

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 949**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6844 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2016** **PCT/US2016/035567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16196827**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016** **E 16804463 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 3303637**

54 Título: **Muestra para secuenciar**

30 Prioridad:

02.06.2015 US 201562169731 P

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

21.10.2021

73 Titular/es:

BIOFIRE DEFENSE, LLC (50.0%)
79 West 4500 South, Suite 14
Salt Lake City, UT 84107, US y
BIOFIRE DIAGNOSTICS, LLC (50.0%)

72 Inventor/es:

PORITZ, MARK AARON;
RIRIE, KIRK MAX;
PASKO, CHRISTOPHER PAUL;
DEMOGINES, ANN MICHELLE;
CRISP, ROBERT JOHN;
ROGATCHEVA, MARGARITA;
TRAUSCHT, ROBERT CORNELIUS;
JONES, MATTHEW KAM y
HEALY, TYLER LANE

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 867 949 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

Muestra para secuenciar

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Existe una variedad de aplicaciones diferentes en las que un resultado de la muestra a secuenciar en un período corto de tiempo sería de gran utilidad. Estas aplicaciones pueden incluir la identificación rápida, de diagnóstico inmediato realizado con pequeños analizadores de sobremesa o de laboratorio, de mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos, la secuenciación de genes virales, la identificación de tejidos con fines forenses, el histotipado para el trasplante de órganos y la identificación de alelos relacionados con las tasas del metabolismo de fármacos, por ejemplo.

Por ejemplo, para los patógenos bacterianos implicados en la septicemia, es útil saber si las bacterias portan beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que las hacen resistentes a las cefalosporinas de espectro extendido. Estas BLEE son el resultado de mutaciones en los genes TEM-1, TEM-2, SHV y otros genes de beta-lactamasas. Existen muchos otros genes que pueden conferir un fenotipo de resistencia a los antibióticos, cuya expresión o actividad está modulada por mutaciones puntuales en las regiones codificantes o reguladoras de estos genes. Si bien las mutaciones puntuales únicas conocidas son fáciles de analizar utilizando técnicas de PCR convencional, las mutaciones en genes que tienen múltiples alelos pueden ser más difíciles de identificar.

De la misma manera, existen numerosos casos en los que la secuencia de un gen viral puede indicar tanto la presencia de ese virus en una muestra humana como si ese virus es resistente a los compuestos antivirales y, de este modo, indicar qué tratamiento se debe iniciar, continuar o detener. Esto es cierto para la hepatitis C, la hepatitis B y el VIH. Si bien el tiempo para obtener resultados no es tan urgente para estas infecciones virales crónicas, el tiempo es esencial para otras infecciones virales, tales como la gripe. Con la gripe y otras infecciones virales agudas, existe un número creciente de mutaciones puntuales bien caracterizadas que confieren resistencia a los inhibidores de neuraminidasa aprobados por la FDA. Idealmente, el tratamiento con un inhibidor de neuraminidasa debe comenzar lo antes posible después de que se detecte el virus, pero es importante que se utilice el inhibidor correcto.

Además de la detección e identificación de patógenos, hay varios casos en los que es importante determinar rápidamente la secuencia de un gen o genes humanos. Estos incluyen la identificación de tejido humano con fines forenses, de manera ilustrativa, mediante el mapeo de la longitud de las repeticiones cortas en tándem (STR, *short tandem repeats*). Actualmente, esta identificación se realiza dimensionando los amplicones de PCR, pero también se puede realizar mediante secuenciación. Un procedimiento rápido de la muestra a secuenciar sería útil en muchos de estos casos.

Otro ejemplo es el tipado de HLA de un órgano para trasplante. Los órganos que se van a donar pueden provenir de una persona fallecida recientemente. Es importante que el órgano se entregue rápidamente al receptor del trasplante que tenga la mejor compatibilidad del CMH con el donante. La forma más precisa de hacer lo anterior es secuenciar los genes del CMH que gobiernan el rechazo de trasplantes y, a continuación, hacer coincidir estas secuencias con un registro nacional de tipos de CMH de los receptores. Un procedimiento rápido de la muestra a secuenciar sería útil en muchos casos de donación de órganos.

Aún otro ejemplo es la identificación de los alelos del citocromo P450 que determinan las tasas de metabolismo de los fármacos. Se sabe que las enzimas del citocromo P450 en el hígado metabolizan compuestos extraños para su excreción. Se conocen múltiples proteínas de esta familia y diferentes alelos de cada una están presentes en diferentes poblaciones e individuos. Por ejemplo, algunas personas portan alelos de las enzimas que metabolizan la warfarina muy rápido y algunas metabolizan la warfarina mucho más lentamente. Conocer el genotipo de un paciente le permite al médico decidir cuánta warfarina u otros fármacos similares se debe administrar para alcanzar un determinado nivel de fármaco en el torrente sanguíneo.

Otros ejemplos no limitantes en los que la secuenciación podría ser útil incluyen genes del cáncer, así como otros agentes infecciosos, tales como la tuberculosis. Son posibles muchos otros ejemplos, dado que son usos tanto en el diagnóstico clínico como en otros sectores.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular. Su nombre se debe a uno de sus componentes clave, una ADN polimerasa que se utiliza para amplificar un fragmento de ADN mediante replicación enzimática *in vitro*. A medida que avanza la PCR, el ADN generado (el amplicón) se utiliza en sí mismo como molde para la replicación. Esto pone en marcha una reacción en cadena en la que el molde de ADN se amplifica exponencialmente. Con la PCR, es posible amplificar una única o unas pocas copias de un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando millones de copias o más del fragmento de ADN. La PCR emplea una polimerasa termoestable, dNTP (trifosfatos de desoxinucleótidos) y un par de cebadores (oligonucleótidos). Las técnicas de PCR existentes y otros procedimientos de amplificación se pueden combinar con la secuenciación de próxima generación (NGS, *next generation sequencing*) para proporcionar

resultados rápidos de la muestra a secuenciar.

La Patente WO 2007/025340 A1 da a conocer procedimientos de amplificación y, de forma opcional, cuantificación y/o identificación de moléculas de ácido nucleico, utilizando una primera ronda de amplificación múltiple y una segunda ronda de amplificación que incorpora un indicador fluorescente.

La Patente US 2011/0076674 A1 da a conocer procedimientos para someter a tipado una cepa de un organismo mediante dos etapas de amplificación y generar una curva de fusión para cada amplicón de segunda etapa.

Las técnicas tradicionales de secuenciación de ácidos nucleicos emplean o bien escisión química en una base específica (procedimiento de Maxim-Gilbert) o bien terminación de la cadena utilizando didesoxinucleótidos (secuenciación de Sanger). La secuenciación de próxima generación implica tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, algunas de las cuales paralelizan el proceso de secuenciación, produciendo desde miles hasta millones de secuencias al mismo tiempo, a menudo detectando a medida que se añade cada nucleótido a cada hebra individual. Actualmente se encuentran disponibles varios sistemas de próxima generación.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto de la presente invención, procedimientos para la amplificación e identificación de la secuencia o las secuencias de ácido nucleico en una muestra mediante secuenciación, que comprenden las etapas de colocar la muestra en una cámara de amplificación de primera etapa, en la que la cámara de amplificación de primera etapa está configurada para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, someter la cámara de amplificación de primera etapa a condiciones de amplificación, mover la muestra a una matriz de pocillos de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada pocillo de amplificación de segunda etapa para amplificar, adicionalmente, un ácido nucleico individual que puede estar presente en la muestra, de modo que una parte de los ácidos nucleicos se mueve a cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa, realizar la amplificación de segunda etapa en los pocillos de amplificación de segunda etapa para generar un amplicón en cada pocillo de amplificación de segunda etapa si el ácido nucleico individual está presente en la muestra, y secuenciar directamente la muestra, como mínimo, en un pocillo de amplificación de segunda etapa.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos en una muestra, comprendiendo los procedimientos las etapas de colocar la muestra en una cámara de amplificación de primera etapa, en la que la cámara de amplificación de primera etapa está configurada para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, someter la cámara de amplificación de primera etapa a condiciones de amplificación, mover la muestra a una matriz de pocillos de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada pocillo de amplificación de segunda etapa para amplificar, adicionalmente, un ácido nucleico individual que puede estar presente en la muestra, de modo que una parte de la muestra se mueve a cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa, realizar una amplificación de segunda etapa en los pocillos de amplificación de segunda etapa para generar un amplicón en cada pocillo de amplificación de segunda etapa si el ácido nucleico individual está presente en la muestra, y secuenciar directamente la muestra, como mínimo, en un pocillo de amplificación de segunda etapa. En algunos casos, cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa adicionales tiene un cebador anclado al mismo, y la secuenciación puede tener lugar en los pocillos de amplificación de segunda etapa. En otros casos, todas las etapas se realizan en un solo recipiente y las dos últimas etapas se realizan en los pocillos. Aún en otros casos, el recipiente está provisto de uno o más puertos sellables, proporcionando los puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente a la cámara de amplificación de primera etapa y la matriz de pocillos de amplificación de segunda etapa, de modo que cuando el uno o más puertos sellables se sellan, el recipiente está completamente cerrado. En algunos casos, la secuenciación se puede realizar en un recipiente de muestra separado. En otros casos, todas las etapas se realizan en aproximadamente 5 horas o menos. Aún en otros casos, todos los pocillos de amplificación de segunda etapa se someten a condiciones de secuenciación. Aún en otros casos, los procedimientos pueden comprender, adicionalmente, la etapa de detectar si el amplicón se ha generado en cada pocillo de amplificación de segunda etapa para generar una señal positiva para cada pocillo de amplificación de segunda etapa en el que se ha generado el amplicón. En algunos casos, la secuenciación se realiza solo en aquellos pocillos de amplificación de segunda etapa en los que existe la señal positiva. En otros casos, la cámara de amplificación de primera etapa comprende una pluralidad de pares de cebadores de primera etapa, estando configurado cada uno de los pares de cebadores de primera etapa para amplificar uno de la pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, y en el que cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa comprende un par de cebadores de segunda etapa configurado para amplificar uno de la pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra. Aún en otros casos, como mínimo, uno de cada par de cebadores de segunda etapa está anidado dentro de su cebador de primera etapa correspondiente.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprenden las etapas de colocar la muestra en una cámara de amplificación, en la que la cámara de amplificación está configurada

