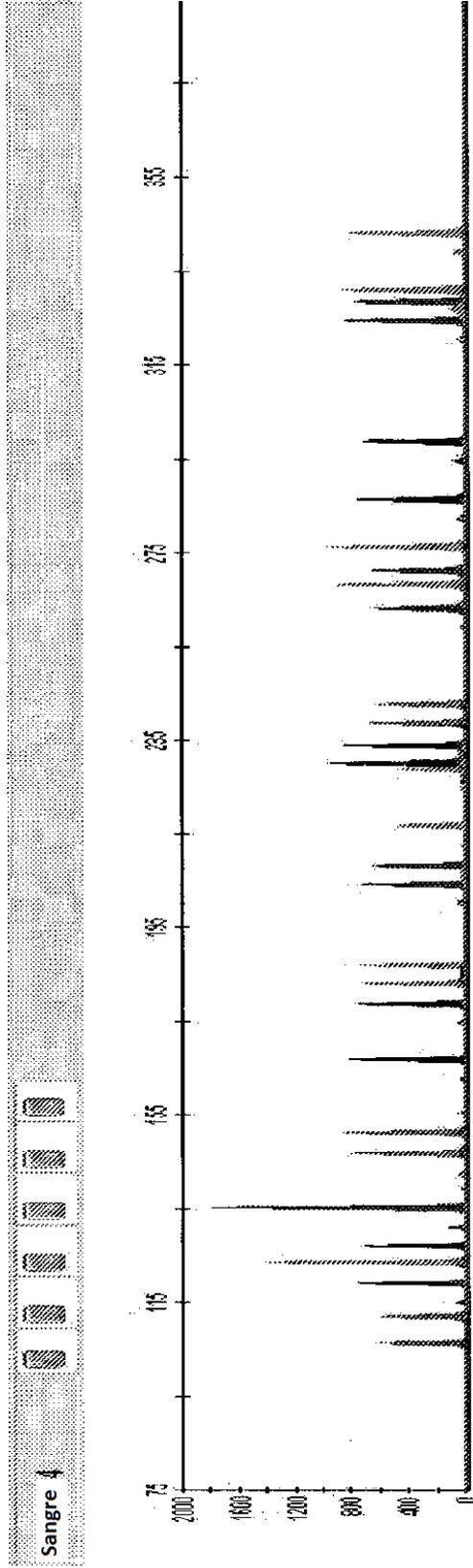
D - Inferior



# Figuras 6A y 6B

C - Superior

