

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 726**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2015 PCT/JP2015/082356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16080424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2015 E 15860324 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3222717**

54 Título: **Método de amplificación de ADN circular**

30 Prioridad:

18.11.2014 JP 2014233563

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

22.10.2020

73 Titular/es:

**ORICIRO GENOMICS, INC. (100.0%)
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8485, JP**

72 Inventor/es:

**SU'ETSUGU, MASAYUKI y
KOBAYASHI, HIROKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 788 726 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 de ADN circular

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de amplificación de ADN circular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método que permite la amplificación exponencial de ADN circular en un sistema libre de células.

10

Antecedentes de la técnica

La tecnología de clonación de ADN en la que se basó el desarrollo biotecnológico es una técnica para amplificar el ADN circular que se había preparado cortando y pegando fragmentos de ADN en forma de plásmido en células de *E. coli*, etc. Un uso de una tecnología de clonación de ADN que usa células para amplificar el ADN circular requiere procedimientos tediosos tales como el cultivo celular, extracción/purificación de productos amplificados y similares. Además, el ambiente para experimentar dicha clonación de ADN es limitado, ya que es necesario preparar organismos modificados genéticamente para realizar la clonación del ADN que usa células.

15

20

25

30

35

Un método común usado para amplificar el ADN *in vitro* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Sin embargo, una amplificación de ADN *in vitro* usando PCR no permite que el ADN circular se amplifique tal como es. Los métodos de amplificación *in vitro* del ADN circular incluyen la amplificación de círculo rodante (RCA, *Rolling Circle Amplification*) (Documento no de patente 1, Documento de patente 1, Documento de patente 2, Documento de patente 3). Sin embargo, si el ADN circular se va a amplificar usando la amplificación de círculo rodante, sería necesario diseñar un cebador específico para el ADN diana cada vez. Es más, el producto de amplificación que resulta directamente de la amplificación de círculo rodante es un ADN lineal, por tanto, sería necesario realizar una etapa de ciclación adicional para ciclar el producto de amplificación obtenido, tal como incubar con una enzima recombinante. Otro método informado es un método de obtención de un producto de replicación de monómero mediante la separación de un minicromosoma de *E. coli* (ADN circular de *oriC*) tras haber sido replicado (Documento no de patente 2), pero este método solo amplifica ADN circular de hasta aproximadamente 6 kpb. También hay un informe de reorganización de la replicación de minicromosomas de *E. coli* usando un grupo de enzimas purificadas derivadas de *E. coli* (Documento no de patente 3), pero no se conoce ningún método de amplificación exponencial de todo el ADN circular largo *in vitro* repitiendo ciclos de replicación en un solo tubo de ensayo.

Como se ha mostrado anteriormente, La amplificación del ADN circular usando la amplificación de ADN *in vitro* convencional era desventajosa porque requería que los cebadores se unieran con el ADN plantilla, producía ADN lineal como producto de amplificación y limitaba el tamaño del ADN que podía amplificarse a unas cuantas kb.

40

Se han propuesto métodos tales como el método SLIC y el método de ensamblaje de Gibson como tecnologías para la preparación de ADN largos, pero, en cualquier caso, la preparación final del ADN circular de cadena larga solo se puede realizar usando células (Documento no de patente 4). Se ha informado de un método que usa *Bacillus subtilis* como método de preparación de ADN circular de cadena larga mediante el uso de células (Documento no de patente 5).

45

En el Documento no de patente 6, se divulga una preparación de enzima/proteína de *E. coli* a la que se añade Topoisomerasa III. Este método no amplifica exponencialmente el ADN circular.

El Documento no de patente 7 describe un método de amplificación basado en PCR. El método no implica la amplificación a una temperatura constante y no usa los tres grupos de enzimas establecidos en las presentes reivindicaciones.

50

Listado de citas

DOCUMENTOS DE PATENTE

55

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa no examinada n.º 2005-229950
Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa no examinada n.º 2008-161182
Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa no examinada n.º 2012-501173

DOCUMENTOS NO DE PATENTE

60

Documento no patente 1: Fakruddin M *et al.*, *J Pharm Bioallied Sci.* 2013, 5: 245-252
Documento no patente 2: Peng H. y Mariani K. J. *PNAS.* 1993, 90: 8571-8575
Documento no patente 3: Kaguni J. M. y Kornberg A. *Cell.* 1984, 38:183-90
Documento no patente 4: Chao R. *et al.*, *FEMS YEAST Res.* 2014

65

Documento no patente 5: Tsuge *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31:e133
Documento no patente 6: Hiroshi *et al.*, *J. Bio. Chem.* 1994. Vol 269, n.º 3: 2093-9

Documento no patente 7: Chen *et al.*, *Nucl Acid Res* (1998) Vol 26, n.º 23.

Sumario de la invención

5 Problema técnico

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para amplificar fácil y exponencialmente ADN circular, en especial, ADN circular de cadena larga, en un sistema libre de células.

10 Solución del problema

Los presentes inventores realizaron amplios estudios para resolver el problema anterior, y descubrieron que el ciclo de "inicio de la replicación (desenrollado de la cadena doble de ADN)/elongación (progreso de la bifurcación de la replicación)/separación de los ADN hermanos replicados (descatenación)" se repite, y se proporciona una amplificación exponencial del ADN, cuando se mezcla el ADN circular que tiene una secuencia de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) con una solución de reacción que contiene los siguientes grupos de enzimas para formar una mezcla de reacción, que luego reacciona bajo en condición isotérmica, siendo los grupos de enzimas:

- 20 (1) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación del ADN circular;
 (2) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
 (3) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos.

- 25 En otras palabras, la presente invención, como se establece en las reivindicaciones, proporciona:
 Un método para amplificar exponencialmente ADN circular mediante la repetición de ciclos de replicación, que comprende una etapa de:

formar una mezcla de reacción compuesta de una solución de reacción que contiene

- 30 (a) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular;
 (b) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
 35 (c) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos; y ADN circular que constituye una plantilla, donde

el ADN circular incluye una secuencia de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) que puede unirse a una enzima que tiene actividad DnaA.

- 40 La invención proporciona además un kit para amplificar exponencialmente ADN circular que comprende:

- (a) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular;
 (b) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
 45 (c) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos, que es un grupo de enzimas que comprende al menos dos enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad topoisomerasa III, una enzima que tiene actividad topoisomerasa IV y una enzima que tiene actividad RecQ.

- 50 Otros aspectos y realizaciones adicionales se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Efectos ventajosos de la invención

- La presente invención proporciona un método para amplificar fácil y exponencialmente ADN circular, en especial, ADN circular de cadena larga, sin usar células de *E. coli* o vectores plasmídicos. La presente invención libera la amplificación del ADN circular de los ciclos de regulación de temperatura y los cebadores, y permite la amplificación del ADN circular de cadena larga que supera las 200 kb. Es más, el producto de amplificación obtenido mediante la presente invención es una copia que mantiene la estructura circular de la plantilla original. Mediante la adición de fragmentos de ADN al sistema de reacción una vez que los fragmentos de ADN se hayan ligado, la presente invención también permite la amplificación específica de solo el ADN que se cicló mediante ligamiento.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra un modelo del ciclo de replicación de la presente invención.
 65 La Figura 2 muestra la estructura del ADN ciclado mediante ligamiento *in vitro* usando el método de ensamblaje de Gibson.

La Figura 3 muestra el resultado de la detección del producto de amplificación en cada tiempo de reacción en un caso donde se usó un ADN circular de 9,6 kb como plantilla, el resultado de la detección obtenido mediante el uso de SyberGreen tras someter el producto a electroforesis en agarosa.

