

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2011/000998 A2**

(43) Fecha de publicación internacional  
6 de enero de 2011 (06.01.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).  
clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2010/070456 (74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (22) Fecha de presentación internacional: 2 de julio de 2010 (02.07.2010) (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P 200930412 2 de julio de 2009 (02.07.2009) ES (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SALAS FALGUERAS, Margarita [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). DE VEGA JOSÉ, Miguel [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). LAZARO BOLOS, José M<sup>a</sup> [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). BLANCO DAVILA, Luis [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). MENCIA CABALLERO, Mario [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Eladio Viñuela (ibmev),
- Publicada:
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
  - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR THE REPLICATION, AMPLIFICATION OR SEQUENCING OF A DNA TEMPLATE

(54) Título : MÉTODO PARA LA REPLICACIÓN, AMPLIFICACIÓN O SECUENCIACIÓN DE UN ADN MOLDE

(57) Abstract: The invention relates to the field of biotechnology, specifically to a method for carrying out the replication, amplification or sequencing of a desoxyribonucleic acid with a  $\phi$ 29 DNA polymerase, and to a kit for carrying out said method.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 y a un kit para llevar a cabo dicho método.



WO 2011/000998 A2

## **Método para la replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde.**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología.  
5 Específicamente, se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  y a un kit para llevar a cabo dicho método.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

La única enzima requerida por el bacteriófago  $\phi 29$  para replicar su genoma es su ADN polimerasa, una proteína monomérica de 66 KDa, capaz de catalizar tanto la iniciación de la replicación como la elongación de la cadena sintetizada. Para la iniciación, esta polimerasa se une a una proteína denominada  
15 "terminal" (TP), reconoce el extremo del ADN de  $\phi 29$  y cataliza la formación de un complejo covalente TP-dAMP. Tras la polimerización de 10 nucleótidos, se disocia el heterodímero ADN polimerasa/TP y se lleva a cabo la elongación de la cadena naciente de ADN.

20 Las ADN polimerasas replicativas requieren la interacción con proteínas accesorias que estabilizan la unión entre la enzima y el ADN (Kuriyan y O'Donnell. J Mol Biol. 1993; 234: 915-925). Por otro lado, dichas ADN polimerasas necesitan acoplar la polimerización al desplazamiento de la cadena de ADN que no está siendo copiada, para lo cual requieren su  
25 asociación funcional a proteínas tipo helicasa. En este sentido, la ADN polimerasa del bacteriófago  $\phi 29$  presenta varias características funcionales intrínsecas que la hacen única:

a) Elevada procesividad (definida como el número de nucleótidos  
30 incorporados por evento de unión).

b) Alta capacidad de desplazamiento de cadena, lo que le permite replicar

el genoma de dicho bacteriófago en ausencia de proteínas accesorias tipo helicasa. Estas dos características, procesividad y desplazamiento de cadena permiten que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  sea capaz de sintetizar cadenas de ADN de más de 70 kb de longitud (Blanco et al. J Biol Chem. 1989; 264: 8935-8940).

5 c) Alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena (Esteban et al. J Biol Chem. 1993; 268: 2719-2726).

10 Todas estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos de procesos isotérmicos (a temperatura constante) para la amplificación de ADN de doble cadena (ADNbc), basados en el uso de esta polimerasa. En una configuración simple, la capacidad de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  para usar ADN de cadena sencilla (ADNmc) circular permite una

15 amplificación de ADN por el método del círculo rodante (o, RCA de las siglas en inglés de *rolling-circle amplification*), originando moléculas de ADNmc de gran longitud y que contienen más de 10 copias del molde circular (Blanco et al. J Biol Chem. 1989; 264: 8935-8940; US5001050, US5198543 y US5576204). En el procedimiento de amplificación de ADNbc desarrollado por Amersham

20 Biosciences / Molecular Staging (Dean et al. Genome Res. 2001; 11: 1095-1099; Dean et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 5261-5266), la combinación del uso de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  con el de hexámeros (hexa-nucleótidos) cebadores de secuencias al azar, permiten obtener factores de amplificación de  $10^4$ - $10^6$  partiendo de picogramos de ADN plasmídico circular

25 [Templiphi™ de GE Healthcare] o de 10 nanogramos de ADN genómico [Genomiphi™ de GE Healthcare y Repli-G® de Qiagen]. Los productos originados son de alta calidad y pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa, habiéndose demostrado que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  es la enzima más robusta para este fin. El tampón

30 habitual para llevar a cabo las reacciones de amplificación con la ADN polimerasa de  $\phi 29$  contiene Tris-HCl (pH 7,5) más distintas concentraciones (en el orden milimolar) de NaCl o KCl y  $MgCl_2$  (US20030207267). Sin embargo,

a pesar de la bondad de estos protocolos en situaciones muy diversas, es una necesidad creciente el desarrollar otros que permitan partir de cantidades menores de ADN.