para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, someter la cámara de amplificación a condiciones de amplificación, mover la muestra a una matriz de puntos, comprendiendo cada punto un conjunto de cebadores de amplificación de segunda etapa anclados al mismo, estando configurado cada conjunto de cebadores de amplificación de segunda etapa para la amplificación adicional de uno de los ácidos nucleicos individuales, realizar una amplificación de segunda etapa en la matriz para generar un amplicón en cada uno de los puntos si ese ácido nucleico individual está presente en la muestra, y someter, como mínimo, uno de los puntos a condiciones de secuenciación. En algunos casos, todas las etapas se realizan en un solo recipiente. En otros casos, el recipiente está provisto de uno o más puertos sellables, proporcionando los puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente a la cámara de amplificación y la matriz de pocillos de amplificación de segunda etapa, de modo que cuando el uno o más puertos se sellan, el recipiente está completamente cerrado. Aún en otros casos, la matriz tiene un canal de entrada y un canal de salida y la apertura y cierre del canal de entrada y el canal de salida controla el flujo de fluido a través de la matriz. En algunos casos, el cierre del canal de salida mientras el fluido entra en el canal de entrada da como resultado una burbuja de fluido sobre la matriz, y la agitación de la burbuja homogeneiza el fluido. En otros casos, los procedimientos comprenden, adicionalmente, la etapa de detectar si se ha generado el amplicón en cada punto para generar una señal positiva para cada pocillo en el que se ha generado el amplicón. Aún en otros casos, el número de puntos totales no supera los 512 puntos. En algunos casos, el número de puntos totales no supera los 256 puntos. En otros casos, el conjunto comprende ambos del par de cebadores de segunda etapa. Aún en otros casos, la amplificación de segunda etapa se realiza en presencia de una polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3' a 5'. En algunos casos, el conjunto comprende uno del par de cebadores de segunda etapa. En otros casos, la amplificación de segunda etapa se realiza en presencia de una solución que comprende el segundo de cada uno de los pares de cebadores de segunda etapa. Aún en otros casos, la muestra se trata con una polimerasa que tiene actividad exonucleasa 3' a 5' después de someter la cámara de amplificación a amplificación. En algunos casos, todos los segundos de los pares de cebadores de segunda etapa están provistos de una secuencia en 5' correspondiente a un cebador universal. En otros casos, la solución comprende, adicionalmente, el cebador universal. Aún en otros casos, todos los segundos de los pares de cebadores de segunda etapa se proporcionan a una concentración no superior a aproximadamente una décima parte de la concentración del cebador universal. En algunos casos, la muestra no se diluye entre las etapas de someter la cámara de amplificación a condiciones de amplificación y realizar la amplificación de segunda etapa. En otros casos, como mínimo, uno del par de cebadores de segunda etapa tiene una secuencia adicional correspondiente a un cebador universal, y la secuenciación se realiza mediante síntesis utilizando el cebador universal.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos que pueden estar presentes en una muestra, que comprenden las etapas de amplificar en presencia de una pluralidad de pares de cebadores externos, estando configurado cada par de cebadores externos para amplificar uno de los ácidos nucleicos y en presencia, como mínimo, de un cebador interno para cada uno de los ácidos nucleicos, para generar un amplicón para cada uno de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, y someter los amplicones a condiciones de secuenciación. En otras realizaciones, la pluralidad de pares de cebadores externos está ubicada en una cámara de reacción y los cebadores internos están ubicados en una cámara de reacción separada. Aún en otras realizaciones, la pluralidad de pares de cebadores externos y los cebadores internos están ubicados en una sola cámara de reacción.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para amplificar ácidos nucleicos en una muestra, que comprenden las etapas de colocar la muestra en una cámara de amplificación de primera etapa, en la que la cámara de amplificación comprende un par de cebadores de primera etapa configurados para amplificar un ácido nucleico que puede estar presente en la muestra, someter la cámara de amplificación a condiciones de amplificación para generar un amplicón, mover una primera parte de la muestra a una primera zona de amplificación de segunda etapa que comprende una primera pluralidad de conjuntos de cebadores de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada conjunto de cebadores de amplificación de segunda etapa para amplificar diferentes regiones que no se superponen del amplicón, mover una segunda parte de la muestra a una segunda zona de amplificación de segunda etapa que comprende una segunda pluralidad de conjuntos de cebadores de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada conjunto de cebadores de amplificación de segunda etapa para amplificar diferentes regiones que no se superponen del amplicón, y realizar la amplificación de segunda etapa en la primera zona de amplificación de segunda etapa para generar los primeros amplicones de segunda etapa y en la segunda zona de amplificación de segunda etapa para generar los segundos amplicones de segunda etapa, en los que, como mínimo, algunos de los primeros amplicones de segunda etapa se superponen, como mínimo, a algunos de los segundos amplicones de segunda etapa. El procedimiento comprende, adicionalmente, someter, como mínimo, uno de los amplicones a condiciones de secuenciación.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprenden las etapas de colocar la muestra en una cámara de amplificación, en la que la cámara de amplificación comprende un primer cebador directo, un segundo cebador directo anidado dentro del primer cebador directo y un cebador inverso, en la que el segundo cebador directo está anclado a una estructura, y someter la cámara de amplificación a condiciones de amplificación, y que comprenden, adicionalmente, someter la cámara de amplificación a condiciones

de secuenciación.

En algunas realizaciones, los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen recipientes para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de ácidos nucleicos, que comprenden una pluralidad de pares de cebadores de primera etapa en la cámara de amplificación de primera etapa, estando configurado cada par de cebadores de primera etapa para la amplificación de uno de una pluralidad de ácidos nucleicos para generar amplicones de primera etapa; una pluralidad de pares de cebadores de segunda etapa en la cámara de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada par de cebadores de segunda etapa para la amplificación, como mínimo, de una parte de una secuencia de uno de los amplicones de primera etapa para generar amplicones de segunda etapa, en los que, como mínimo, un miembro de cada uno de los pares de cebadores de segunda etapa está anclado a un soporte por el extremo 5'. En algunos casos, como mínimo, un miembro de cada uno de los pares de cebadores de segunda etapa está anidado dentro de un cebador de primera etapa correspondiente. En algunos casos, los amplicones de segunda etapa comprenden una especie molecular única. En otros casos, los recipientes comprenden, adicionalmente, uno o más puertos sellables, proporcionando el uno o más puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente a la cámara de amplificación de primera etapa y la cámara de amplificación de segunda etapa, de modo que cuando el uno o más puertos sellables se sellan, el recipiente está completamente cerrado. Aún en otros casos, la cámara de amplificación de segunda etapa comprende un canal de entrada y un canal de salida y la apertura y el cierre del canal de entrada y el canal de salida controla el flujo de fluido a través de la cámara de amplificación de segunda etapa. En algunos casos, los recipientes comprenden, adicionalmente, una cámara de lisis configurada para recibir una muestra y para preparar una muestra lisada. En otros casos, los recipientes comprenden, adicionalmente, una cámara de extracción de ácidos nucleicos configurada para recibir la muestra lisada y para extraer ácidos nucleicos de la muestra lisada. En algunos casos, la cámara de amplificación de segunda etapa comprende una matriz de pocillos, estando configurado cada pocillo para realizar una reacción de amplificación de segunda etapa. En otros casos, la cámara de amplificación de segunda etapa comprende una matriz de puntos, comprendiendo cada punto pares de cebadores de segunda etapa y estando configurado cada punto para realizar una reacción de amplificación de segunda etapa. Aún en otros casos, como mínimo, uno de los cebadores de segunda etapa está unido al punto. En algunos casos, el número de puntos totales no supera los 512 puntos. En otros casos, el número de puntos totales no supera los 256 puntos.