La Figura 4 muestra los resultados de detección de los productos de amplificación en un caso donde se usaron ADN circulares de cadena larga de 200 kb y 80 kb como plantillas, el resultado de la detección obtenido mediante el uso de SyberGreen tras someter el producto a electroforesis en agarosa. La Figura 4a muestra el resultado del producto de amplificación en cada tiempo de reacción en un caso donde se usó un ADN circular de cadena larga de 200 kb (15 pM, 20 ng) como plantilla. La Figura 4b muestra el resultado del producto de amplificación 3 h después de la reacción en un caso donde se usaron como plantillas ADN circulares de cadena larga de 80 kb (15 pM, 8 ng) y 200 kb (5 pM, 6,7 ng).

La Figura 5 muestra el resultado de la detección del producto de amplificación en un caso donde se usó como plantilla ADN ciclado mediante ligamiento *in vitro* usando el método de ensamblaje de Gibson, el resultado de la detección obtenido mediante el uso de SyberGreen tras someter el producto a electroforesis en agarosa.

La Figura 6 muestra el resultado del experimento de amplificación donde se usó como plantilla un ADN circular de 9,6 kb en una cantidad diminuta (a nivel de una molécula). La Figura 6a muestra el resultado de la detección del producto de amplificación en un caso donde se usó un ADN circular de 9,6 kb como plantilla, el resultado de la detección obtenido mediante el uso de SyberGreen tras someter el producto a electroforesis en agarosa. La Figura 6b es un gráfico que representa el resultado del nivel de amplificación cuantificando la cantidad de ADN del producto de amplificación usando el método PicoGreen o transformando *E. coli*.

La Figura 7 es un gráfico que representa el número de moléculas de ADN circulares amplificados correspondientes al tiempo de amplificación en un caso donde se usó un ADN circular de 9,6 kb como plantilla.

La Figura 8 es un diagrama que muestra el resultado de la prueba de amplificación de un solo clon de ADN circular en una mezcla. La Figura 8a es un esquema de una dilución de una mezcla de ADN circular. La Figura 8b muestra el resultado de la detección del producto de amplificación en un caso donde se amplificó una mezcla diluida de ADN circular, el resultado de la detección obtenido mediante el uso de SyberGreen tras someter el producto a electroforesis en agarosa.

La Figura 9 es un diagrama que muestra el resultado de la prueba de amplificación por pasos del ADN circular. La Figura 9a es un esquema del proceso experimental. La Figura 9b muestra el resultado en un caso donde se repitió una amplificación por pasos 10 veces diluyendo el producto de ADN tras la amplificación para formar una nueva solución de reacción, sometiendo luego la solución de nuevo a amplificación.

Descripción de realizaciones

<ADN circular>

El ADN circular que se usa como plantilla es preferentemente una cadena doble. El ADN circular usado como plantilla no se limita a uno en particular, siempre que incluya una secuencia de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) que pueda unirse a una enzima que tenga actividad DnaA, y los ejemplos incluyen ADN circular natural, tal como un cromosoma circular de microorganismos, ADN circular creado al ligar el ADN circular natural que había sido cortado mediante el procesamiento enzimático, etc. con otro fragmento de ADN y ciclando el producto ligado, y ADN circular que se había sintetizado artificialmente por completo. Con respecto a las secuencias de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) que pueden unirse a una enzima que tiene actividad DnaA (pueden denominarse en lo sucesivo simplemente "secuencia de origen de replicación"), secuencias de origen de replicación conocidas públicamente existentes en bacterias, tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc., se pueden obtener de una base de datos pública tal como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Si no, la secuencia de origen de replicación puede obtenerse clonando un fragmento de ADN que puede unirse a una enzima que tiene actividad DnaA y analizando su secuencia de bases.

El ADN circular que se usará como plantilla en la presente invención puede ser ADN circular que contenga una secuencia de origen de replicación desde el principio, o ADN circular que originalmente carezca de una secuencia de origen de replicación, pero que luego incorpore una secuencia de origen de replicación.

El ADN circular que se usa como plantilla en la presente invención puede incluir secuencias de genes marcadores que son resistentes a los fármacos, tales como la kanamicina, ampicilina, tetraciclina, etc. de acuerdo con el fin.

Es más, el ADN circular que se usa como plantilla en la presente invención puede estar en un estado purificado o puede estar en forma de una suspensión de extracción de cuerpos fúngicos que incluya ADN circular. Se puede usar un solo tipo de ADN circular como plantilla, pero también es posible usar una mezcla de varios tipos de ADN circulares, tales como una genoteca, en un tubo de ensayo como plantilla.

No hay límite para la cantidad de ADN de plantilla que se usará en una sola reacción, y se puede usar una sola molécula de ADN circular por reacción.

No hay límite para la longitud del ADN circular usado como plantilla en la presente invención, y la longitud puede ser 1 kb (longitud de 1.000 bases) o superior, 5 kb (longitud de 5.000 bases) o superior, 8 kb (longitud de 8.000 bases) o superior, 10 kb (longitud de 10.000 bases) o superior, 50 kb (longitud de 50.000 bases) o superior, 100 kb (longitud

de 100.000 bases) o superior, 200 kb (longitud de 200.000 bases) o superior, 500 kb (longitud de 500.000 bases) o superior, 1.000 kb (longitud de 1.000.000 bases) o superior, o 2.000 kb (longitud de 2.000.000 bases) o superior.

5 En la presente invención, los ADN circulares anteriores pueden usarse como plantillas, y pueden amplificarse hasta al menos 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1.000 veces, 2.000 veces, 3.000 veces, 4.000 veces, 5.000 veces o 10.000 veces.

<Primer, segundo y tercer grupo de enzimas>

10 La presente invención se refiere a someter una mezcla de reacción a una reacción isotérmica como se establece en las reivindicaciones, en la que la mezcla de reacción se compuso mezclando ADN circular que tiene una secuencia de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) con una solución de reacción que contiene los siguientes grupos de enzimas:

15 (1) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación del ADN circular;
 (2) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
 (3) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos.

20 Aunque no está limitada teóricamente, la presente invención repite el ciclo de replicación como se muestra en la Figura 1 y amplifica exponencialmente el ADN circular.

<(1) Primer grupo de enzimas que cataliza la replicación del ADN circular>

25 Un ejemplo de un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación del ADN circular es un grupo de enzimas establecido en Kaguni J. M. y Kornberg A. *Cell*. 1984, 38:183-90. Específicamente, los ejemplos del primer grupo de enzimas incluyen una enzima o grupo de enzimas seleccionado de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad DnaA, uno o más tipos de proteínas nucleoides, una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN girasa, proteína de unión monocatenaria (SSB, *Single-Strand Binding*), una enzima que tiene actividad ADN helicasa, una enzima que tiene actividad de carga de ADN helicasa, una enzima que tiene actividad ADN primasa, una enzima que tiene actividad de fijación de ADN, y una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN polimerasa III, o una combinación de dicha enzima o dicho grupo de enzimas.

35 El primer grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM. Preferentemente, el primer grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, o de 1 nM a 1,5 µM, pero sin limitación.

40 La enzima que tiene actividad DnaA no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad iniciadora que sea similar a la de DnaA, que es una proteína iniciadora de *E. coli*, y se puede usar preferentemente DnaA derivada de *E. coli*. La DnaA puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 50 nM a 200 nM, o de 50 nM a 150 nM, pero sin limitación.

45 Una proteína nucleoide es proteína del nucleoide. El uno o más tipos de proteína nucleoide usados en la presente invención no están particularmente limitados en su origen biológico siempre que tengan una actividad similar a la de la proteína nucleoide de *E. coli*, y se pueden usar preferentemente IHF derivada de *E. coli*, es decir, una combinación de IhfA e IhfB, y HU, es decir, un complejo de HupA y HupB. IHF o HU pueden estar contenidas en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

50 Una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN girasa no está particularmente limitado en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de la ADN girasa de *E. coli*, y preferentemente, se puede usar una combinación de GyrA y GyrB derivada de *E. coli*. Una combinación de GyrA y GyrB puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

60 Una proteína de unión monocatenaria (SSB) no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de la proteína de unión monocatenaria de *E. coli*, y preferentemente se puede usar SSB derivada de *E. coli*. La SSB puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 50 nM a 500 nM, o de 100 nM a 500 nM, pero sin limitación.