## 5 EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para llevar a cabo la replicación, la amplificación o la secuenciación de un ácido desoxirribonucleico con una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  y a un kit para llevar a cabo dicho método.

10

La ADN polimerasa del fago  $\phi 29$  presenta varias características de gran interés para la amplificación de ADN como son: una elevada procesividad sin necesidad del concurso de ninguna proteína accesoria y una alta capacidad de desplazamiento de cadena que le permiten replicar el genoma de dicho bacteriófago en un solo evento de unión al ADN, así como una alta fidelidad en la inserción de nucleótidos en la nueva cadena. Estas características han conducido al desarrollo de una gran variedad de protocolos para la amplificación isotérmica de ADN, basados en el uso de esta polimerasa que permiten la obtención de productos de alta calidad que pueden digerirse o ser secuenciados directamente sin necesidad de purificación previa. Sin embargo, existe una necesidad de protocolos que permitan la amplificación de ADN a partir de cantidades menores del mismo. La presente invención responde a esta necesidad mediante el desarrollo de un método de amplificación de ADN que mejora significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción.

25

En los ejemplos de esta patente se muestra que la adición simultánea de monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween<sup>®</sup> 20) y una sal de amonio al tampón usado habitualmente para la amplificación con la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , por un lado, evita la amplificación inespecífica de ADN y, por otro, permite la amplificación detectable y específica a partir de cantidades límite de 0,1 femtogramos (fg) de ADN plasmídico y 10 fg de ADN genómico como molde.

30

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende, al menos:

5

- a) una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietileno,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón,
- 10 e) cloruro magnésico,
- f) un cebador, y
- g) nucleósidos trifosfato.

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que comprende los elementos (a)-(g) mencionados anteriormente y que además comprende una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

20

El término "ADN polimerasa", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una enzima capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleósidos trifosfato. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado con una secuencia de ADN molde, y  
25 procede en dirección al extremo 5' de la hebra del ADN molde.

El término "ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier ADN polimerasa que contiene subdominios TPR1 y TPR2 en su dominio de polimerización, que proporcionan a la  
30 polimerasa la capacidad de acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de cadena. Ejemplos de ADN polimerasas del tipo  $\phi 29$  que pueden ser empleadas en la presente invención se seleccionan de la lista que

comprende las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi$ 29, Cp-1, PRD-1,  $\phi$ 15,  $\phi$ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

- 5 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi$ 29, Cp-1, PRD-1,  $\phi$ 15,  $\phi$ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o Acidianus Bottle-shaped virus (ABV).

10

- En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 80% con la SEQ ID NO: 1. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo
- 15  $\phi$ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

20

- El dominio exonucleasa de las ADN polimerasas del tipo  $\phi$ 29 es conocido y puede ser modificado para reducir la actividad exonucleasa reteniendo una alta procesividad y capacidad de desplazamiento de cadena. Estas ADN polimerasas modificadas son especialmente útiles para secuenciar moléculas largas.

25

- En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 presenta una modificación en el dominio exonucleasa, donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural o "wild type". En una
- 30 realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 modificada tiene menos del 1 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural. En una realización aún más preferida, la ADN

polimerasa del tipo  $\phi 29$  modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 5 nM y 75 nM. En una realización más preferida, la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de entre 25 nM y 60 nM. En una realización aún más preferida, la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  (natural o modificada en el dominio exonucleasa) está a una concentración de aproximadamente 50 nM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween<sup>®</sup> 20) está a una concentración de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción. En una realización más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietileno está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietileno está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción. En una realización aún más preferida, el monolaurato de sorbitán polioxietileno está en una proporción de aproximadamente 0,025% del volumen total de la reacción. Por "volumen total de la reacción", se entiende el volumen resultante tras la adición del ADN molde a la mezcla de reacción.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es sulfato de amonio. En una realización más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de

entre 30 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM. En una realización aún más preferida, el sulfato de amonio está a una concentración de aproximadamente 45 mM.

5

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es cloruro de amonio. En una realización más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

10

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, la sal de amonio es acetato de amonio. En una realización más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM. En una realización aún más preferida, el acetato de amonio está a una concentración de aproximadamente 90 mM.

15

20

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización más preferida, el tampón está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón está a un pH de aproximadamente 7,5.

25

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES. En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,0 y 8,5. En una realización aún más

30



preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de entre 7,2 y 8. En una realización aún más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a un pH de aproximadamente 7,5.