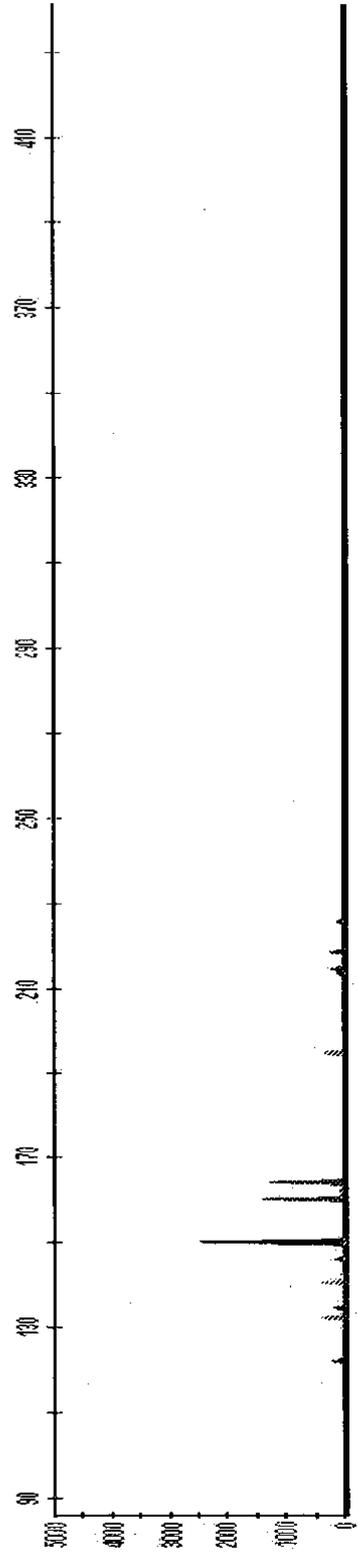
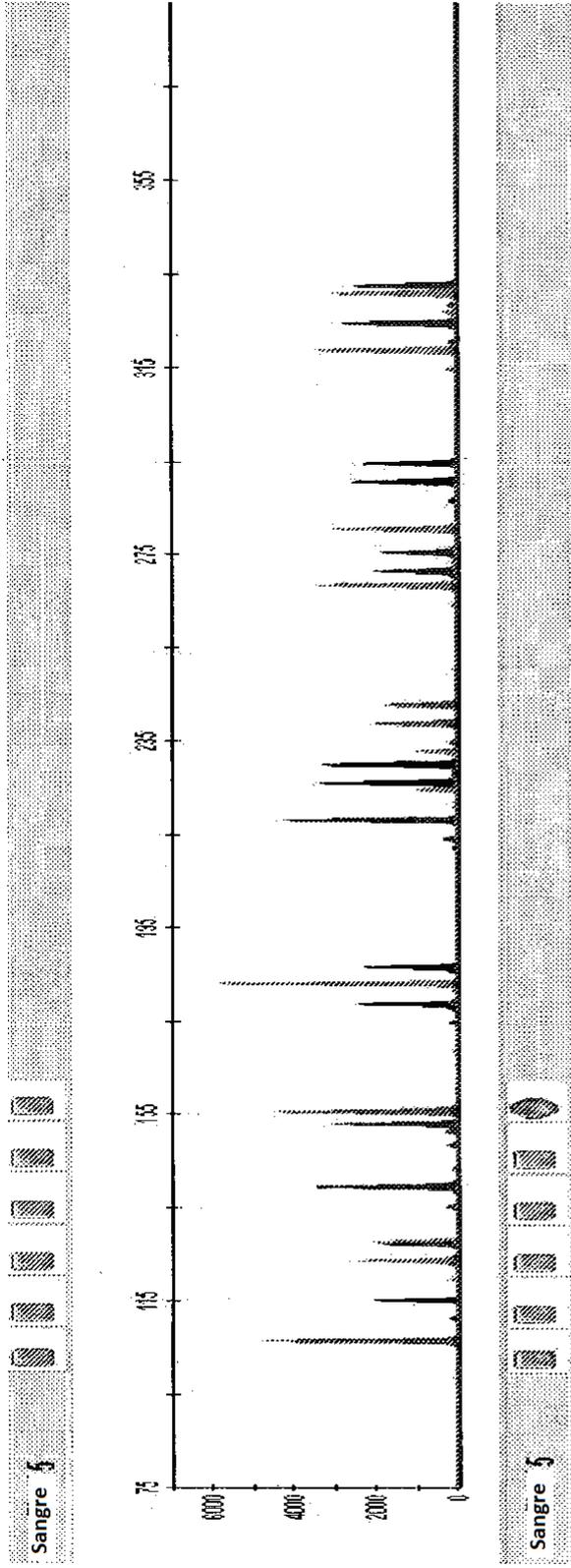
D - Inferior