65 Una enzima que tenga actividad ADN helicasa no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de DnaB de *E. coli*, y preferentemente se puede usar DnaB derivada de *E. coli*. La

DnaB puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

5 Una enzima que tenga actividad de carga de ADN helicasa no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de DnaC de *E. coli*, y preferentemente se puede usar DnaC derivada de *E. coli*. La DnaC puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

10 Una enzima que tenga actividad ADN primasa no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de DnaG de *E. coli*, y preferentemente se puede usar DnaG derivada de *E. coli*. La DnaG puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 50 nM a 500 nM, o de 100 nM a 500 nM, pero sin limitación.

15 Una enzima que tenga actividad de fijación de ADN no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de DnaN de *E. coli*, y preferentemente se puede usar DnaN derivada de *E. coli*. La DnaN puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

20 Una enzima o un grupo de enzimas que tenga actividad ADN polimerasa III* no está particularmente limitado en su origen biológico siempre que sea una enzima o un grupo de enzimas que tenga una actividad similar a la del complejo de ADN polimerasa III* de *E. coli*, y preferentemente se puede usar una combinación de DnaX, HolA, HolB, HolC, HolD, DnaE, DnaQ y HolE derivados de *E. coli*. Un complejo de ADN polimerasa III* puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 100 nM, o de 1 nM a 50 nM, pero sin limitación.

25 30 <(2) Segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano>

35 En la presente invención, los dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano y que son dos ADN circulares sintetizados por replicación de ADN, se unieron luego.

Los ejemplos de segundos grupos de enzimas que catalizan la maduración de un fragmento Okazaki y sintetizan dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano incluyen una enzima o una combinación de enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad RNasa H, una enzima que tiene actividad ADN polimerasa I y una enzima que tiene actividad ADN ligasa.

40 El segundo grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM. Preferentemente, el segundo grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 50 nM a 200 nM, pero sin limitación.

45 Una enzima que tiene actividad RNasa H no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad que descomponga una cadena de ARN en un híbrido de ARN:ADN, y preferentemente se puede usar una RNasa H derivada de *E. coli*. La RNasa H puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

50 Una enzima que tenga actividad ADN polimerasa I no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de ADN polimerasa I de *E. coli*, y preferentemente se puede usar ADN polimerasa I derivada de *E. coli*. La ADN polimerasa I puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

55 Una enzima que tenga actividad ADN ligasa no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de ADN ligasa de *E. coli*, y preferentemente se puede usar ADN ligasa derivada de *E. coli*. La ADN ligasa puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

60 65 <(3) Tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanas>

Un ejemplo de un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos es un grupo de enzimas establecido en Peng y Marians 1993 *PNAS*. Específicamente, los ejemplos del tercer grupo de enzimas incluyen una enzima o una combinación de enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad topoisomerasa IV, una enzima que tiene actividad topoisomerasa III y una enzima que tiene actividad RecQ.

El tercer grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM. Preferentemente, el tercer grupo de enzimas puede estar contenido en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 50 nM a 200 nM, pero sin limitación.

Una enzima que tenga actividad topoisomerasa IV no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la topoisomerasa IV de *E. coli*, y preferentemente se puede usar la topoisomerasa IV derivada de *E. coli*, que es un complejo de ParC y ParE. La topoisomerasa IV puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 100 nM, o de 1 nM a 50 nM, pero sin limitación.

Una enzima que tenga actividad topoisomerasa III no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de topoisomerasa III de *E. coli*, y preferentemente se puede usar topoisomerasa III derivada de *E. coli*. La topoisomerasa III puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

Una enzima que tenga actividad RecQ no está particularmente limitada en su origen biológico siempre que tenga una actividad similar a la de RecQ de *E. coli*, y preferentemente se puede usar RecQ derivada de *E. coli*. La RecQ puede estar contenida en la solución de reacción en una cantidad de 1 nM a 10 µM, preferentemente, en una cantidad de 1 nM a 5 µM, de 1 nM a 3 µM, de 1 nM a 1,5 µM, de 1 nM a 1,0 µM, de 1 nM a 500 nM, de 1 nM a 200 nM, o de 1 nM a 100 nM, pero sin limitación.

Lo más preferentemente, Se pueden usar las siguientes combinaciones: para el primer grupo de enzimas, una combinación de DnaA, IHF, GyrA y GyrB, SSB, DnaB y DnaC, DnaG, DnaN y pol III*, todas derivadas de *E. coli*; para el segundo grupo de enzimas, una combinación de RNasa H, ADN polimerasa I y ADN ligasa, todas derivadas de *E. coli*; y para el tercer grupo de enzimas, una combinación de topoisomerasa IV, topoisomerasa III y RecQ, todas derivadas de *E. coli*. Es más, las siguientes concentraciones se dan como ejemplos de concentraciones preferibles en caso de que se usen las combinaciones anteriores de grupos de enzimas, sin limitación.

[Tabla 1]

Primer grupo de enzimas	DnaA	100 nM
	IHF	40 nM
	GyrA, GyrB	50 nM
	SSB	400 nM
	DnaB, DnaC	20 nM
	DnaG	400 nM
	DnaN	40 nM
	PolIII*	5 nM
Segundo grupo de enzimas	RNasa H	10 nM
	Poll	50 nM
	Ligasa	50 nM
Tercer grupo de enzimas	Topo IV	5 nM
	Topo III	50 nM
	RecQ	50 nM

El primer, segundo y tercer grupo de enzimas dados anteriormente pueden ser aquellos que están disponibles en el mercado, o pueden extraerse de microorganismos y purificarse según sea necesario. La extracción y purificación de enzimas a partir de microorganismos se puede realizar según sea necesario usando medios que están disponibles

para un experto en la materia.

5 La solución de reacción que contiene sistemas de expresión de proteínas libres de células de las enzimas mencionadas anteriormente se puede mezclar tal cual con el ADN circular que constituye una plantilla para formar una mezcla de reacción para amplificar exponencialmente el ADN circular.

10 El sistema de expresión de proteínas libre de células puede ser un sistema de traducción libre de células que comprenda un ARN total que contenga ARN que consista en una secuencia que sea complementaria a la secuencia de bases de genes codificantes de las enzimas anteriores, ARNm o producto de transcripción *in vitro* como el ARN plantilla, o puede ser un sistema de transcripción/traducción libre de células que comprenda genes codificantes de diferentes enzimas o vectores de expresión, incluyendo genes codificantes de diferentes enzimas como el ADN plantilla.

15 <Método de amplificación del ADN circular>

El método de la presente invención incluye una etapa de formación de una mezcla de reacción de una solución de reacción que contenga el primer y el tercer grupo de enzimas y el ADN circular que constituye una plantilla.

20 La constitución de la solución de reacción que contiene el primer y el tercer grupo de enzimas no está particularmente limitada siempre que permita que progrese la replicación del ADN, y se puede usar una solución que consista en rNTP, dNTP, fuente de iones de magnesio, fuente de ATP, etc. añadida a un tampón tal como tampón de Tris-ácido clorhídrico y que incluya del primer al tercer grupo de enzimas. Además, la solución de reacción anterior también puede incluir constituyentes adicionales, tales como un componente para prevenir o reducir el desarrollo de subproductos. Las soluciones de reacción específicas incluyen aquellas establecidas en los ejemplos que se presentan a continuación.