Los sistemas y procedimientos que se dan a conocer en el presente documento incluyen procedimientos para la amplificación y secuenciación en dos etapas de una pluralidad de ácidos nucleicos que pueden estar en una muestra, que comprenden amplificar los ácidos nucleicos en una primera mezcla que comprende una pluralidad de pares de cebadores de primera etapa, estando configurado cada par de cebadores de primera etapa para la amplificación de uno de la pluralidad de ácidos nucleicos para generar un amplicón de primera etapa para cada uno de los ácidos nucleicos que están presentes en la muestra, amplificar los amplicones de primera etapa utilizando una pluralidad de pares de cebadores de segunda etapa, estando configurado cada par de cebadores de segunda etapa para la amplificación de uno de los amplicones de primera etapa, en los que, como mínimo, uno de cada par de cebadores de segunda etapa está anidado dentro de su par de cebadores de primera etapa correspondiente, para generar una especie molecular única para cada uno de los ácidos nucleicos que están presentes en la muestra, y secuenciar las especies moleculares únicas que se generan. En otras realizaciones, las etapas de amplificación y secuenciación se realizan en una sola cámara de reacción. Aún en otras realizaciones, como mínimo, uno de cada par de cebadores de segunda etapa está anclado a un soporte sólido. En algunas realizaciones, las etapas de amplificación y secuenciación se realizan en recipientes de reacción diferentes. No se utiliza ningún filtro entre las etapas de amplificación y secuenciación para identificar el amplicón correcto.

En la descripción, a continuación, se establecerán características y ventajas adicionales de las realizaciones de la presente invención o que se pueden aprender mediante la práctica de dichas realizaciones. Las características y ventajas de dichas realizaciones se pueden realizar y obtener por medio de los instrumentos y combinaciones señalados particularmente en las reivindicaciones adjuntas. Estas y otras características resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas, o se pueden aprender mediante la práctica de las realizaciones que se exponen a continuación en el presente documento.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Con el fin de describir la manera en que se pueden obtener las ventajas y características mencionadas anteriormente y otras, se presentará una descripción más particular de la presente invención, que se dio a conocer de forma breve anteriormente, con referencia a realizaciones específicas de la misma que se ilustran en los dibujos adjuntos. Entendiendo que estos dibujos representan solo realizaciones típicas de la presente invención y, por lo tanto, no se deben considerar como una limitación de su alcance, la presente invención se describirá y explicará con especificidad y detalle adicionales mediante la utilización de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra un estuche ilustrativo para su utilización en una realización en la presente invención. Las figuras 2A-B ilustran las etapas utilizadas para la amplificación y secuenciación en un pocillo de muestra único. La figura 3 es una vista en despiece parcialmente ordenado de una segunda etapa ilustrativa del estuche de la figura 1, configurado para la secuenciación posterior a la amplificación. La figura 4 es similar a la figura 1, pero muestra una realización diferente para la matriz de segunda etapa.

Las figuras 5A-5C son similares a las figuras 2A-2B, excepto en que muestran amplificación de puente.

Las figuras 6A-6E son similares a las figuras 5A-5C, excepto en que muestran una realización diferente para su utilización con los dispositivos que se dan a conocer en el presente documento.

5 Las figuras 7A-C muestran una realización para secuenciar productos de amplificación múltiple generados a partir de un único amplicón de primera etapa. La figura 7A muestra amplicones de segunda etapa que se superponen, mientras que las figuras 7B-7C muestran una forma de dividir la amplificación de segunda etapa en reacciones de amplificación de segunda etapa.

Las figuras 8A-8C son similares a las figuras 5A-5C, excepto en que muestran una realización de cebador alternativa.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende, de forma habitual, cualquier experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden utilizar varios procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se dan a conocer en el presente documento, en el presente documento solo se dan a conocer determinados materiales y procedimientos a modo de ejemplo.

20 Diversos aspectos de la presente invención, entre los que se incluyen dispositivos, sistemas, procedimientos, etc. se pueden ilustrar con referencia a una o más de las implementaciones a modo de ejemplo. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “a modo de ejemplo” y el término “ilustrativo” significan “que sirve como ejemplo, caso o ilustración” y no se deben interpretar necesariamente como preferentes o ventajosos sobre otras implementaciones que se dan a conocer en el presente documento. Además, la referencia a una “implementación” o “realización” de la presente invención incluye una referencia específica a una o más realizaciones de la misma, y viceversa, y se pretende que proporcione ejemplos ilustrativos sin limitar el alcance de la presente invención, que se indica mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de la siguiente descripción.

30 Se observará que, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen los referentes en plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una baldosa” incluye una, dos o más baldosas. De manera similar, la referencia a una pluralidad de referentes se debe interpretar como que comprende un único referente y/o una pluralidad de referentes, a menos que el contenido y/o el contexto indiquen claramente lo contrario. De este modo, la referencia a “baldosas” no requiere necesariamente una pluralidad de tales baldosas. En cambio, se apreciará que independientemente de la conjugación, en el presente documento se contemplan una o más baldosas.

35 Tal como se utilizan en la presente solicitud, las palabras “puede” y “pueden” se utilizan en un sentido permisivo (es decir, el significado de tener el potencial de), en lugar del sentido obligatorio (es decir, el significado de deber). Además, las expresiones “que incluye”, “que tiene”, “que implica”, “que contiene”, “caracterizado por”, variantes de los mismos (por ejemplo, “incluye”, “tiene” e “implica”, “contiene”, etc.) y términos similares, tal como se utilizan en el presente documento, incluidas las reivindicaciones, serán inclusivos y/o abiertos, tendrán el mismo significado que la expresión “que comprende” y variantes de la misma (por ejemplo, “comprenden” y “comprende”) y no excluyen elementos o etapas del procedimiento adicionales, no mencionados, de manera ilustrativa.

40 Tal como se utilizan en el presente documento, términos y expresiones direccionales y/o arbitrarios, tales como “arriba”, “abajo”, “izquierda”, “derecha”, “de arriba”, “de abajo”, “superior”, “inferior”, “interior”, “exterior”, “interno”, “externo”, “del interior”, “del exterior”, “proximal”, “distal”, “directo”, “inverso” y similares se pueden utilizar únicamente para indicar direcciones y/u orientaciones relativas y no pueden pretender, por el contrario, limitar el alcance de la presente invención, que incluye la memoria descriptiva, la invención y/o las reivindicaciones.

50 También se entiende que se pueden utilizar diversas implementaciones que se dan a conocer en el presente documento en combinación con cualquier otra implementación que se da a conocer o divulga, sin apartarse del alcance de la presente invención. Por lo tanto, los productos, miembros, elementos, dispositivos, aparatos, sistemas, procedimientos, procesos, composiciones y/o kits, según determinadas implementaciones de la presente invención, pueden incluir, incorporar o comprender de otro modo propiedades, características, componentes, miembros, elementos, etapas y/o similares que se dan a conocer en otras implementaciones (incluidos sistemas, procedimientos, aparatos y/o similares) que se dan a conocer en el presente documento sin apartarse del alcance de la presente invención. De este modo, la referencia a una característica específica en relación con una implementación no se debe interpretar como limitada a aplicaciones únicamente dentro de dicha implementación.

60 Los encabezados utilizados en el presente documento son solo para fines organizativos y no se pretende que limiten el alcance de la descripción o las reivindicaciones. Para facilitar la comprensión, se han utilizado números de referencia similares, cuando ha sido posible, para designar elementos similares comunes a las figuras. Además, en la medida de lo posible, se ha utilizado una numeración similar de elementos en diversas figuras. Además, cada una de las configuraciones alternativas de un elemento particular pueden incluir letras separadas adjuntas al número de elemento.