# Figuras 7A y 7B

C - Superior

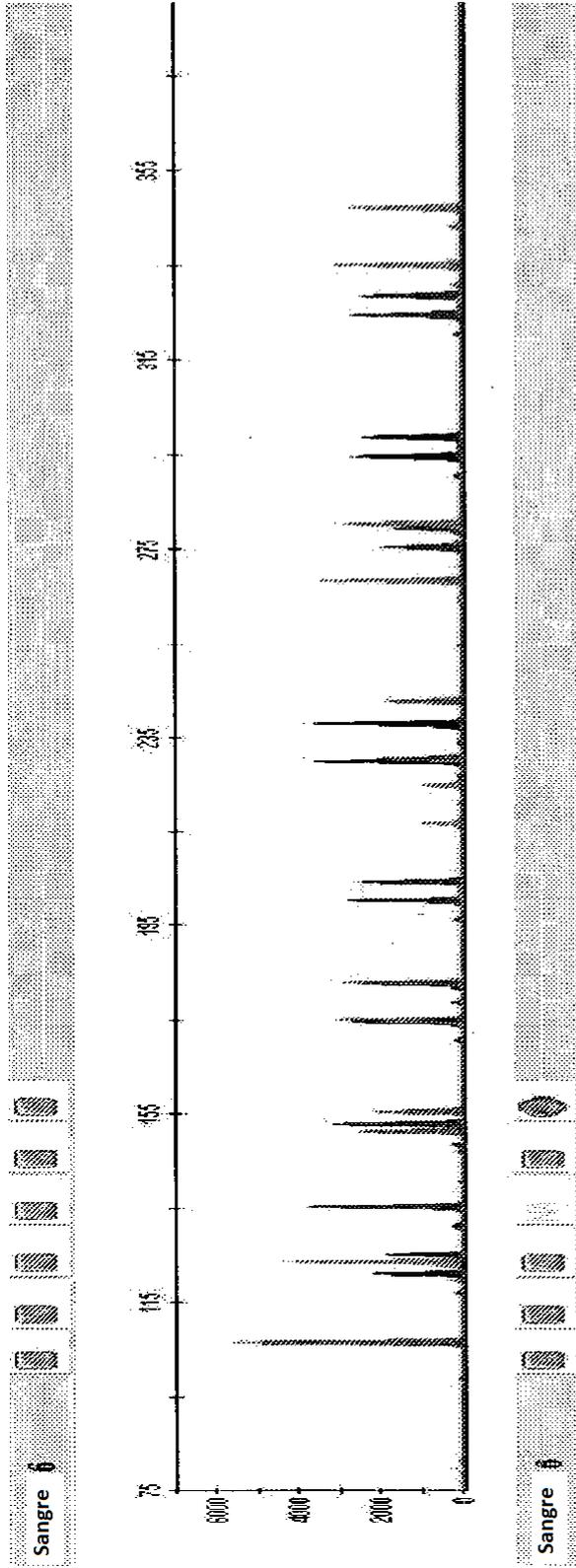
D - Inferior



# Figuras 8A y 8B

C - Superior