30 El método de la presente invención incluye además una etapa de retención de la temperatura de la mezcla de reacción bajo una condición isotérmica. La condición isotérmica no está particularmente limitada siempre que permita que progrese la replicación del ADN, y la temperatura se puede establecer a una temperatura constante en un intervalo de 20 °C a 80 °C, que es una temperatura óptima de la ADN polimerasa, o una temperatura constante en un intervalo de 25 °C a 50 °C, o de aproximadamente 30 °C. El tiempo que se retiene la temperatura puede establecerse adecuadamente de acuerdo con la cantidad diana de producto de amplificación de ADN circular, por ejemplo, 1 a 24 h.

35 El método de la presente invención puede incluir una etapa de purificación del producto de amplificación de ADN circular tras la etapa de retención de la temperatura de la mezcla de reacción bajo una condición isotérmica según se requiera de acuerdo con el fin. La purificación del ADN circular se puede realizar según sea necesario usando medios disponibles para un experto en la materia.

40 El ADN circular que se había amplificado usando el método de la presente invención puede usarse para fines posteriores, tales como la transformación, en forma de una mezcla de reacción tras la reacción tal cual, o en una forma purificada de la mezcla de reacción.

45 <Composición o kit para amplificar ADN circular>

50 La presente divulgación se refiere a una composición para amplificar ADN circular que comprende un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular; un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos. La composición puede incluir constituyentes adicionales, tales como un estabilizante, un agente reductor, un tampón de reacción, etc. siempre que no inhiban el efecto de la presente invención.

55 La presente invención también se refiere a un kit para amplificar exponencialmente ADN circular que comprende un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular; un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos, que es un grupo de enzimas que comprende al menos dos enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad topoisomerasa III, una enzima que tiene actividad topoisomerasa IV y una enzima que tiene actividad RecQ. El kit de la presente invención puede incluir una mezcla de las enzimas anteriores acondicionadas en un envase, pero también puede incluir enzimas individuales acondicionadas en envases separados o varias enzimas mezcladas con cada mezcla acondicionada en un envase separado.

65 Además, la presente divulgación se refiere a un kit para amplificar ADN circular que comprende sistemas de expresión de proteínas libres de células de enzimas que pertenecen al primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular; el segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y el tercer grupo de enzimas que cataliza una

separación de dos ADN circulares hermanos.

El kit de la presente invención puede incluir componentes adicionales tales como un tampón de reacción condensado o el tampón de reacción, según lo requiera el fin.

5

Ejemplos

La presente invención se explica específicamente basándose en los EJEMPLOS. Cabe señalar que la presente invención no se limita al intervalo establecido en los siguientes ejemplos.

10

EJEMPLO 1: Amplificación de ADN circular

<Ingrediente y método>

15

Tras añadir el ADN plantilla a la solución de reacción de la constitución que se muestra en la Tabla 1 y mezclarlos en hielo, se retuvo la temperatura a 30 °C durante 1 h, 2 h o 3 h con una incubadora. Se preparó la mezcla de manera que el volumen total para cada reacción fuera de 10 microlitros. Tras llevar a cabo la reacción a 30 °C, se sometió el producto de reacción a electroforesis en agarosa (1 x TAE al 0,5 %, 150 V, 100 min., 14 °C), luego se detectó ADN usando SyberGreen (Takara Bio Inc.).

20

[Tabla 2]

Tampón de reacción	
Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
Ditiotreitol	8 mM
glutamato de potasio	150 mM
Mg(OAc) ₂	10 mM
fosfato de creatina	4 mM
rNTP	Cada uno 1 mM
NAD	0,2 mM
sulfato de amonio	10 mM
ARNt	50 µg/ml
albúmina de suero bovino (BSA, <i>Bovine Serum Albumin</i>)	0,1 mg/ml
dNTP	Cada uno 0,1 mM
creatina quinasa	20 µg/ml
Grupo de enzimas	
SSB	400 nM
IHF	40 nM
DnaG	400 nM
DnaN	40 nM
PolIII*	5 nM
DnaB, DnaC	20 nM
DnaA	100 nM
RNasa H	10 nM
Ligasa	50 nM
Poll	50 nM
GyrA, GyrB	50 nM
Topo IV	5 nM
Topo III	50 nM
RecQ	50 nM

En la tabla, SSB indica SSB derivada de *E. coli*, IHF indica una combinación de IhfA e IhfB derivadas de *E. coli*, DnaG indica DnaG derivada de *E. coli*, DnaN indica DnaN derivada de *E. coli*, PolIII* indica el complejo de ADN polimerasa III* que consiste en una combinación de DnaX, HoiA, HoiB, HoiC, HoiD, DnaE, DnaQ y HoiE, DnaB indica DnaB derivada de *E. coli*, DnaC indica DnaC derivada de *E. coli*, DnaA indica RNasa H derivada de *E. coli*,

25

ligasa indica ADN ligasa derivada de *E. coli*, Poll indica ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, GyrA indica GyrA derivada de *E. coli*, GyrB indica GyrB derivada de *E. coli*, Topo IV indica una combinación de ParC y ParE derivadas de *E. coli*, Topo III indica topoisomerasa III derivada de *E. coli*, y RecQ indica RecQ derivada de *E. coli*.

5 SSB se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba SSB por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de intercambio iónico.

IHF se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba conjuntamente IhfA e IhfB por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad.

10 DnaG se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba DnaG por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía en columna de intercambio aniónico y cromatografía en columna de filtración en gel.

15 DnaN se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba DnaN por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de intercambio aniónico.

20 PolIII* se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba conjuntamente DnaX, HolA, HolB, HolC, HolD, DnaE, DnaQ y HolE por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad y cromatografía en columna de filtración en gel.

25 DnaB y DnaC se prepararon purificando una cepa de *E. coli* que expresaba conjuntamente DnaB y DnaC por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad y cromatografía en columna de filtración en gel.

DnaA se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba DnaA por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, precipitación de diálisis y cromatografía en columna de filtración en gel.

30 GyrA y GyrB se prepararon purificando una mezcla de una cepa de *E. coli* que expresaba GyrA y una cepa de *E. coli* que expresaba GyrB por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad y cromatografía en columna de filtración en gel.

35 Topo IV se preparó purificando una mezcla de una cepa de *E. coli* que expresa ParC y una cepa de *E. coli* que expresa ParE por etapas que incluyen precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad y cromatografía en columna de filtración en gel.

Topo III se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba Topo III por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad.

40 RecQ se preparó purificando una cepa de *E. coli* que expresaba RecQ por etapas que incluían precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad y cromatografía en columna de filtración en gel.

Se usaron las enzimas disponibles en el mercado derivadas de *E. coli* para RNasa H, Ligasa y Poll (Takara Bio Inc.).

45 Como ADN plantilla, se usaron un ADN circular de 9,6 kb (ADN circular que tenía una secuencia de origen de replicación *oriC*, resistencia a la kanamicina (Km)), un ADN circular de cadena larga de 80 kb (ADN circular que tenía una secuencia de origen de replicación *oriC*, resistencia a la kanamicina (Km)), un ADN circular de cadena larga de 200 kb (ADN circular que tenía una secuencia de origen de replicación *oriC*, resistencia a la kanamicina (Km)) o un ADN ciclado mediante ligamiento *in vitro*.

50 El ADN circular de 9,6 kb y los ADN circulares de cadena larga de 80 kb y 200 kb se prepararon mediante recombinación *in vivo* en células de *E. coli*. Específicamente, se realizó una recombinación *in vivo* usando *E. coli* que expresaba un grupo de proteínas de recombinación de fago λ para preparar ADN circular de una longitud deseada que incluía un casete de resistencia a kanamicina y una región en el cromosoma de *E. coli* que incluía *oriC*.