65

El término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para significar, aproximadamente, en la región de, en líneas generales o alrededor. Cuando el término “aproximadamente” se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una variación del 5%. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante la utilización del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Además, se entenderá que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

La palabra “o”, tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier miembro de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Por “muestra” se entiende un animal; un tejido u órgano de un animal; una célula (ya sea dentro de un individuo, tomada directamente de un individuo o una célula mantenida en un cultivo o de una línea celular cultivada); un lisado celular (o fracción de lisado) o extracto celular; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de una célula, material celular o material viral (por ejemplo, un polipéptido o ácido nucleico); un virus; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de un virus; un parásito; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de un parásito; una bacteria, una solución que contiene una o más moléculas derivadas de una bacteria, un hongo; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de un hongo; una planta; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de una planta; o una solución que contiene un ácido nucleico, que se analiza tal como se describe en el presente documento. Una muestra también puede ser cualquier fluido o excreción corporal (por ejemplo, sin constituir limitación, sangre, orina, heces, saliva, lágrimas, bilis, líquido cefalorraquídeo, mucosidad, pus, sudor) que contiene células, componentes celulares o ácidos nucleicos.

La expresión “ácido nucleico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido natural o sintético, ya sea ADN o ARN o híbrido de ADN-ARN, monocatenario o bicatenario, sentido o antisentido, que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico mediante apareamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos también pueden incluir análogos de nucleótidos (por ejemplo, BrdU) y enlaces internucleosídicos distintos de fosfodiéster (por ejemplo, enlaces de ácido nucleico peptídico (PNA) o tiodiéster), o el alfabeto genético expandido descrito, por ejemplo, por Benner en la Patente US 8,354,225, “Amplification of oligonucleotides containing non-standard nucleobases” y la Patente US 8,871,469 “Self-avoiding molecular recognition systems in DNA priming”. En particular, los ácidos nucleicos pueden incluir, sin constituir limitación, ADN, ARN, ADNc, ADNg, ADNmc, ADNbc o cualquier combinación de los mismos.

Por “sonda”, “cebador” u “oligonucleótido” se entiende una molécula de ácido nucleico monocatenario de secuencia definida que puede experimentar apareamiento de bases con una segunda molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia complementaria (la “diana”). La estabilidad del híbrido resultante depende de la longitud, el contenido de GC y el grado de apareamiento de bases que se produce. El grado de apareamiento de bases se ve afectado por parámetros tales como el grado de complementariedad entre la sonda y las moléculas diana y el grado de rigurosidad de las condiciones de hibridación. El grado de rigurosidad de la hibridación se ve afectado por parámetros tales como la temperatura, la concentración de sal y la concentración de moléculas orgánicas, tales como formamida, y se determina mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las sondas, los cebadores y los oligonucleótidos se pueden marcar de forma detectable, ya sea de forma radiactiva, fluorescente o no radiactiva, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Se pueden utilizar colorantes de unión a ADNbc para detectar ADNbc. Se entiende que un “cebador” está configurado específicamente para ser extendido por una polimerasa, mientras que una “sonda” o un “oligonucleótido” puede estar configurado o no de esta manera.

Por “colorantes de unión a ADNbc” se entienden los colorantes que emiten una fluorescencia de forma diferente cuando se unen a ADN bicatenario con respecto a cuando se unen a ADN monocatenario o están libres en solución, normalmente emitiendo fluorescencia de forma más intensa. Aunque se hace referencia a colorantes de unión a ADNbc, se entiende que en el presente documento se puede utilizar cualquier colorante adecuado, con algunos colorantes ilustrativos no limitantes que se dan a conocer en la Patente US 7,387,887. También se pueden utilizar otras sustancias productoras de señales para detectar la amplificación y fusión de ácidos nucleicos, de manera ilustrativa, enzimas, anticuerpos, etc., tal como se conocen en la técnica.

Por “se hibrida específicamente” se entiende que una sonda, un cebador u oligonucleótido reconoce e interactúa físicamente (es decir, experimenta apareamiento de bases) con un ácido nucleico sustancialmente complementario (por ejemplo, un ácido nucleico de muestra) en condiciones de alta rigurosidad y no experimenta apareamiento de bases sustancialmente con otros ácidos nucleicos.

Por “condiciones de alta rigurosidad” se entienden las condiciones configuradas para permitir la identificación de secuencias de ácido nucleico diana. Tales condiciones ocurren normalmente a una T_f de aproximadamente menos 5 °C (5 °C por debajo de la T_f de la sonda). Funcionalmente, se utilizan condiciones de alta rigurosidad para

identificar secuencias de ácido nucleico que tienen, como mínimo, el 80% de identidad de secuencia.

Si bien la PCR es el procedimiento de amplificación utilizado en los ejemplos del presente documento, se entiende que cualquier procedimiento de amplificación que utilice un cebador puede ser adecuado. Tales procedimientos adecuados incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); amplificación por desplazamiento de hebra (SDA, *strand displacement amplification*); amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA, *nucleic acid sequence-based amplification*); amplificación de círculo rodante en cascada (CRCA, *cascade rolling circle amplification*), amplificación isotérmica de ADN mediada por bucle (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification of DNA*); amplificación isotérmica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores quiméricos (ICAN, *isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids*); amplificación dependiente de helicasa basada en la diana (HDA, *target based-helicase dependent amplification*); amplificación mediada por transcripción (TMA, *transcription-mediated amplification*) y similares. Por lo tanto, cuando se utiliza el término PCR, se debe entender que incluye otros procedimientos de amplificación alternativos. Para procedimientos de amplificación sin ciclos discretos, se puede utilizar el tiempo de reacción cuando las mediciones se realizan en ciclos o Cp, y se puede añadir tiempo de reacción adicional cuando se añaden ciclos de PCR adicionales en las realizaciones que se dan a conocer en el presente documento. Se entiende que es posible que los protocolos se deban ajustar en consecuencia.

En algunas realizaciones, la PCR incluye cualquier procedimiento de PCR adecuado. Por ejemplo, la PCR puede incluir la PCR múltiple en la que se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar diversas secuencias de ácido nucleico diferentes simultáneamente. La PCR múltiple puede utilizar múltiples conjuntos de cebadores y puede amplificar diversas secuencias de ácido nucleico diferentes al mismo tiempo. En algunos casos, la PCR múltiple puede emplear múltiples conjuntos de cebadores dentro de una única reacción de PCR para producir amplicones de diferentes secuencias de ácido nucleico que son específicas para diferentes secuencias de ácido nucleico diana. La PCR múltiple puede tener la característica útil de generar amplicones de diferentes secuencias de ácido nucleico diana con una única reacción de PCR en lugar de múltiples reacciones de PCR individuales.

Tal como se utiliza en el presente documento, "secuenciación" significa identificar la secuencia de un ácido nucleico, incluida la identificación de la secuencia de una o ambas hebras del ácido nucleico, para determinar un orden secuencial de las bases individuales. La "secuenciación de próxima generación" es la secuenciación realizada en una pluralidad de reacciones paralelas simultáneas.

En el presente documento se utiliza la siguiente nomenclatura para los oligonucleótidos:

U = Cebador universal - secuencia común compartida por todos los cebadores en una reacción particular

S = Cebador específico - único para un ensayo objetivo determinado

Subíndices:

o = externo - cebador utilizado en la amplificación de primera etapa para generar el amplicón externo

i = interno - un cebador anidado que se utiliza en la reacción de amplificación de segunda etapa. Este cebador se puede superponer parcialmente al cebador externo que se utilizó para generar el amplicón exterior, pero se encuentra parcial o totalmente dentro del amplicón exterior

ii = interno de interno - un cebador que se anida dentro del cebador interno anidado. Este cebador se puede superponer parcialmente a este cebador interno o asentarse completamente dentro del cebador interno

F = directo y R = inverso - son los dos cebadores que definen un amplicón de PCR. Se entiende que la orientación es arbitraria

x = índice de un oligonucleótido específico particular en el múltiple ($1 \leq x \leq n$)

Por ejemplo: $U_R S_{iR4}$ es un cebador universal inverso en el extremo 5' del cebador específico inverso interno del amplicón número 4.

Aunque varios ejemplos en el presente documento hacen referencia a dianas humanas y patógenos humanos, estos ejemplos son solo ilustrativos. Los procedimientos, kits y dispositivos que se dan a conocer en el presente documento se pueden utilizar para detectar y secuenciar una amplia variedad de secuencias de ácido nucleico de una amplia variedad de muestras, entre las que se incluyen, sin constituir limitación, muestras de seres humanos, muestras de animales, muestras veterinarias, muestras vegetales, muestras de algas, muestras de alimentos, muestras industriales, muestras de virus, muestras de hongos, muestras de bacterias, muestras de parásitos y muestras ambientales. Los procedimientos, kits y dispositivos que se dan a conocer en el presente documento se pueden utilizar para detectar y secuenciar una amplia variedad de secuencias de ácido nucleico de una amplia variedad de aplicaciones, entre las que se incluyen, sin constituir limitación, detección de resistencia a los antibióticos, detección de genes virales, análisis forense, histotipado, trasplante de órganos, metabolismo de fármacos, terrorismo biológico, seguridad alimentaria, seguridad ambiental, agricultura y ecología.