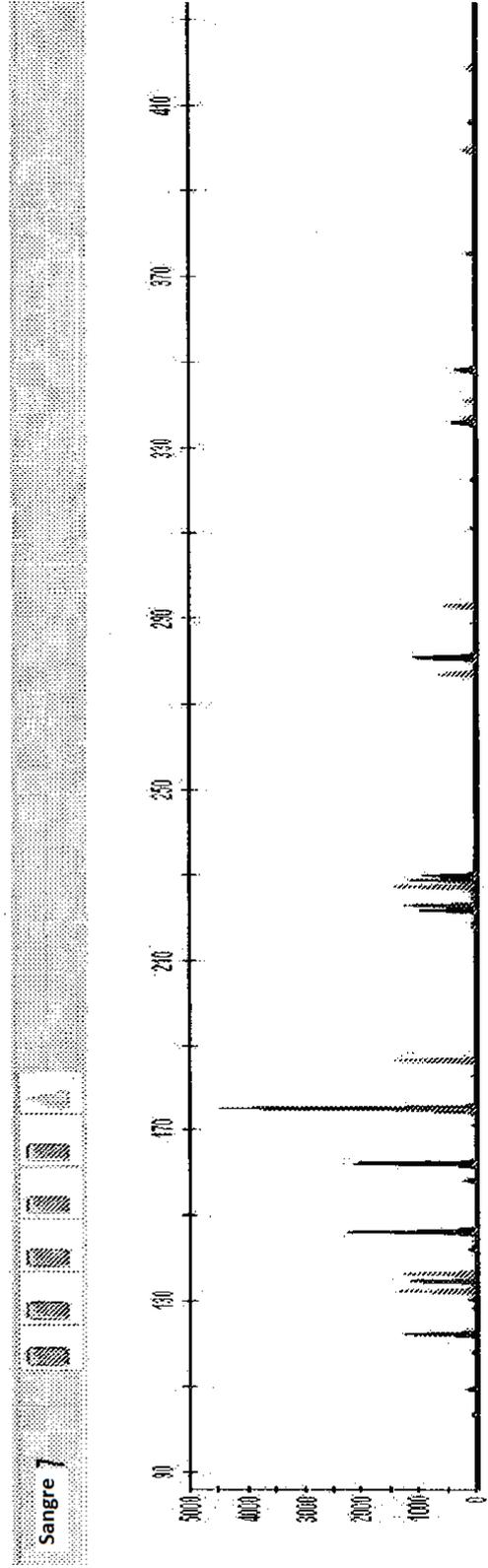
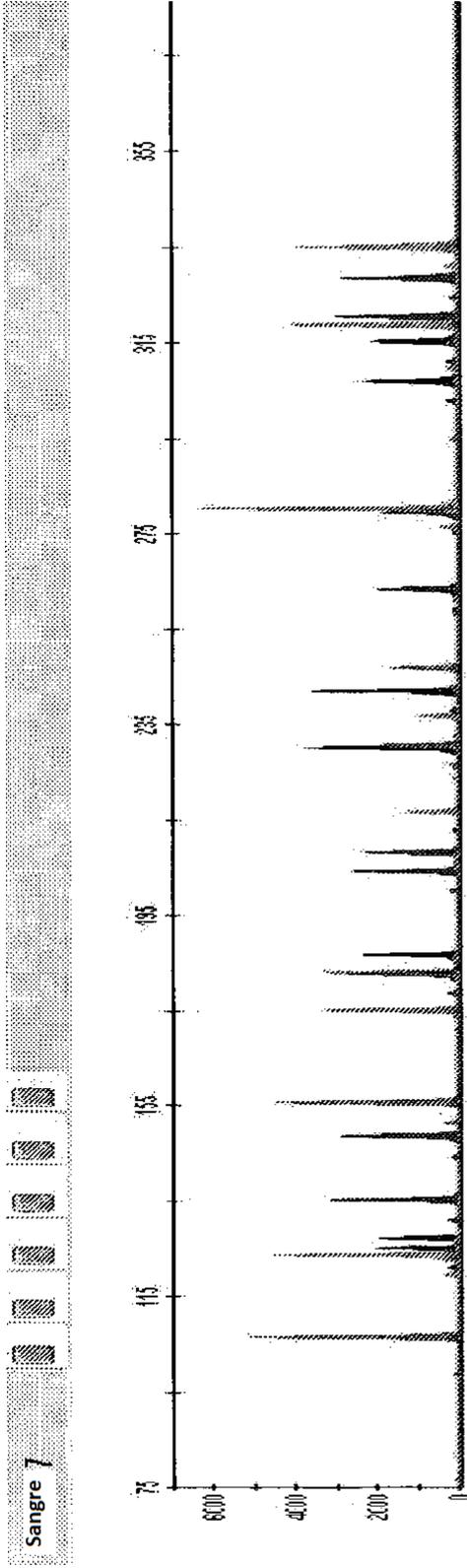
D - Inferior