- 5 En una realización preferida de este aspecto del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 25 mM y 50 mM. En una realización más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de entre 30 mM y 45 mM. En una realización aún
- 10 más preferida, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES está a una concentración de aproximadamente 40 mM.

- En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM. En una realización más preferida,
- 15 el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de aproximadamente 50 mM.

- 20 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM. En una realización más preferida, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM. En una realización aún más preferida, el cloruro magnésico está aproximadamente a
- 25 10 mM.

- En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietileno se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el
- 30 sulfato de amonio se encuentra a una concentración de entre 40 mM y 50 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro

magnésico está a una concentración entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

5 En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el sulfato de amonio se encuentra a una concentración de 45 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el  
10 cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se  
15 encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro  
20 potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

En una realización más preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se  
25 encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el cloruro de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50  
30 mM.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de entre 80 mM y 100 mM, el tampón Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una  
5 concentración de entre 30 mM y 45 mM y a un pH de entre 7,2 y 8,0, el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de entre 40 y 60 mM.

10

En una más realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el monolaurato de sorbitán polioxietilenado se encuentra en una concentración del 0,025% del volumen total, el acetato de amonio se encuentra a una concentración de 90 mM, el tampón Tris-  
15 Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES se encuentra a una concentración de 40 mM y a un pH de 7,5, el cloruro magnésico está a una concentración de 10 mM y el cloruro potásico o el acetato potásico se encuentra a una concentración de 50 mM.

20 El término “replicación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a partir de un ADN molde.

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ADN molde.

25

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ADN molde.

Por “poner en contacto” se entiende que el ADN molde y la mezcla de reacción  
30 se incuban en condiciones de extensión del cebador.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

5

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse, a la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de deoxinucleótidos en el ADN molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

10

El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de deoxinucleótidos en el ADN molde que se quiere amplificar.

15

Por “complementaria” se entiende que el cebador puede hibridar con una región del ADN molde de forma que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones de extensión del cebador. Preferentemente, esa región tiene una complementariedad del 100 % con una región del ADN molde. Esto es, cada nucleótido en la región de complementariedad con el cebador puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en el molde de hebra sencilla. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que cebadores que posean una región con complementariedad menor al 100 % respecto al ADN molde funcionarán para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

20

25

El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde. Por lo general, en el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención se emplea una población de cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere

30

a un conjunto de cebadores con una secuencia aleatoria y que se usan para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ADN molde.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es específico.

5

En otra realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador es arbitrario. Preferiblemente, el cebador arbitrario está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'. Y más preferiblemente, el cebador arbitrario es un oligonucleótido de 6

10 nucleótidos, "hexanucleótido" o "hexámero" protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

La expresión "protegido frente a la acción de exonucleasas", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador modificado de forma

15 que es resistente a la degradación nucleolítica por cualquier actividad exonucleasa 3'-5' presente en la ADN polimerasa.

En el método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, puede emplearse más de un cebador, pudiendo emplearse cebadores

20 específicos y/o arbitrarios.

En una realización preferida del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, el cebador está a una concentración de entre 2

25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . En una realización más preferida, el cebador está a una concentración de entre 20  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, el cebador está a una concentración de entre 40 y 60  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, el cebador están a una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ .

30 El término "nucleósidos trifosfato", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y tres grupos fosfato.

El término nucleósidos trifosfato incluye desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. Preferiblemente, los desoxinucleósidos trifosfato son dATP, dTTP, dGTP y dCTP. Aún más preferiblemente, estos cuatro dNTPs  
5 están en condiciones equimolares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 100  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$ . En una realización más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato están a una concentración de entre 200  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$ . En una realización aún más preferida, los desoxinucleósidos trifosfato  
10 están a una concentración de aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ .

El término nucleósidos trifosfato también incluye didesoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) como, por ejemplo, pero sin limitarse, ddATP, ddCTP, ddITP, ddUTP, ddGTP, ddTTP, o derivados de los mismos.

15 En algunas realizaciones preferidas del método de replicación, amplificación o secuenciación de la invención, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. El nucleótido marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un  
20 didesoxinucleósido trifosfato. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término "ADN molde", tal y como se utiliza en la presente descripción, se  
25 refiere a una molécula de ADN que puede servir como sustrato para la síntesis de una cadena de ADN complementaria; es decir, se refiere a una molécula de ADN que va a ser replicada, amplificada o secuenciada. En una realización preferida el ADN molde es ADN plasmídico. En otra realización preferida, el ADN molde es ADN genómico.

30 La replicación, la amplificación o la secuenciación del ADN molde se lleva a cabo en condiciones de extensión de cebador. La expresión "condiciones de

extensión de cebador” hace referencia a las condiciones en que puede tener lugar la síntesis dependiente de ADN molde iniciada en un cebador.