Diversas realizaciones que se dan a conocer en el presente documento utilizan un estuche de análisis de ácidos nucleicos autónomo para analizar una muestra para determinar la presencia y/o identificación de diversas sustancias biológicas, de manera ilustrativa, antígenos y secuencias de ácido nucleico, de manera ilustrativa, en un único sistema cerrado. Dichos sistemas, que incluyen estuches e instrumentos para su utilización con los estuches, se dan a conocer con más detalle en las Patentes US 8,394,608; y US 8,895,295; y la Patente US 2014-0283945. Sin embargo, se entiende que tales estuches son solo ilustrativos, y las reacciones de PCR que se describen en el presente documento se pueden realizar en cualquiera de una variedad de recipientes de muestras de sistema abierto o cerrado, tal como se conocen en la técnica, entre los que se incluyen placas de 96 pocillos, placas de otras configuraciones, matrices, carruseles y similares, utilizando una variedad de sistemas de amplificación, tal como se conocen en la técnica. Aunque las expresiones “pocillo de muestra”, “pocillo de amplificación”, “recipiente de amplificación” o similares se utilizan en el presente documento, se pretende que estas expresiones abarquen pocillos, tubos, chips de ADN y diversos de otros recipientes de reacción, tal como se utilizan en estos sistemas de amplificación. En una realización, el estuche se utiliza para analizar múltiples ácidos nucleicos diana. El estuche puede incluir uno o más blísteres utilizados como pocillos de muestra, de manera ilustrativa, en un sistema cerrado. De manera ilustrativa, se pueden realizar diversas etapas en el estuche, opcionalmente desechable, entre las que se incluyen la preparación de ácidos nucleicos, la PCR múltiple primaria de gran volumen, la dilución del producto de amplificación primaria y la PCR secundaria, culminando con la detección en tiempo real opcional o el análisis posterior a la amplificación, tal como el análisis de la curva de fusión y la secuenciación de ácidos nucleicos. Además, se entiende que, aunque las diversas etapas se pueden realizar en estuches, se pueden omitir una o más de las etapas para determinadas utilidades y la configuración del estuche se puede alterar en consecuencia.

La figura 1 muestra un estuche 510 ilustrativo que se puede utilizar en diversas realizaciones, o se puede reconfigurar para diversas realizaciones. El estuche 510 es similar a la figura 15 de la Patente US 8,895,295, con elementos similares numerados de la misma manera. El montaje 590 está provisto de canales de entrada 515a a 515l, que también sirven como depósitos de reactivos o depósitos de residuos. De manera ilustrativa, los reactivos se pueden liofilizar en el montaje 590 y rehidratar antes de su utilización. Los blísteres 522, 544, 546, 548, 564 y 566, con sus canales 538, 543, 552, 553, 562 y 565 respectivos, son similares a los blísteres con el mismo número de la figura 15 de la patente US 8,895,295. La zona de reacción de segunda etapa 580 de la figura 1 es similar a la de la Patente US 8,895,295, pero los pocillos de segunda etapa 582 de la matriz de alta densidad 581 están dispuestos en un patrón algo diferente. El patrón más circular de la matriz de alta densidad 581 de la figura 1 elimina los pocillos en las esquinas y puede dar como resultado un llenado más uniforme de los pocillos de segunda etapa 582. Tal como se muestra, la matriz de alta densidad 581 está provista de 102 pocillos de segunda etapa 582. El estuche 510 es adecuado para su utilización en el instrumento FilmArray (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT). Sin embargo, se entiende que la realización del estuche es solo ilustrativa.

El estuche 510 se puede utilizar de una manera similar a la que se da a conocer en la Patente US 8,895,295. En una realización ilustrativa, se inyecta una mezcla de 300 µl que comprende la muestra que se va a analizar (100 µl) y tampón de lisis (200 µl) en el puerto de inyección (no mostrado) en el montaje 590 cerca del canal de entrada 515a, y la mezcla de muestra se introduce en canal de entrada 515a. También se inyecta agua en un segundo puerto de inyección (no mostrado) del montaje 590 adyacente al canal de entrada 515l, y se distribuye a través de un canal (no mostrado) provisto en el montaje 590, hidratando de este modo hasta once reactivos diferentes, cada uno de los cuales se proporcionó previamente en forma seca en los canales de entrada 515b a 515l. Estos reactivos pueden incluir, de manera ilustrativa, reactivos de PCR liofilizados, reactivos de extracción de ADN, soluciones de lavado, reactivos de inmunoensayo u otras entidades químicas. De manera ilustrativa, los reactivos son para extracción de ácidos nucleicos, PCR múltiple de primera etapa, dilución de la reacción múltiple y preparación de reactivos de PCR de segunda etapa, así como reacciones de control. En la realización que se muestra en la figura 1, todo lo que se necesita inyectar es la solución de muestra en un puerto de inyección y agua en el otro puerto de inyección. Después de la inyección, los dos puertos de inyección se pueden sellar. Para más información sobre diversas configuraciones del estuche 510 y el montaje 590, véase la Patente US 8,895,295.

Después de la inyección, la muestra se mueve desde el canal de inyección 515a al blíster de lisis 522 a través del canal 514. El blíster de lisis 522 está provisto de perlas cerámicas 534 y está configurado para agitar en vórtice mediante impacto utilizando paletas o palas giratorias provistas dentro del instrumento FilmArray. Una vez que las células se han lisado adecuadamente, la muestra se mueve a través del canal 538, el blíster 544 y el canal 543 al blíster 546, en el que la muestra se mezcla con perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos, tales como perlas magnéticas recubiertas de sílice 533. La mezcla se deja incubar durante un período de tiempo apropiado, de manera ilustrativa, de aproximadamente 10 segundos a 10 minutos. Un imán retráctil ubicado dentro del instrumento FilmArray adyacente al blíster 546 captura las perlas magnéticas de la solución, formando un sedimento contra la superficie interior del blíster 546. A continuación, el líquido sale del blíster 546 y se devuelve a través del blíster 544 y entra en el blíster 522, que ahora se utiliza como recipiente de residuos. Se proporcionan uno o más tampones de lavado a partir de uno o más de los canales de inyección 515c a 515e a través del blíster 544 y el canal 543 al blíster 546. Opcionalmente, el imán se retrae y las perlas magnéticas se lavan moviendo las perlas hacia atrás y hacia adelante desde los blísteres 544 y 546 a través del canal 543. Una vez que se lavan las perlas magnéticas, las perlas magnéticas se vuelven a capturar en el blíster 546 mediante la activación del imán y, a continuación, la solución de lavado se mueve al blíster 522. Este proceso se puede repetir según sea necesario para lavar el tampón de lisis y los residuos de muestra de las perlas magnéticas de unión a ácidos nucleicos.

Después del lavado, el tampón de elución almacenado en el canal de inyección 515f se mueve al blíster 548 y el imán se retrae. La solución se cicla entre los blísteres 546 y 548 a través del canal 552, rompiendo el sedimento de perlas magnéticas en el blíster 546 y permitiendo que los ácidos nucleicos capturados se disocien de las perlas y se liberen a la solución. El imán se activa una vez más, capturando las perlas magnéticas en el blíster 546, y la solución de ácido nucleico eluida se mueve al blíster 548.

La mezcla maestra de PCR de primera etapa del canal de inyección 515g se mezcla con la muestra de ácidos nucleicos en el blíster 548. Opcionalmente, la mezcla se mezcla forzando la mezcla entre 548 y 564 a través del canal 553. Después de varios ciclos de mezcla, la solución está contenida en el blíster 564, en el que se proporciona un sedimento de cebadores de PCR de primera etapa, como mínimo, un conjunto de cebadores para cada secuencia de ácido nucleico diana, y se realiza la PCR múltiple de primera etapa. Si las dianas de ARN están presentes, se puede realizar una etapa de RT (transcripción inversa, *reverse transcription*) antes de la PCR múltiple de primera etapa o simultáneamente con la misma. El ciclo de temperatura de la PCR múltiple de primera etapa en el instrumento FilmArray se realiza, de manera ilustrativa, durante 15-30 ciclos, aunque pueden ser deseables otros niveles de amplificación, dependiendo de los requisitos de la aplicación específica. La mezcla maestra de PCR de primera etapa puede ser cualquiera de diversas mezclas maestras, tal como se conoce en la técnica. En un ejemplo ilustrativo, la mezcla maestra de PCR de primera etapa puede ser cualquiera de las químicas que se dan a conocer en la Patente US 14/403,369 y WO 2013/177429, para su utilización con protocolos de PCR que tardan 20 segundos o menos por ciclo.