# Figuras 9A y 9B

C - Superior

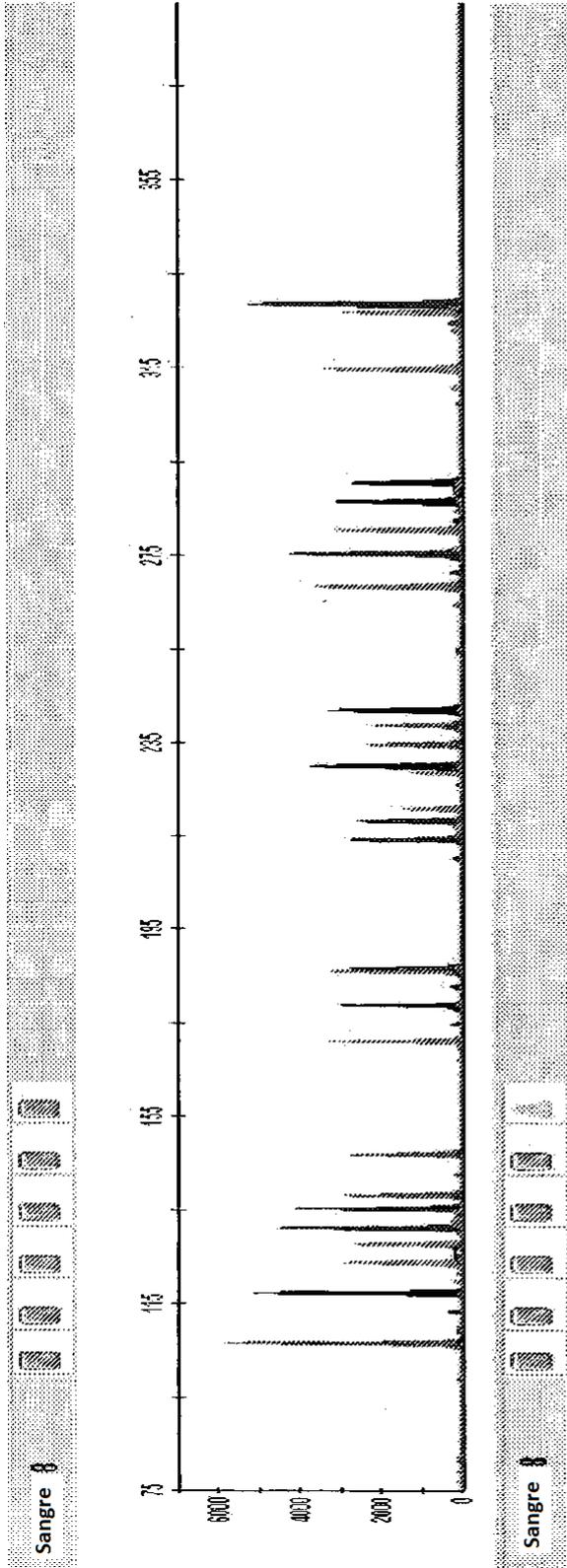
D - Inferior



**Figuras 10A y 10B**

C - Superior

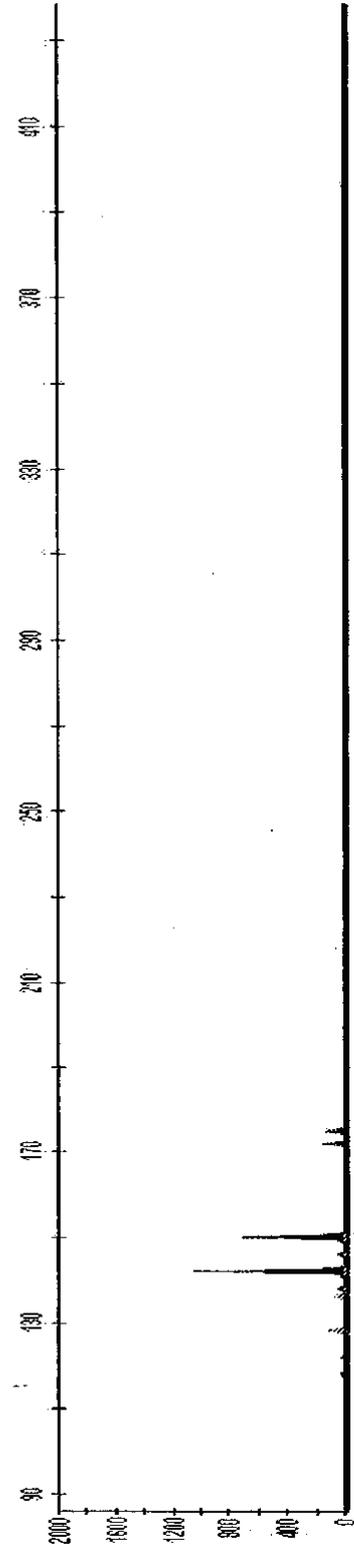