La síntesis de un ADN molde según el método de replicación, amplificación o  
5 secuenciación de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura esencialmente constante.

Por “condiciones isotérmicas” se entiende temperatura esencialmente constante. Preferiblemente, la síntesis del ADN molde según el método de  
10 replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención tiene lugar a una temperatura esencialmente constante. Más preferiblemente, a una temperatura esencialmente constante de entre 25 y 40 °C, y aún más preferiblemente, de aproximadamente 30°C.

15 Son conocidos en el estado de la técnica un amplio número de métodos que permiten la amplificación de ADN. Algunos métodos requieren un proceso de ciclado térmico como, por ejemplo, pero sin limitarse, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros métodos no requieren un proceso de ciclado térmico, sino que se realizan a una temperatura esencialmente constante  
20 como, por ejemplo, pero sin limitarse, la amplificación por círculo rodante (RCA), la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación mediante lazo (LAMP). La amplificación de un ADN molde según el método de la presente invención puede tener lugar mediante un proceso de ciclado térmico o a una temperatura  
25 esencialmente constante.

Preferiblemente, la amplificación del ADN molde según el método de amplificación de la presente invención tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), mediante amplificación de desplazamiento múltiple  
30 (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMP).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende elementos apropiados para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de replicación, amplificación o secuenciación de la presente invención que comprende:

- 10 a) una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ,
- b) monolaurato de sorbitán polioxietileno,
- c) una sal de amonio,
- d) un tampón, y
- e) cloruro magnésico.

15 Preferiblemente, dicha sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además una sal de potasio. Preferiblemente, dicha sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además un cebador. En una realización más preferida, el cebador es un cebador arbitrario que está protegido frente a la acción de exonucleasas 3'-5'.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además nucleósidos trifosfato. Por ejemplo, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además desoxinucleósidos trifosfato y/o un didesoxinucleósido trifosfato.

30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador marcado. El nucleósido



marcado puede ser, por ejemplo, un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Muestra el efecto del Tween<sup>®</sup> 20 y del (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi$ 29. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb). Después de incubar a 30°C durante 5 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. A la izquierda, los fragmentos de ADN lineales obtenidos después de digestión del ADN de  $\phi$ 29 con *Hind*III, usados como marcadores de longitud del ADN.

**Figura 2.** Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN plasmídico (en el orden de femtogramos) por la ADN polimerasa de  $\phi$ 29 en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

**Figura 3.** Muestra el efecto del ión  $\text{NH}_4^+$  en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ . El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada así como de las cantidades indicadas de ADN plasmídico (4,2 kpb).  
5 Después de incubar a 30°C durante 6 h, las reacciones se analizaron como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

**Figura 4.** Muestra la amplificación de distintas cantidades de ADN genómico de  
10 *Bacillus subtilis* por la ADN polimerasa de  $\phi 29$  en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal, en presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los usados en la Figura 1.

15 **Figura 5.** Muestra la notable mejora que representa el añadir Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al actual tampón de reacción de un kit comercial para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de  $\phi 29$  (Ilustra kit de General Electrics HealthCare). El ensayo se llevó a cabo como se describe en el texto principal. Los marcadores de longitud del ADN son iguales a los  
20 usados en la Figura 1.

**EJEMPLOS. Optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación de ADN con cebado múltiple por la ADN polimerasa de  $\phi 29$ .**

25 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto,  
30 los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Se ha mostrado que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  realiza una amplificación de  $10^4$ - $10^6$  veces partiendo de varios picogramos de ADN circular. Para este fin se empleó un tampón de reacción que contiene Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, KCl 50 mM y  $MgCl_2$  10 mM (en lo sucesivo Tampón A). Después de probar la influencia de diferentes condiciones de detergentes y sales en la capacidad de amplificación de ADN de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , encontramos que la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(NH_4)_2SO_4$  45 mM al Tampón A mejora mucho la amplificación de cantidades limitadas de ADN aportado.

10 *Condiciones de la reacción de amplificación de ADN plasmídico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5  $\mu$ l de tampón A, 50  $\mu$ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP), las cantidades indicadas de un ADN plasmídico (con un tamaño de 4,2 kbp) y, donde se indica, se adicionó  $(NH_4)_2SO_4$  45 mM o Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% o una combinación de ambos. La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95 °C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de  $\phi 29$  50 nM y se detuvo después de la incubación a 30 °C mediante calentamiento a 65 °C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1  $\mu$ l de las reacciones, se digirió el ADN amplificado con la endonucleasa de restricción EcoRI y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.*