Después de que la PCR de primera etapa se haya realizado durante el número de ciclos deseado, la muestra se puede diluir, de manera ilustrativa, forzando la mayor parte de la muestra de regreso al blíster 548, dejando solo una pequeña cantidad en el blíster 564 y añadiendo la mezcla maestra de PCR de segunda etapa desde el canal de inyección 515i. De manera alternativa, se puede mover un tampón de dilución desde 515i al blíster 566, a continuación, se mezcla con la muestra amplificada en el blíster 564 moviendo los fluidos hacia atrás y hacia delante entre los blísteres 564 y 566. Si se desea, la dilución se puede repetir varias veces, utilizando tampón de dilución de los canales de inyección 515j y 515k, o el canal de inyección 515k se puede destinar para secuenciar, tal como se describe a continuación, y, posteriormente, añadir la mezcla maestra de PCR de segunda etapa desde el canal de inyección 515h a parte o toda la muestra amplificada diluida. Se entiende que el nivel de dilución se puede ajustar alterando el número de etapas de dilución o alterando el porcentaje de la muestra descartada antes de mezclarla con el tampón de dilución o la mezcla maestra de PCR de segunda etapa que comprende componentes para la amplificación, de manera ilustrativa, una polimerasa, dNTP y un tampón adecuado, aunque otros componentes pueden ser adecuados, en particular para procedimientos de amplificación distintos de la PCR. Si se desea, esta mezcla de la muestra y la mezcla maestra de PCR de segunda etapa se puede precalentar en el blíster 564 antes de moverla a los pocillos de segunda etapa 582 para la amplificación de segunda etapa. Dicho precalentamiento puede obviar la necesidad de un componente de inicio en caliente (anticuerpo, producto químico o de otro tipo) en la mezcla de PCR de segunda etapa.

La mezcla maestra de PCR de segunda etapa ilustrativa está incompleta, carece de pares de cebadores y cada uno de los 102 pocillos de segunda etapa 582 está precargado individualmente con un par de cebadores de PCR específico. Si se desea, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa puede carecer de otros componentes de reacción, y estos componentes también se pueden precargar en los pocillos de segunda etapa 582. Cada par de cebadores puede ser similar o idéntico a un par de cebadores de PCR de primera etapa o puede estar anidado dentro del par de cebadores de primera etapa. Se entiende que los cebadores anidados son cebadores que se hibridan con el amplicón de primera etapa en una posición que es interna a la ubicación de hibridación de los cebadores de primera etapa. Un cebador anidado se puede superponer parcialmente al cebador de primera etapa, pero el extremo 3' está ubicado internamente al extremo 3' del cebador de primera etapa. El movimiento de la muestra desde el blíster 564 a los pocillos de segunda etapa 582 completa la mezcla de reacción de PCR. Una vez que se llena la matriz de alta densidad 581, las reacciones de segunda etapa individuales se sellan en sus blísteres de segunda etapa respectivos mediante cualquiera de varios medios, tal como se conoce en la técnica. Las formas ilustrativas de llenar y sellar la matriz de alta densidad 581 sin contaminación cruzada se dan a conocer en la Patente US 8,895,295. De manera ilustrativa, las diversas reacciones en los pocillos 582 de la matriz de alta densidad 581 se someten a ciclado térmico simultáneamente para llevar a cabo la reacción de PCR de segunda etapa, de manera ilustrativa, con uno o más dispositivos Peltier, aunque en la técnica se conocen otros medios para el ciclado térmico.

En determinadas realizaciones, la mezcla maestra de PCR de segunda etapa contiene el colorante de unión a ADNbc LCGreen® Plus para generar una señal indicativa de amplificación. Sin embargo, se entiende que este colorante es solo ilustrativo y que se pueden utilizar otras señales, entre las que se incluyen otros colorantes de unión a ADNbc y sondas que están marcadas de manera fluorescente, radioactiva, quimioluminiscente, enzimática o similar, tal como se conoce en la técnica. De manera alternativa, los pocillos 582 de la matriz 581 se pueden proporcionar sin ninguna señal, informándose los resultados a través de la secuenciación posterior.

El instrumento FilmArray ilustrativo se puede programar para realizar señales positivas o negativas para cada reacción de segunda etapa basándose en una fusión posterior a la PCR. Una señal positiva puede indicar una

reacción de PCR de segunda etapa exitosa para un pocillo 582 correspondiente. Una señal positiva también puede indicar que la calidad del amplicón generado en la reacción de PCR de segunda etapa es suficiente para permitir la secuenciación. Una señal positiva también puede indicar que la reacción de PCR de segunda etapa ha producido un amplicón que es una especie molecular sustancialmente homogénea. Una señal negativa puede indicar una reacción de PCR de segunda etapa fallida para un pocillo 582 correspondiente. Una señal negativa también puede indicar que la calidad del amplicón generado en la reacción de PCR de segunda etapa no es suficiente para permitir la secuenciación. Una señal negativa también puede indicar que la reacción de PCR de segunda etapa no ha producido un amplicón que sea una especie molecular sustancialmente homogénea. En una realización, la curva de fusión debe producir un pico de fusión (por ejemplo, máximo de la primera derivada o máximo de la primera derivada negativa) dentro de un intervalo de temperatura predefinido para que la señal sea positiva. Se entiende que este procedimiento de señal de cada reacción de segunda etapa es solo ilustrativo, y que las señales se pueden realizar utilizando datos de amplificación en tiempo real o por otros medios, tal como se conoce en la técnica, o las señales se pueden diferir hasta que se realice la secuenciación posterior.

De manera ilustrativa, si el instrumento está configurado para realizar señales positivas o negativas, el instrumento se puede programar para destinar solo aquellos pocillos que producen un resultado positivo para la secuenciación posterior. En algunas realizaciones, puede haber una unidad uno a uno entre las señales positivas y los pocillos destinados a la secuenciación. En otras realizaciones, los pocillos destinados para la secuenciación pueden no tener una unidad uno a uno con los pocillos que producen una señal positiva. Por ejemplo, la segunda etapa 580 del estuche 510 de FilmArray se puede depositar en puntos con pocillos replicados, de manera ilustrativa, pocillos duplicados o triplicados. Si uno o más de esos pocillos resultan positivos, puede ser deseable que todas las réplicas de esa secuencia diana se destinen para la secuenciación. En otras realizaciones, puede ser deseable destinar solo un pocillo para cada réplica para la secuenciación. Aún en otras realizaciones, los pocillos que se utilizan como controles se pueden destinar o no para la secuenciación posterior. Aún en otras realizaciones, todos los pocillos se pueden secuenciar, con o sin señales de amplificación positivas o negativas.

Aunque el FilmArray es útil para proporcionar resultados positivos o negativos basados en la PCR a partir de una muestra biológica en bruto, también serían útiles los procedimientos para pasar de una muestra biológica en bruto a la secuencia de dianas específicas de ARN y ADN. En una realización ilustrativa, el procedimiento se puede automatizar, puede durar menos de 8 horas, de forma más ilustrativa, menos de 5 horas, y, de forma más ilustrativa, durar 3 horas o menos, y puede proporcionar 25 o más bases de secuencia, de manera ilustrativa, hasta 200 bases de secuencia para amplicones múltiples, y, de manera ilustrativa, hasta 1.000 amplicones. De manera ilustrativa, los procesos de la muestra a secuenciar en bruto se producirán en un sistema cerrado para minimizar la posibilidad de contaminación de los amplicones.

La segunda etapa 580 del estuche 510 de FilmArray se utiliza para generar amplicones para la diana deseada. Debido a la PCR de dos etapas, se generan amplicones esencialmente homogéneos en cada uno de los pocillos de segunda etapa 582. Cada lote de amplicones en su pocillo 582 respectivo se puede secuenciar de manera independiente mediante procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada lote de amplicones se puede secuenciar mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica para la secuenciación de próxima generación (NGS), tales como Ion Torrent (Life Technologies), 454 (Roche), SOLiD (ABI), HiSeq o MiSeq (Illumina) y Pacific Biosciences.

En muchas ejecuciones exitosas de estuches de FilmArray, una señal positiva en un pocillo 582 en la matriz de segunda etapa 581 representa una especie de amplicón única sustancialmente pura. Esta especie de amplicón única no es necesariamente un clon molecular. Por ejemplo, la PCR digital, la PCR en emulsión o la clonación molecular en un plásmido son todos procedimientos que generan clones moleculares separados espacialmente de una molécula de ácido nucleico original. Por el contrario, el amplicón de segunda etapa se origina a partir de muchas moléculas de molde idénticas o estrechamente relacionadas. Sin embargo, debido al enriquecimiento y a la dilución de primera etapa, el resultado final de la PCR de segunda etapa es predominantemente una especie de amplicón única, denominada en el presente documento "especie molecular única". Se entiende que, tal como se utiliza en el presente documento, una especie molecular única no será necesariamente un clon molecular, sino que será suficientemente una especie predominante para permitir la secuenciación.