55 En la Figura 2, se muestra un método de preparación de ADN circular mediante ligamiento *in vitro*. Específicamente, se ligó un fragmento de PCR (2,3 kb) que tenía una secuencia de origen de replicación *oriC* y una región que tenía resistencia a la kanamicina (Km) con un fragmento de PCR que tenía secuencias del gen *dnaA* y del gen *dnaN* (en lo sucesivo, denominado fragmento *dnaA-dnaN*) (2,6 kb) mediante una reacción usando el método de ensamblaje de Gibson. Los dos fragmentos de PCR se ligaron a través de secuencias homólogas de 20 bases (denominadas H1, H2) unidas a ambos extremos para formar una estructura circular. La reacción se realizó mezclando los dos fragmentos de PCR anteriores con Mezcla Maestra de Ensamblaje de Gibson (NEB) y dejando que la mezcla reaccionara a 50 °C durante 15 min. Tras la reacción, se usaron 0,1 microlitros de la solución de reacción (1 microlitro de la solución de reacción diluida a 10 veces) como el ADN plantilla que se agregaría directamente a un sistema de reacción de amplificación de 10 microlitros (constitución de la Tabla 2), y la mezcla se hizo reaccionar a 30 °C durante 1 h.

<Resultado 1> Caso usando ADN circular de 9,6 kb (0,08 ng, aproximadamente 10^7 moléculas circulares) como plantilla

5 La Figura 3 muestra el resultado de la detección del producto de amplificación usando SyberGreen.

Se confirmó el producto de amplificación de ADN circular que tenía una estructura de superenrollamiento (indicado por un recuadro negro), así como un subproducto (un producto intermedio de reacción).

10 La cantidad de amplificación de ADN circular se obtuvo transformando una cepa de DH5 α de *E. coli* usando la solución tras la reacción tal cual, cultivando la cepa en un agar que contenía kanamicina y midiendo el número de colonias, y el resultado se muestra en la Tabla 3. Se usó como control una solución de reacción cuya temperatura se había retenido durante 0 h.

15 [Tabla 3]

Tiempo de retención de la temperatura	0 h.	3 h.
Producto de transformación (n.º de colonias)	9	$5,4 \times 10^4$

El método de la presente invención permitió la amplificación de un ADN circular de 9,6 kb hasta 6.000 veces del ADN circular.

20 <Resultado 2> Caso usando ADN circulares de cadena larga de 80 kb y 200 kb como plantillas

La Figura 4 muestra el resultado de la detección de un producto de amplificación obtenido usando SyberGreen.

25 Se confirmó el producto de amplificación del ADN circular que tenía una estructura de superenrollamiento (indicada por un recuadro negro o una flecha).

El método de la presente invención mostró que se puede obtener un buen producto de amplificación incluso cuando se usan ADN circulares largos de 80 kb o 200 kb como plantillas.

30 <Resultado 3> Caso usando ADN ciclado mediante ligamiento *in vitro* como plantilla

La Figura 5 muestra el resultado de la detección de un producto de amplificación detectado usando SyberGreen.

35 El método de la presente invención mostró que se puede obtener un buen producto de amplificación incluso cuando se usa ADN ciclado mediante ligamiento *in vitro* como plantilla.

40 La cantidad de amplificación de ADN circular se obtuvo transformando una cepa de DH5 α de *E. coli* usando la solución tras la reacción tal cual, cultivando la cepa en un agar que contenía kanamicina y midiendo el número de colonias, y su resultado se muestra en la Tabla 4. Se usó una muestra que no se sometió a amplificación como control.

[Tabla 4]

Reacción de amplificación	-	+
Producto de transformación (n.º de colonias)	$3,2 \times 10^2$	$6,6 \times 10^5$

45 El método de la presente invención permitió la amplificación del ADN ciclado usando el método de ensamblaje de Gibson hasta 2.000 veces en ADN circular.

EJEMPLO 2: Amplificación de ADN circular de unas cuantas moléculas de plantilla

50 El ADN circular de 9,6 kb que se muestra en el Ejemplo 1 se usó para realizar una amplificación similar al Ejemplo 1.

(2-1) Análisis de la eficacia de la amplificación

55 A 10 μ l de una solución de reacción de amplificación (Ejemplo 1, Tabla 2), se añadió un ADN circular de 9,6 kb de modo que la solución contuviera de 1 a 1.000 moléculas circulares, después, se retuvo la temperatura de la solución a 30 °C durante 3 h para dejar que la amplificación progresara. Se sometió el producto de reacción a electroforesis en agarosa al 0,5 % y se tiñó con SybrGreen (Takara Bio Inc.) para detectar el ADN amplificado (Figura 6a). Es más, se cuantificó la cantidad total de ADN del producto de amplificación usando el kit de detección PicoGreen (ThermoFisher) (Figura 6b: Método PicoGreen). La cantidad de amplificación de la molécula de ADN circular se cuantificó transformando directamente el producto de amplificación a *E. coli* y calculando el número de colonias de

resistencia a la kanamicina (Figura 6b: Transformación). El resultado de la cuantificación se usó para obtener el nivel de amplificación frente a la cantidad inicial de ADN (amplificación), y el resultado se muestra en el gráfico.

5 El resultado anterior hizo evidente que una sola molécula de ADN circular que constituye el ADN plantilla puede amplificarse hasta aproximadamente 10^{11} moléculas en solo 3 h de reacción isotérmica (amplificación de aproximadamente 100 mil millones de veces).

(2-2) Análisis del tiempo de duplicación

10 A 80 μ l de solución de reacción de amplificación (Ejemplo 1, Tabla 2), se añadió el ADN circular anterior y se retuvo la temperatura de la solución a 30 °C para permitir que progresara la amplificación. Se añadió ADN circular para que cada 1 μ l de la solución de reacción contuviera 10^5 moléculas. El número de ADN circular amplificado se cuantificó muestreando la solución a lo largo del tiempo, transformando directamente la muestra a *E. coli*, y calculando el número de colonias de resistencia a la kanamicina (Figura 7).

15 Se confirmó, a partir del resultado anterior, que el tiempo de duplicación de las moléculas de ADN circular de 9,6 kb es de aproximadamente 5 minutos.

20 EJEMPLO 3: Amplificación de un clon de ADN circular, individual, de una mezcla

La amplificación de un clon de ADN circular individual se realizó a partir de una mezcla de un ADN circular de 9,6 kb y un ADN circular de 12,0 kb que se muestra en el Ejemplo 1 (ADN circular que tiene una secuencia de origen de replicación *oriC*, resistencia a la kanamicina (Km)).

25 El ADN circular de 12,0 kb se preparó mediante la recombinación *in vivo* en células de *E. coli*. Específicamente, la recombinación *in vivo* se realizó usando *E. coli* que expresaba un grupo de proteínas de recombinación de fago λ para preparar ADN circular de una longitud deseada que incluyera *oriC* y un casete que consistiera en un gen de resistencia a la kanamicina y alguna región del cromosoma de *E. coli*.

30 A 10 μ l de la solución de reacción de amplificación (Ejemplo 1, Tabla 2), se añadió una mezcla de los dos tipos de ADN circulares anteriores para que la solución de reacción contuviera cada tipo de ADN circular en un número de 15 moléculas o se diluyera hasta 1,5 moléculas, después, se retuvo la temperatura a 30 °C durante 6 h para dejar que la amplificación progresara. Del producto de reacción, se detectó el ADN de amplificación sometiendo el producto a electroforesis en agarosa al 0,5 % y tiñéndolo con SybrGreen (Takara Bio Inc.) (Figura 8).

35 Como resultado, solo se amplificó el clon de uno de los dos tipos de ADN circular para cada muestra de reacción en la solución de reacción diluida hasta 1,5 moléculas de ADN circular. Esto muestra que, incluso si el ADN plantilla es una mezcla, es posible amplificar un solo clon circular de ADN diluyendo la mezcla hasta un nivel de 1 molécula en la solución de reacción.