25 *Condiciones de la reacción de amplificación de ADN genómico.- La mezcla de incubación contenía en 12,5  $\mu$ l de tampón A,  $(NH_4)_2SO_4$  45 mM, Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025%, 50  $\mu$ M de hexámeros protegidos contra la acción de la exonucleasa 3'-5', 500  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato (dCTP, dGTP, dTTP y dATP) y las cantidades indicadas de ADN genómico de *Bacillus subtilis* (con un tamaño de 4 Mpb). La desnaturalización del ADN se llevó a cabo por incubación a 95 °C durante 3 minutos y posterior enfriamiento en hielo durante 5 min. La reacción se inició al añadir ADN polimerasa de  $\phi 29$  50 nM y se*

*detuvo después de la incubación a 30 °C mediante calentamiento a 65 °C durante 10 min. Para el análisis de los resultados, se tomaron muestras de 1 µl de las reacciones y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. El ADN se detectó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio.*

5

La Figura 1 muestra el efecto de añadir  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico aportado. Como se muestra, la ADN polimerasa de  $\phi 29$  no dio ningún producto de amplificación detectable con el Tampón A estándar cuando se usaron 100 fg de ADN aportado. En estas condiciones de reacción, la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en ausencia de ADN causó la aparición de productos de ADN en forma de rastro, lo más probable como una consecuencia de la amplificación inespecífica de ADN causada por la hibridación y elongación de los cebadores hexámeros aleatorios. Se observó el mismo rastro con 10 fg de ADN aportado. Sin embargo, en presencia de 100 fg de ADN aportado, la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% permitió que la ADN polimerasa de  $\phi 29$  produjera una cantidad detectable de plásmido amplificado. La producción total de ADN amplificado, específico o inespecífico, indica que la adición de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% al Tampón A potencia la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ . Se observó un efecto similar con el detergente NP40. Por el contrario, otros detergentes analizados como Triton X100 y Triton X114 no potenciaban la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$  (no se muestra). La adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al tampón A tenía dos consecuencias en el rendimiento y la especificidad de los productos amplificados: 1) no se detectó amplificación de ADN en ausencia de ADN aportado; 2) se obtuvieron por amplificación varios µg de ADN plasmídico de unidad longitud, incluso cuando la cantidad de ADN aportado era tan baja como 10 fg. Como control, la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al Tampón A no produjo ninguna mejora en la capacidad de amplificación de la ADN polimerasa de  $\phi 29$ .

30

Por lo tanto, podemos concluir que la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al Tampón A (en lo sucesivo Tampón B) produce

una clara optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la amplificación con cebado múltiple de ADN circular por la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , siendo ambos reactivos absolutamente necesarios para amplificar cantidades limitadas (10 fg) de ADN aportado. De hecho, como puede verse en la Figura 2, el uso de Tampón B permitió a la ADN polimerasa de  $\phi 29$  sintetizar microgramos de ADN usando una cantidad de plásmido aportado tan baja como 0,1 fg (~24 moléculas) después de 6 horas de reacción. Como control de calidad, la digestión de los productos de amplificación con *EcoRI* generó fragmentos de ADNbc lineales de 4,2 kb, que indicaban que el producto de amplificación eran realmente repeticiones en tándem del plásmido original. De nuevo, el Tampón B también evitó la amplificación de ADN inespecífico (véase en la Figura 2 las calles correspondientes a las reacciones llevadas a cabo sin ADN aportado).

La Figura 3 muestra el efecto de los iones amonio y Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% en la mejora en la amplificación de cantidades pequeñas de ADN plasmídico. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones anteriormente comentadas en presencia Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y de la sal de amonio indicada. Como se puede observar en la Figura 3 tanto el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como el  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  tuvieron un efecto similar al  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tanto en el rendimiento como en la especificidad de los productos amplificados. Este resultado indica que el efecto anteriormente descrito del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la amplificación de cantidades limitantes de ADN plasmídico es debido a los iones  $\text{NH}_4^+$ .

Para determinar si las condiciones optimizadas descritas antes también se aplicaban a la amplificación de ADN genómico, se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos realizados en presencia de concentraciones limitadas de ADN genómico de *B. subtilis* (4 Mpb de longitud). Como se muestra en la Figura 4, la presencia de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM en el tampón B, por una parte evitaba la amplificación inespecífica de ADN (calles sin ADN aportado), y por otra parte, permitía a la ADN polimerasa de  $\phi 29$  dar amplificación detectable y específica del ADN genómico incluso cuando se

usaban 10 fg de ADN aportado, es decir, una cantidad  $10^6$  veces inferior a la recomendada en los actuales kits de amplificación genómica comerciales.