En algunas realizaciones, las curvas de fusión de los amplicones generados en la PCR de segunda etapa indican que estos amplicones son esencialmente homogéneos. Que el análisis de la curva de fusión se realice en el instrumento FilmArray con el colorante de unión a ADN bicatenario no específico LCGreen® Plus y dé como resultado picos simples e indique que el producto de PCR de segunda etapa está dominado por un amplicón único previsto y no incluye una cantidad significativa de especies de cebador-dímero o amplicones no específicos, demuestra que la amplificación múltiple anidada de dos etapas genera especies moleculares únicas.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico diana está presente en un número de copias muy bajo en una muestra. El ácido nucleico diana puede comprender una parte muy pequeña de la muestra total y/o pueden estar presentes otros ácidos nucleicos. Por ejemplo, en aplicaciones de detección de patógenos basadas en PCR, los patógenos de interés pueden estar presentes en un número de copias muy bajo en una muestra, y la muestra puede estar contaminada con un gran exceso de otros ácidos nucleicos, de manera ilustrativa, ácido nucleico

humano (por ejemplo, sangre) u otros genomas microbianos (por ejemplo, heces) y pueden dar como resultado una mezcla compleja de ácidos nucleicos. En los sistemas convencionales de detección por PCR de una sola etapa, la amplificación por PCR de una sola etapa a partir de esta mezcla compleja de ácidos nucleicos a menudo da como resultado múltiples productos no específicos además del amplicón específico deseado. Por lo tanto, los sistemas convencionales de detección por PCR de una sola etapa a menudo requieren un segundo mecanismo de detección o "filtro", además de la PCR de una sola etapa básica para aislar el amplicón correcto y/o confirmar la identificación del amplicón correcto. Este filtro puede incluir una etapa de exclusión molecular (por ejemplo, gel de agarosa o acrilamida) para identificar el amplicón diana, un procedimiento de detección basado en sonda (por ejemplo, utilizando una sonda de hidrólisis o dos sondas de hibridación) o un procedimiento de captura de secuencia utilizando captura de secuencia en una superficie (GenMark Diagnostics, Inc., Carlsbad, California) o en una perla (Luminex Corporation, Austin, Texas) que se puede clasificar.

En algunas realizaciones, debido a que la PCR de dos etapas genera amplicones que son esencialmente homogéneos, el segundo mecanismo de detección o "filtro" se puede omitir y los amplicones generados en la PCR de segunda etapa se pueden secuenciar directamente. De este modo, los amplicones generados por la PCR de segunda etapa se pueden secuenciar directamente por cualquier medio conocido en la técnica.

De manera ilustrativa, debería ser posible secuenciar la población anclando una parte del amplicón al pocillo, de manera ilustrativa, uniendo de manera covalente el amplicón o un cebador de segunda etapa al fondo del pocillo y, a continuación, utilizando un procedimiento de secuenciación de próxima generación que puede estar basado en las tecnologías NGS de Ion Torrent, 454, Illumina o ABI (SoLiD), u otros procedimientos de secuenciación, tal como se conocen en la técnica. A diferencia de otros sistemas, esta secuenciación posterior se puede conseguir automáticamente, dentro de uno o más de los pocillos de segunda etapa.

EJEMPLO 1

En este ejemplo, una hebra del amplicón está anclada al fondo del pocillo (figura 2A) antes de la secuenciación. En un ejemplo ilustrativo, una forma de proporcionar un amplicón anclado sería sintetizar uno de los oligonucleótidos (de manera ilustrativa, el cebador directo) en dos formas, una con el OH en 5' normal y la otra con una extensión en 5' que tiene un resto químico provisto en el extremo 5' que permite que se reticule con la superficie del pocillo. Existe una variedad de químicas que se conocen en la técnica para este propósito. Esto proporcionaría parte del cebador directo anclado al pocillo de reacción y algo del cebador directo libre en solución. Se entiende que el cebador directo libre en solución se proporciona para mejorar la cinética de la reacción de amplificación. Una forma ilustrativa de cargar la matriz de segunda etapa 581 sería marcar con puntos por deposición la matriz dos veces, de manera ilustrativa, utilizando un dispositivo, tal como el que se da a conocer en las Patentes WO 2013/158740 y US 14/395,002. De manera ilustrativa, la primera vez que se marca con puntos la matriz 581, los cebadores modificados químicamente 24 se añaden a cada pocillo 582 de la matriz 581. A continuación, los cebadores modificados químicamente 24 se reticulan con el pocillo 582 y, posteriormente, la reacción de acoplamiento se puede desactivar para evitar una reticulación adicional de las moléculas a la matriz. La matriz 581 se puede secar y, a continuación, marcar con puntos de nuevo con cebadores inversos 32 y, opcionalmente, con otros componentes de la PCR. Opcionalmente, los cebadores directos no modificados 26 se pueden depositar en puntos para proporcionar mayores concentraciones de cebadores para mejorar la cinética de la amplificación por PCR. Sin embargo, este procedimiento para marcar con puntos por deposición la matriz 581 es solo ilustrativo, y se entiende que los cebadores modificados químicamente 24 (tal como se muestra en la figura 2A), los cebadores directos no modificados 26 y los cebadores inversos 32 se pueden depositar en puntos a la vez, o en cualquier orden. En otras realizaciones, el cebador modificado químicamente 24 se puede depositar en puntos junto con el cebador inverso 32 o antes de la deposición del mismo, y se puede omitir el cebador directo no modificado 26. De manera ilustrativa, el cebador inverso 32 puede tener una secuencia de extensión en 5' 20 que es la misma para todos los cebadores inversos en la matriz 581. Este "cebador universal" se proporciona para su utilización posterior durante la reacción de secuenciación. En la realización ilustrativa con algún cebador directo proporcionado libre en solución, la mayor parte de la reacción de PCR se producirá en solución, pero una fracción de los amplicones 28 estará en forma de un amplicón anclado 29 que está anclado al pocillo 582 en la matriz 581 (véase la figura 2A).

Muchos de los ejemplos en el presente documento describen el anclaje de uno o más cebadores a pocillos de muestra o puntos en una matriz. Sin embargo, se entiende que cuando se analiza el anclaje, este puede incluir el anclaje a cualquier superficie sólida, incluyendo las perlas, que se pueden mover a las ubicaciones de secuenciación.

EJEMPLO 2

En este ejemplo, se describe un ejemplo ilustrativo de una geometría de la matriz de PCR de segunda etapa 580 como un chip de secuenciación. La figura 3 muestra una vista en sección transversal en despiece parcialmente ordenado de la matriz 581 ilustrativa. En esta realización ilustrativa, se construye una capa de silicio 589 en la parte inferior de la matriz 581, reemplazando, de manera ilustrativa, la segunda capa 587 (no mostrada), tal como se describe en la Patente US 8,895,295, y formando una superficie inferior en cada uno de los pocillos 582.

Tal como se mencionó anteriormente, las formas ilustrativas de llenar y sellar la matriz de alta densidad 581 sin contaminación cruzada se describen en la Patente US 8,895,295. En una realización ilustrativa, que se muestra en la figura 3, se proporciona una capa perforada 585, similar a la capa perforada 585 de la Patente US 8,895,295. La capa perforada 585 permite que el fluido pase a cada pocillo 582 en presencia de una fuerza, pero las perforaciones son lo suficientemente pequeñas como para evitar sustancialmente que el fluido pase en ausencia de la fuerza. Sin embargo, se entiende que un mecanismo químico para mantener a los cebadores en su lugar durante la rehidratación puede ser tanto o más deseable que la capa perforada en la presente realización, para proporcionar menos interferencia en la etapa de secuenciación posterior. En una realización que emplea un mecanismo químico, los cebadores directos 26 y los cebadores inversos 32 en "fase de solución" se pueden combinar con una solución de agarosa de bajo punto de fusión fundida, por ejemplo, agarosa de bajo punto de fusión UltraPure® (Life Technologies), antes de la deposición en puntos para que no se eliminen por lavado de la matriz cuando se inunda por primera vez, aunque se conocen en la técnica otros materiales para el mecanismo químico, algunos de los cuales se describen en la Patente US 8,895,295. Después de inundar la matriz de segunda etapa 581, los pocillos 582 en la matriz 581 se cierran por sellado inflando una bolsa en el instrumento, tal como se da a conocer en la Patente US 8,895,295, y empujando contra la película 518, que es igual o similar a la capa 518, tal como se describe en la Patente US 8,895,295. En realizaciones que utilizan agarosa de bajo punto de fusión, una vez que los pocillos 582 se sellan, el calentamiento de la matriz libera el cebador directo 26 y el cebador inverso 22 a la solución. La matriz 581 puede estar fabricada principalmente de silicio, o puede estar provista de una capa de silicio 589, siendo el resto de los materiales similares a la matriz 581, tal como se da a conocer en la Patente US 8,895,295, o puede estar fabricada de otros materiales y está configurada de tal manera que el líquido que fluye a través de la matriz 581 pueda entrar en los pocillos 582 e introducir nuevos productos químicos o lavar los productos químicos anteriores. Puede ser deseable dotar la matriz 581 con una profundidad de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 500 µm, pero pueden ser apropiados otros tamaños, dependiendo de la configuración y del procedimiento de secuenciación.