40 EJEMPLO 4: Amplificación por pasos

La amplificación por pasos de ADN circular se probó usando ADN circular de *lacZ*.

45 El ADN circular de *lacZ* (9,0 kb) se preparó ligando un fragmento de ADN bicatenario que incluía *oriC* (1,0 kb), un fragmento de ADN bicatenario que incluía el gen de resistencia a la kanamicina (Km) (4,6 kb) y un fragmento de ADN bicatenario que incluía *lacZ* (β -galactosidasa) (3,4 kb). A 10 μ l de solución de reacción de amplificación (Ejemplo 1, Tabla 2), se añadió ADN circular de *lacZ* para que la solución contuviera 1.000 moléculas de ADN, después, se retuvo la temperatura de la solución a 30 °C durante 3 h para dejar que la amplificación progresara.

50 Esto constituye un paso. Se diluyó el producto de la reacción de amplificación del número de paso anterior hasta 10^5 veces, y se añadió 1 μ l de este a la nueva solución de reacción de amplificación para inducir una reacción similar que constituyera la amplificación del siguiente paso. La amplificación por pasos se repitió 10 veces. El producto de la amplificación de cada paso se detectó sometándolo a electroforesis en agarosa al 0,5 % y tiñendo con SybrGreen (Takara Bio Inc.) (Figura 9). Se transformó una parte del producto de amplificación a *E. coli* y se cuantificó el nivel de amplificación del ADN según el número de colonias de resistencia a la kanamicina, después, se usó este número para calcular el número de generaciones que repitió la amplificación exponencial, lo que constituye el número total de generaciones.

60 En consecuencia, se reconoció que la amplificación del ADN circular progresaba eficazmente incluso tras 10 pasos. Como muestra el resultado del Ejemplo 2 (Figura 7), cuando el ADN circular se amplifica en cierta medida, la tasa de amplificación se nivela debido al agotamiento del sustrato o de la enzima. Entre tanto, el resultado del presente ejemplo muestra que es posible repetir semipermanentemente una amplificación exponencial de ADN circular al pasar una parte del producto de la reacción de amplificación en la nueva solución de reacción. En otras palabras, el método de la presente invención es un método que permite realizar la amplificación del ADN circular de manera similar a la amplificación de células por pasos.

65

EJEMPLO 5: Incidencia del error de replicación en la amplificación

Debido a que el ADN circular plantilla del Ejemplo 4 incluye genes *lacZ*, la colonia que expresa los genes *lacZ* correctamente (*lacZ*⁺) se vuelve azul, ya que puede descomponer a X-gal, y la colonia cuyo gen *lacZ* no funciona correctamente debido a la mutación introducida por un error en la replicación (*lacZ*[^]) se vuelve blanca, ya que no puede descomponer a X-gal cuando *E. coli*, que había sido transformada por los genes circulares anteriores, se cultiva en la placa de X-gal. En otras palabras, es posible juzgar el error de replicación en el ADN circular amplificado según el color que la *E. coli*, que había sido transformada por los genes circulares anteriormente mencionados, expresa en la placa de X-gal.

El producto de la reacción de amplificación de la muestra de cada paso se transformó directamente a *E. coli* y se cultivó sobre la placa de X-gal para obtener la incidencia de *lacZ*[^]. La incidencia de *lacZ*[^] y el número total de generación obtenido en el Ejemplo 4 se usaron para calcular la incidencia del error de una generación del ciclo de replicación de acuerdo con el método de Barnes (Barnes W. M. *Gene*. 1992, 112, 29-35). El resultado se muestra en la siguiente Tabla 5.

[Tabla 5]

Número de paso	Número total de generaciones	Incidenias de la colonia de <i>lacZ</i> (%)	Incidencia del error (por base)
1	25	< 0,045	< 3,7 x 10 ⁻⁸
2	44	< 0,074	< 3,4 x 10 ⁻⁸
5	106	0,1	1,9 x 10 ⁻⁸
10	201	0,093	0,93 x 10 ⁻⁸

El resultado anterior muestra que los errores de replicación ocurren en aproximadamente una posición por cada 100 millones de bases (una media de 1,4 x 10⁻⁸ errores por base). Esto es aproximadamente lo mismo que la tasa de mutación en la célula (cepas sin sistema de corrección de emparejamientos erróneos), y aproximadamente 10 mil veces más exacto que la polimerasa Taq.

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar exponencialmente ADN circular mediante la repetición de ciclos de replicación, que comprende una etapa de:

5 formar una mezcla de reacción compuesta de una solución de reacción que contiene

- (a) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular;
- (b) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
- (c) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos; y ADN circular que constituye una plantilla, donde

15 el ADN circular incluye una secuencia de origen de replicación (origen del cromosoma (*oriC*)) que puede unirse a una enzima que tiene actividad DnaA.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho tercer grupo de enzimas comprende al menos dos enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad topoisomerasa III, una enzima que tiene actividad topoisomerasa IV y una enzima que tiene actividad RecQ.

20

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde

25 dicho primer grupo de enzimas comprende una combinación de una enzima que tiene actividad DnaA, uno o más tipos de proteínas nucleoides, una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN girasa, proteína de unión monocatenaria (SSB, *Single-Strand Binding*), una enzima que tiene actividad ADN helicasa, una enzima que tiene actividad de carga de ADN helicasa, una enzima que tiene actividad ADN primasa, una enzima que tiene actividad de fijación de ADN y una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN polimerasa III*; y donde

30 dicho segundo grupo de enzimas comprende una combinación de una enzima que tiene actividad ADN polimerasa I y una enzima que tiene actividad ADN ligasa.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde un tamaño de ADN circular es de 8 kb o superior.

35 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una etapa de retención de la temperatura de la mezcla de reacción en condiciones isotérmicas.

6. Un kit para amplificar exponencialmente ADN circular que comprende:

- (a) un primer grupo de enzimas que cataliza la replicación de ADN circular;
- (b) un segundo grupo de enzimas que cataliza la maduración de un fragmento de Okazaki y sintetiza dos ADN circulares hermanos que constituyen un catenano; y
- (c) un tercer grupo de enzimas que cataliza una separación de dos ADN circulares hermanos, que es un grupo de enzimas que comprende al menos dos enzimas seleccionadas de un grupo que consiste en una enzima que tiene actividad topoisomerasa III, una enzima que tiene actividad topoisomerasa IV y una enzima que tiene actividad RecQ.

45

7. El kit de acuerdo con la reivindicación 6, donde

50 dicho primer grupo de enzimas comprende una combinación de una enzima que tiene actividad DnaA, uno o más tipos de proteínas nucleoides, una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN girasa, proteína de unión monocatenaria (SSB, *Single-Strand Binding*), una enzima que tiene actividad ADN helicasa, una enzima que tiene actividad de carga de ADN helicasa, una enzima que tiene actividad ADN primasa, una enzima que tiene actividad de fijación de ADN y una enzima o un grupo de enzimas que tiene actividad ADN polimerasa III*; y donde

55 dicho segundo grupo de enzimas comprende una combinación de una enzima que tiene actividad ADN polimerasa I y una enzima que tiene actividad ADN ligasa.