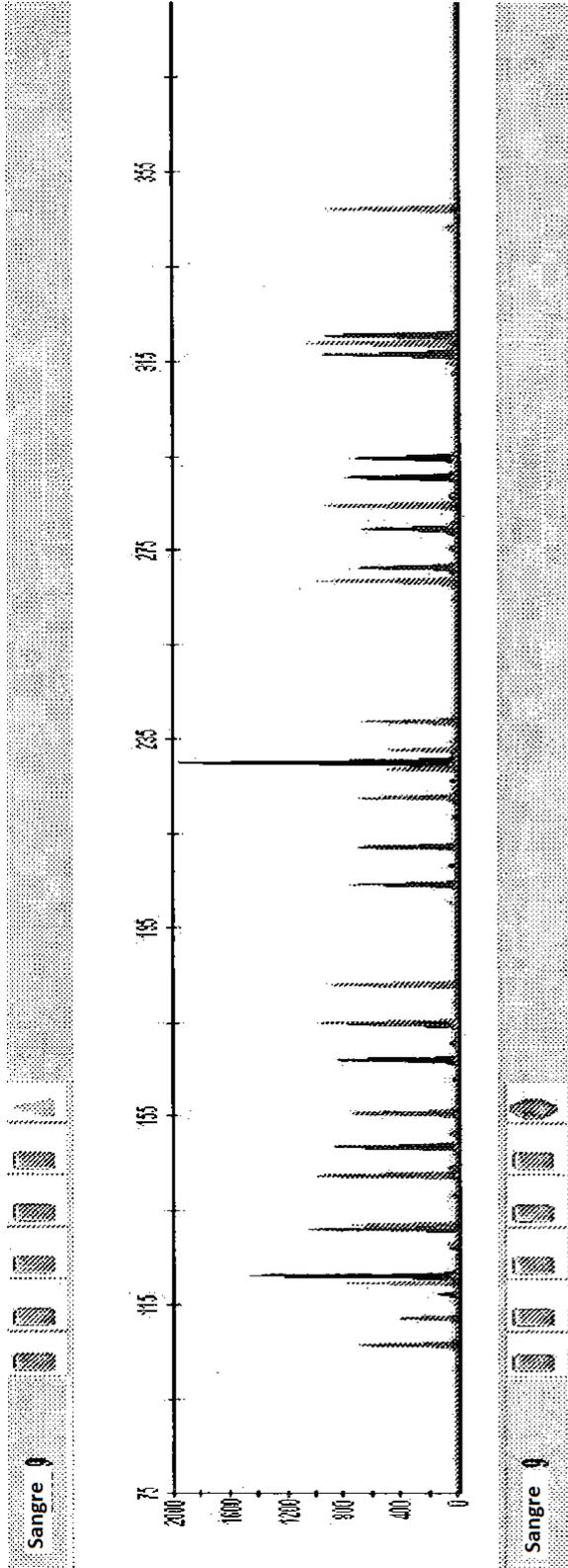
D - Inferior



# Figuras 11A y 11B

C - Superior

D - Inferior



**Figuras 12A y 12B**

C - Superior

D - Inferior