Para determinar si la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM incrementa la eficiencia de amplificación de los actuales kits comerciales para la amplificación de ADN basado en la ADN polimerasa de  $\phi 29$ , se llevó a cabo el mismo tipo de ensayos de amplificación de ADN plasmídico descrito en las Figuras 1, 2 y 3. En la Figura 5 se muestra la notable mejora que representa el añadir Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al actual tampón de reacción del kit Illustra (GE HealthCare). Como se puede observar, siguiendo las recomendaciones del proveedor, con el kit Illustra sólo se puede amplificar de manera detectable en gel de agarosa cantidades de plásmido aportado iguales o superiores a 10 pg. Por el contrario, la adición simultánea de Tween<sup>®</sup> 20 al 0,025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 mM al tampón de reacción del kit Illustra disminuye de manera notable la cantidad necesaria de ADN que puede amplificarse, observándose productos de amplificación desde 1 fg aportado de ADN plasmídico, suponiendo una mejora de cuatro órdenes de magnitud en la amplificación.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de replicación, amplificación o secuenciación de un ADN molde que comprende poner en contacto dicho ADN con una mezcla de reacción que  
5 comprende, al menos:
- a) una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ,
  - b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
  - c) una sal de amonio,
  - 10 d) un tampón,
  - e) cloruro magnésico,
  - f) un cebador, y
  - g) nucleósidos trifosfato.
- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la mezcla de reacción además comprende una sal de potasio.
3. Método según la reivindicación 2 donde la sal de potasio es cloruro potásico o acetato potásico.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,003% y el 0,1% del volumen total de la reacción.
- 25 5. Método según la reivindicación 4 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,006% y el 0,05% del volumen total de la reacción.
- 30 6. Método según la reivindicación 5 donde el monolaurato de sorbitán polioxietilenado está en una proporción de entre el 0,01% y el 0,03% del volumen total de la reacción.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la sal de amonio se selecciona de la lista que comprende: sulfato de amonio, cloruro de amonio o acetato de amonio.
- 5 8. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es sulfato de amonio.
9. Método según la reivindicación 8 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 30 mM y 60 mM.
- 10 10. Método según la reivindicación 9 donde el sulfato de amonio está a una concentración de entre 40 mM y 50 mM.
11. Método según la reivindicación 7 donde la sal de amonio es cloruro de amonio o acetato de amonio.
- 15 12. Método según la reivindicación 11 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 60 mM y 120 mM.
- 20 13. Método según la reivindicación 12 donde el cloruro de amonio o el acetato de amonio está a una concentración de entre 80 mM y 100 mM.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 se selecciona de entre las ADN polimerasas aisladas de los siguientes fagos:  $\phi$ 29, Cp-1, PRD-1,  $\phi$ 15,  $\phi$ 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, GA-1, SF5, Cp-5, Cp-7, PR4, PR5, PR722, L17 o ABV.
- 25 15. Método según la reivindicación 14 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi$ 29 tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el
- 30 80% con la SEQ ID NO: 1.



16. Método según la reivindicación 15 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  tiene una secuencia aminoacídica que presenta una identidad de, al menos, el 90% con la SEQ ID NO: 1.
- 5 17. Método según la reivindicación 16 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  tiene la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  presenta una modificación en el dominio exonucleasa y  
10 donde dicha ADN polimerasa modificada tiene menos del 10 % de actividad exonucleasa que la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
19. Método según la reivindicación 18 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  modificada tiene menos del 1 % de actividad exonucleasa que la  
15 correspondiente ADN polimerasa de origen natural.
20. Método según la reivindicación 19 donde la ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$  modificada carece de actividad exonucleasa detectable con respecto a la correspondiente ADN polimerasa de origen natural.  
20
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 donde el tampón es Tris-Clorhídrico, Tris-Acético o HEPES.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 donde el tampón  
25 está a un pH de entre 7 y 8,5.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 2 mM y 20 mM.
- 30 24. Método según la reivindicación 23 donde el cloruro magnésico está a una concentración de entre 5 mM y 15 mM.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 24 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 30 mM y 70 mM.
- 5 26. Método según la reivindicación 25 donde el cloruro potásico o el acetato potásico está a una concentración de entre 40 mM y 60 mM.
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 donde los nucleósidos trifosfato son dCTP, dGTP, dTTP y dATP.
- 10 28. Método según la reivindicación 27 donde los nucleósidos trifosfato dCTP, dGTP, dTTP y dATP se encuentran en cantidades equimolares.
29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 donde el cebador es arbitrario y está protegido contra la acción de exonucleasas.
- 15 30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN plasmídico.
- 20 31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 donde el ADN molde es ADN genómico.
32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 donde la amplificación se realiza a una temperatura esencialmente constante entre 25 y 40 °C.
- 25 33. Método de amplificación de un ADN molde según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32 donde la amplificación tiene lugar mediante amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o amplificación mediante lazo (LAMPA).
- 30