Figura 1

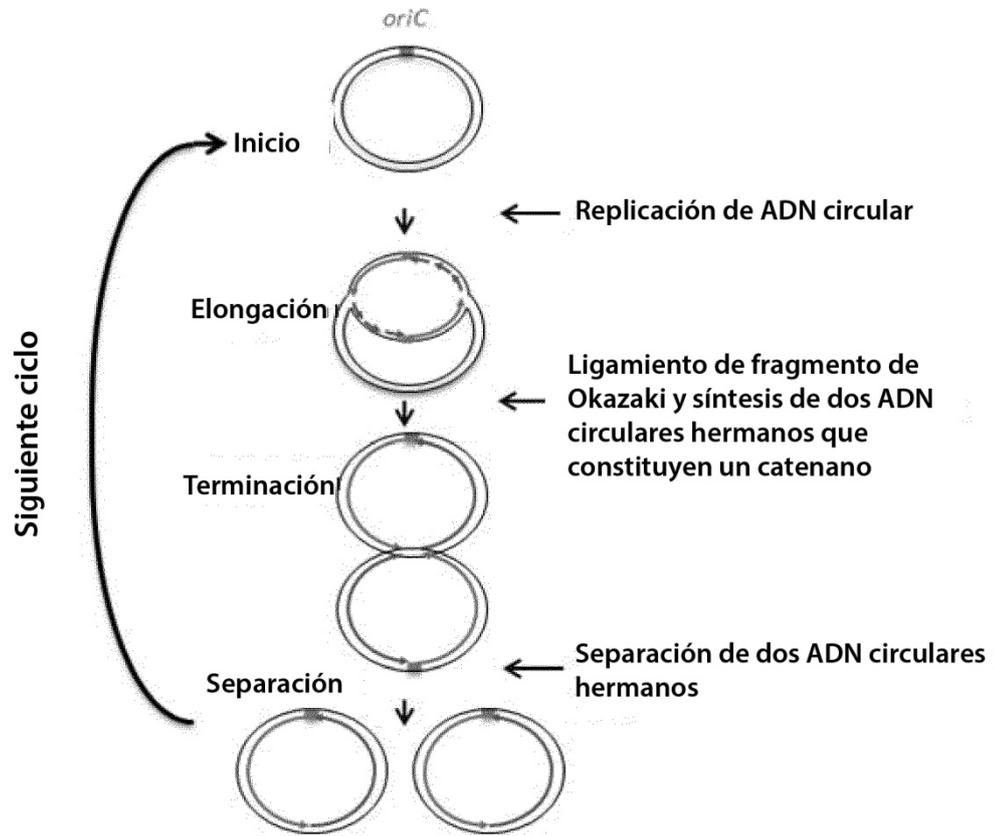
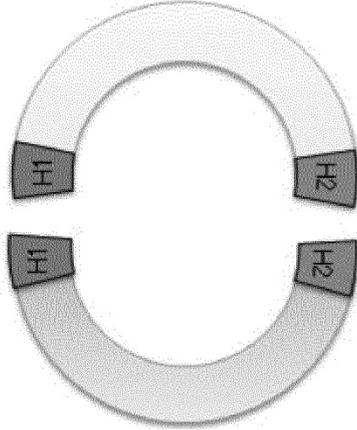


Figura 2

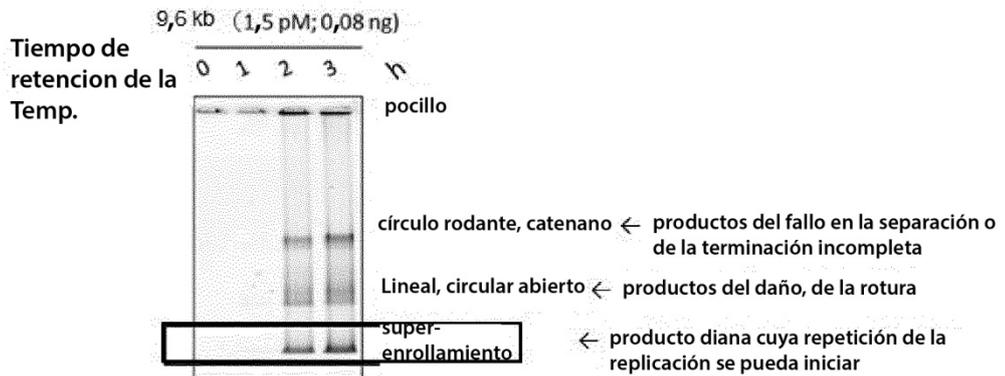
Fragmento *oriC-Km* (2,3 kb)



Ciclación mediante
ligamiento de
fragmentos de PCR
(Ensamblaje de Gibson)

Fragmento *dnaA-dnaN*
(2,6 kb)

Figura 3



(condición de electroforesis: 1 x TAE al 0,5 %, 150 V, 100 min, 14 °C, colorante SyberGreen)

Figura 4

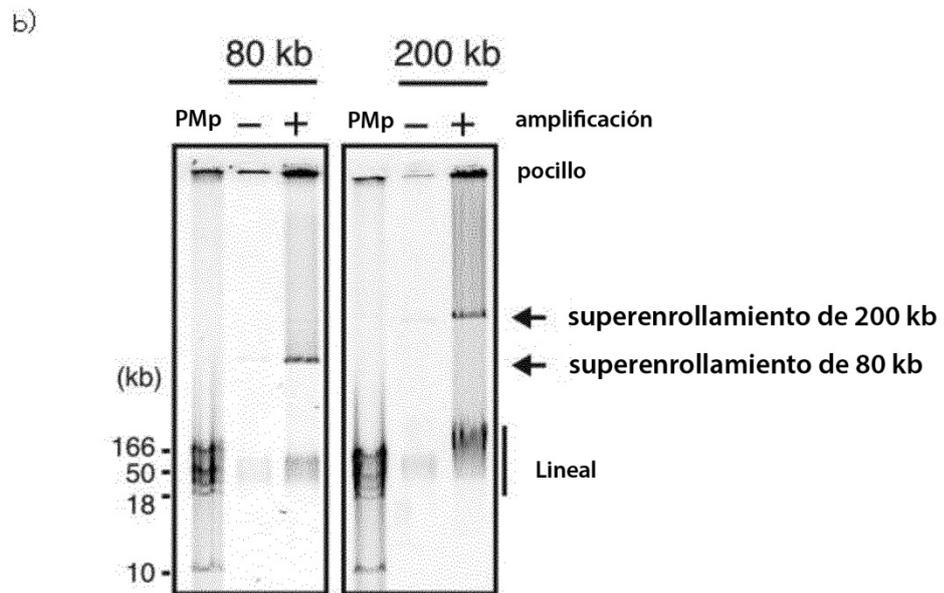
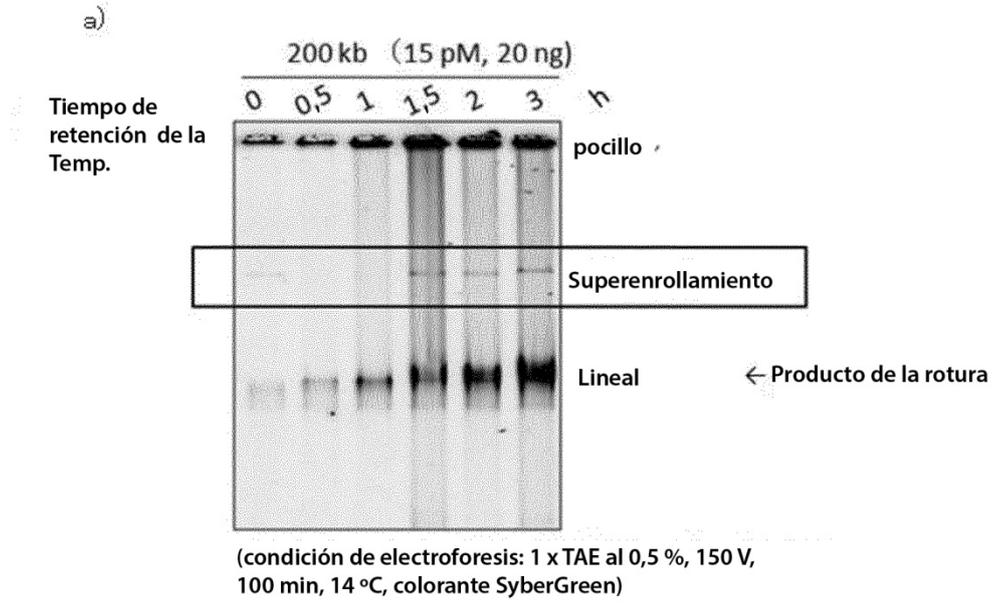