34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.
35. Kit para llevar a cabo un método según las reivindicaciones 1 a 34 que  
5 comprende:
- a) una ADN polimerasa del tipo  $\phi 29$ ,
  - b) monolaurato de sorbitán polioxietilenado,
  - c) una sal de amonio,
  - 10 d) un tampón, y
  - e) cloruro magnésico.
36. Kit según la reivindicación 35 que además comprende una sal de potasio.  
15
37. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36 que además comprende un cebador.
38. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 que además  
20 comprende el cebador según la reivindicación 29.
39. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38 que además comprende nucleósidos trifosfato.
- 25 40. Kit según las reivindicaciones 37 a 39 donde, al menos, un nucleósido trifosfato o un cebador está marcado.

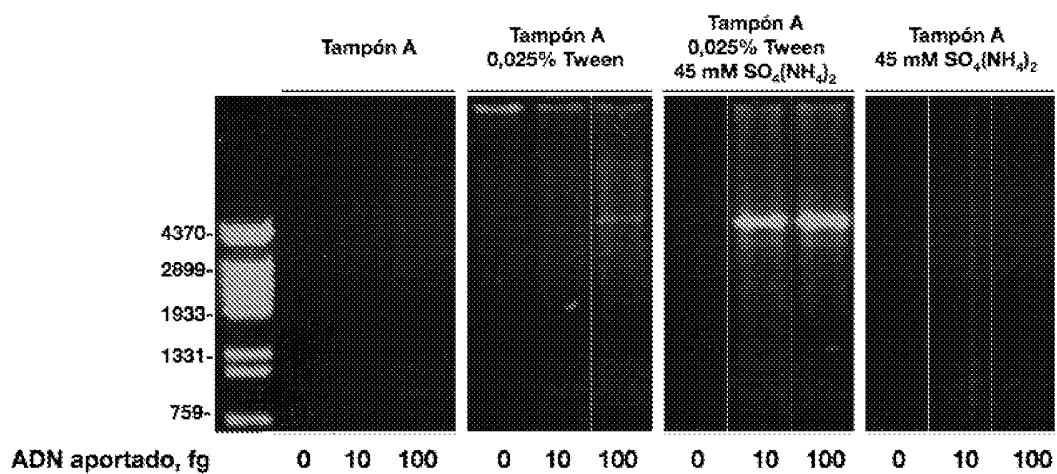


FIG. 1

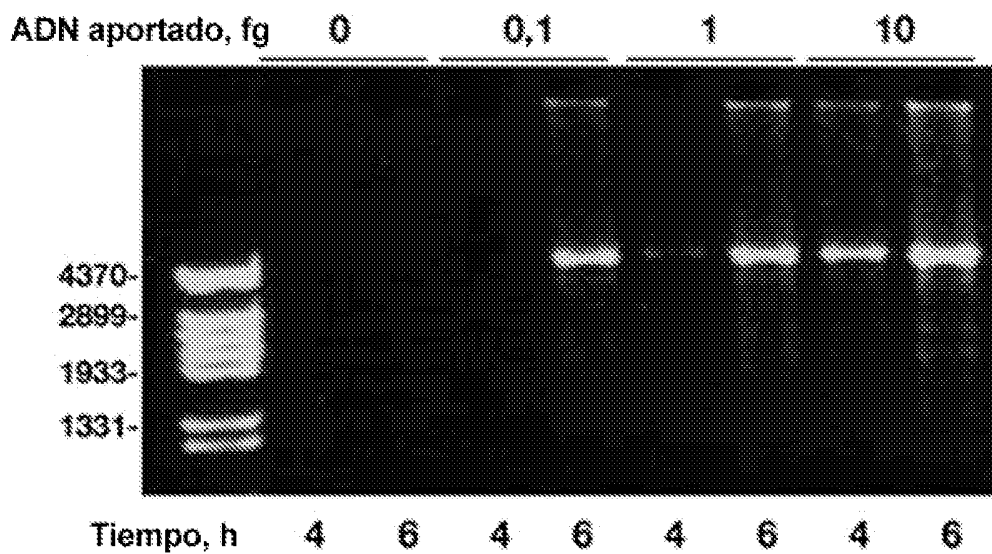


FIG. 2

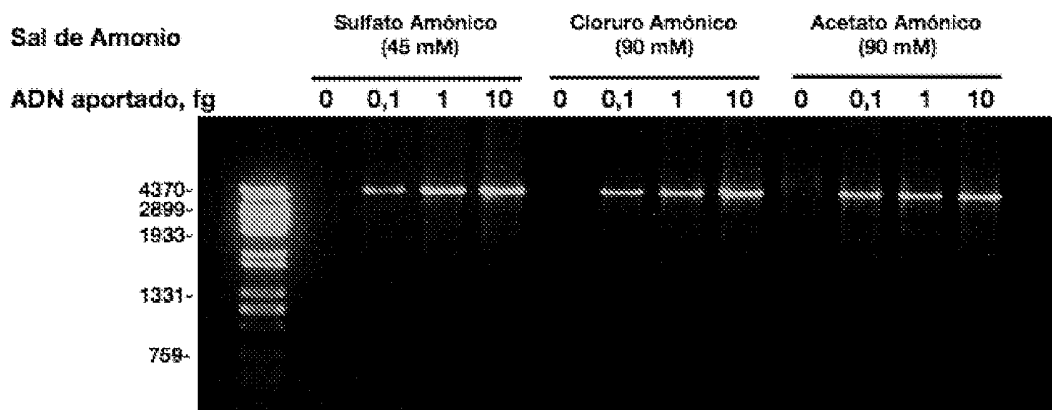


FIG. 3

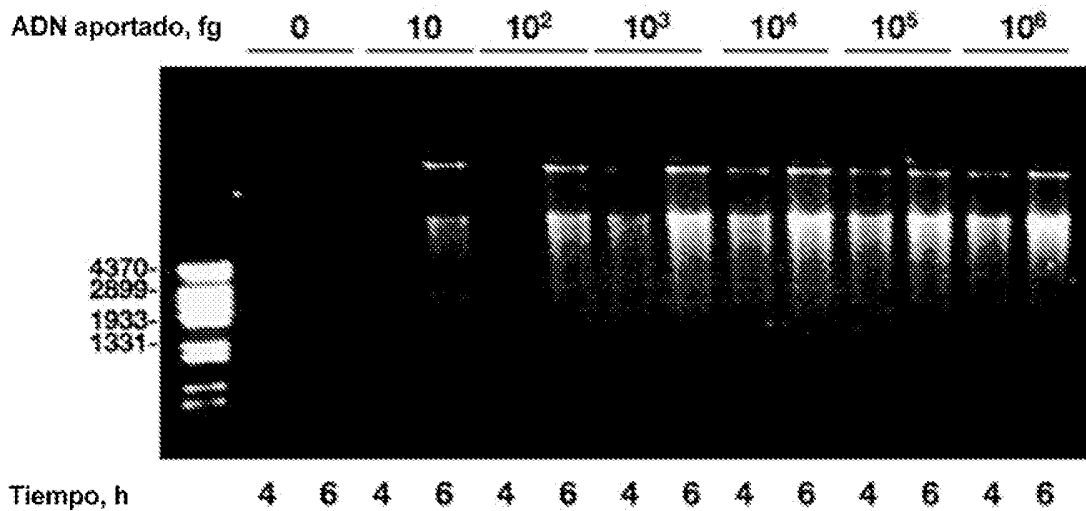


FIG. 4

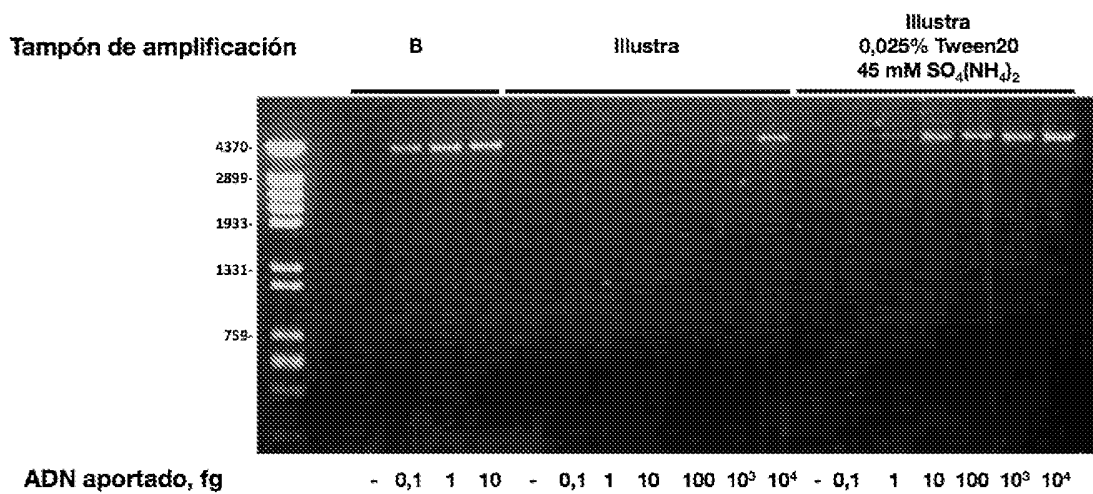


FIG. 5