Figura 5

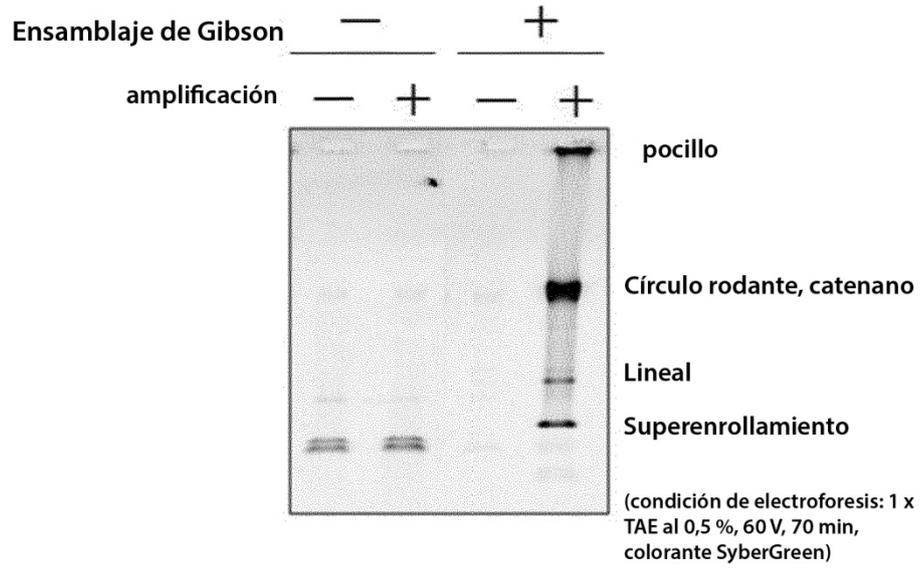


Figura 6

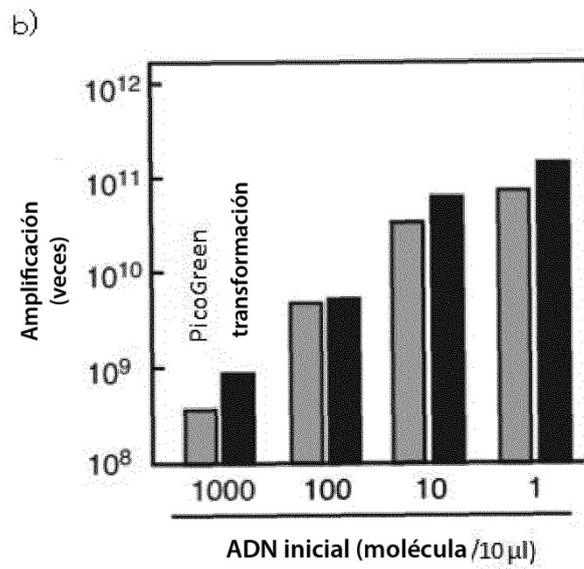
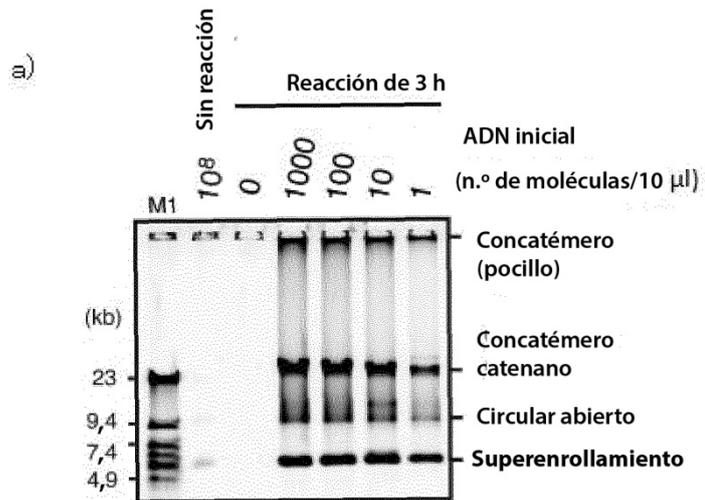


Figura 7

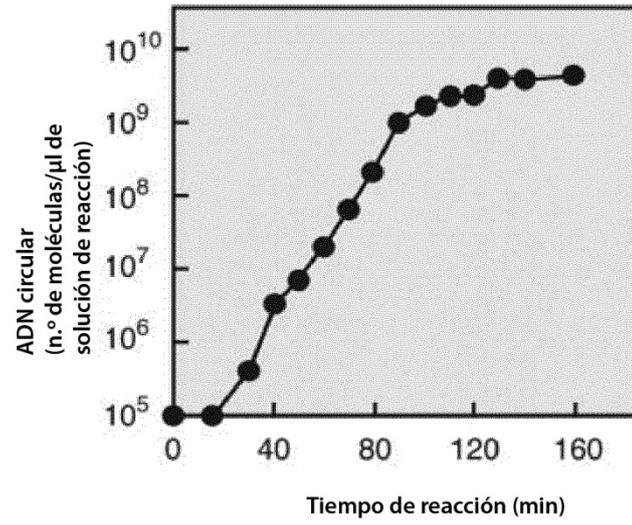


Figura 8

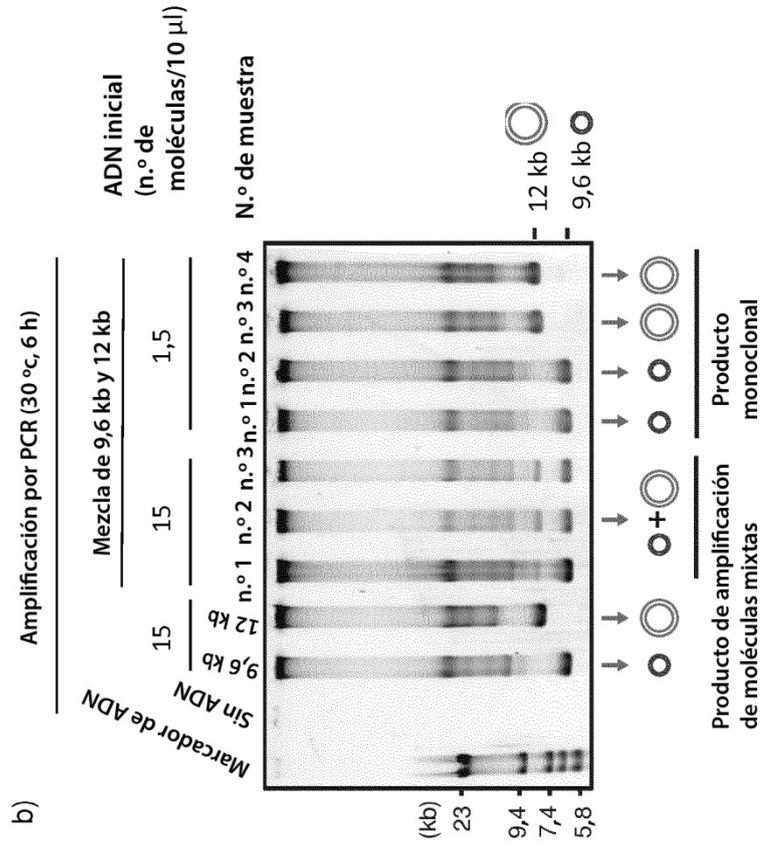


Figura 9