Con referencia a la figura 1, la zona de reacción de segunda etapa 580 está provista de dos puertos, el canal 565 y el canal 567, cada uno de los cuales se puede sellar mediante presión u otros medios. El canal 565 se proporciona para recibir fluido del blíster 566, que se muestra conectado a múltiples canales de entrada. El canal de inyección 515k puede contener materiales para la secuenciación, o puede tener una válvula o un puerto sellable, lo que permite la conexión a una fuente externa para los materiales necesarios para la secuenciación. De manera similar, el canal de inyección 515l puede recibir los materiales residuales de la secuenciación o puede estar provisto de una válvula o un puerto sellable para la conexión a un recipiente de residuos separado. De este modo, en esta realización ilustrativa, el líquido fluye desde el canal de inyección 515k, a través del canal 565, a través de todos los pocillos 582 de la matriz 581 y el canal de salida 567, hasta el depósito de residuos 515l. Se entiende que, a medida que el fluido se mueve a la zona de amplificación de segunda etapa 580, el canal de salida puede permanecer sellado. Esto formará una burbuja de fluido sobre la matriz 581, y la agitación puede crear un fluido homogeneizado por encima de la matriz. La apertura y el cierre sincronizados de los canales 565 y 567 pueden controlar el flujo de fluido a través de la matriz 581.

Posterior a la amplificación del amplicón de primera etapa 21 (figura 2A (i) y (ii)), la secuenciación se puede realizar, de manera ilustrativa, mediante las siguientes etapas:

1) Desnaturalizar el amplicón anclado 29, de manera ilustrativa, calentando y lavando la hebra no unida 30 de la matriz (figura 2A (ii) y figura 2A (iii)). Se entiende que esto también eliminará por lavado todo el amplicón no unido 28.

2) Hibridar el cebador de secuenciación 32 a la cola universal 20 y proporcionar una ADN polimerasa 34 para formar un complejo de iniciación. Eliminar por lavado el cebador de secuenciación no unido y la ADN polimerasa no unida (figura 2B (iv) y (v)).

3) Secuenciar. La secuenciación se puede realizar mediante síntesis a medida que la ADN polimerasa se mueve a lo largo de la hebra unida 29 y amplifica la secuencia de la hebra unida 29. Cada uno de los nucleótidos A, T, C y G se proporcionan individualmente y se mide la incorporación de los dNTP individuales, revelando de este modo la secuencia de nucleótidos de la hebra unida 29. La incorporación de dNTP individuales se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, generación de protones (tal como con Ion Torrent), fluorescencia o quimioluminiscencia (tal como con Roche 454), o cualquier otra señal que sea apropiada para el procedimiento de secuenciación). Se lava la matriz 581 y esto se repite hasta que se haya generado la secuencia (figura 2B (vi) y (vii)).

En una realización alternativa, la PCR se puede realizar en el estuche 510 con curvas en tiempo real y/o una masa fundida y, a continuación, cada pocillo 582 se sella y la zona de amplificación de segunda etapa 580 del estuche 510 se retira a un segundo instrumento para la secuenciación. El anclaje del cebador directo, tal como se describió anteriormente, puede ser una forma de evitar la contaminación de pocillo a pocillo, aunque pueden ser posibles otras formas, de manera ilustrativa, sellando los pocillos 582. De este modo, el anclaje puede ser opcional, dependiendo del procedimiento de secuenciación utilizado.

Se entiende que se pueden utilizar otros procedimientos de secuenciación en un sistema de este tipo. Uno de estos procedimientos ilustrativos no requeriría unir el amplicón al pocillo y preferiría utilizar un procedimiento de

secuenciación de una sola molécula (Oxford Nanopore, véase Wolna AH, et al. Electrical Current Signatures of DNA Base Modifications in Single Molecules Immobilized in the α -Hemolysin Ion Channel. *Isr J Chem.* 1 de junio de 2013; 1; 53(6-7):417-430. PubMed PMID: 24052667; PubMed Central PMCID: PMC3773884). En una realización alternativa de este tipo, el pocillo 582 de la matriz se puede conectar a una cámara con un solo canal, o integrar con la misma, y la población de amplicones de segunda etapa en el pocillo 582 se lee una base cada vez a medida que el amplicón se traslada a través del canal. Esta conexión a la cámara se podría incorporar en el estuche 510 o se podría realizar después de que se complete la ejecución de la PCR de segunda etapa (siempre que los amplicones se mantengan separados en sus pocillos individuales). De manera ilustrativa, después de la amplificación, un lado de la matriz 581 se sella sobre una capa de película que tiene un único canal de nanoporo de proteínas dispuesto sobre cada pocillo. En el otro lado del canal hay fluido adicional para que se pueda aplicar una corriente eléctrica entre el pocillo 582 y el fluido adicional y a través del canal de nanoporo de proteínas. A continuación, la secuenciación se puede realizar en los amplicones a medida que migran a través de los canales de nanoporos de proteínas según Oxford Nanopore, o mediante procedimientos similares. De manera ilustrativa, Oxford Nanopore utiliza la proteína α -hemolisina como canal de nanoporo de proteínas. El nanoporo de proteínas está dispuesto en una bicapa lipídica y tiene una abertura de tamaño suficiente para trasladar una molécula de ADN monocatenario a través de la abertura. A medida que la molécula de ADN monocatenario atraviesa el nanoporo, los protones y otros iones, que en otras circunstancias fluyen a través del nanoporo, se ven impedidos y, en consecuencia, se altera el flujo de corriente a través del nanoporo. En el sistema Oxford Nanopore, la identidad (A, T, G o C) de las bases individuales de la molécula de ADN monocatenario se puede distinguir individualmente por esta alteración en el flujo de corriente. De este modo, midiendo los cambios en el potencial eléctrico provocados por las alteraciones de la corriente correspondientes a pares de bases individuales, se puede determinar la secuencia de los nucleótidos individuales dentro de la molécula de ADN monocatenario. (Véase Maglia, Giovanni, et al. "Analysis of single nucleic acid molecules with protein nanopores". *Methods in enzymology* 475 (2010): 591-623 y Clarke, James, et al. "Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing" *Nature Nanotechnology* 4.4 (2009): 265-270). Sin embargo, se entiende que el sistema Oxford Nanopore es ilustrativo y que se contemplan otras configuraciones de secuenciación. En otra versión, similar al procedimiento desarrollado por Pacific Biosciences de Menlo Park, California, un pocillo de secuenciación comprende guías de onda de modo cero en una superficie inferior que crean un volumen de detección de luz pequeño. Cada guía de onda de modo cero está iluminada desde abajo por un haz de excitación y la guía de onda de modo cero evita que la longitud de onda de la luz pase eficientemente a través de la guía de onda, permitiendo, de este modo, que la luz atenuada del haz de excitación penetre los 20-30 nm inferiores de cada guía de onda de modo cero. Un complejo del amplicón y un complejo de ADN polimerasa se ancla, a continuación, a la parte inferior de la guía de onda de modo cero. A continuación, se añaden al pocillo nucleótidos unidos a fósforo. Cada uno de los cuatro nucleótidos se puede marcar con un fluoróforo de diferente color. A medida que el complejo de ADN polimerasa amplifica el amplicón, los nucleótidos unidos a fósforo individuales se incorporan a la hebra naciente y el color fluorescente de cada nucleótido unido a fósforo individual se puede detectar en orden secuencial para determinar la secuencia de nucleótidos del amplicón. Dado que existen múltiples polimerasas por pocillo original, la incorporación de nucleótidos en cada hebra que contiene cada polimerasa se debe sincronizar para obtener los mejores resultados.

En un ejemplo ilustrativo para demostrar que el resultado de una PCR múltiple anidada de dos etapas es una especie molecular única, se secuenciaron los amplicones de segunda etapa de una ejecución de FilmArray. Como parte de una investigación de resultados de ensayo falsos positivos en el panel BCID de FilmArray (BioFire Diagnostics), se analizó una mezcla de organismos que incluían *Candida glabrata*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mitis*, utilizando un panel BCID de FilmArray comercial y un software experimental. En los pocillos de segunda etapa de *Candida krusei* se detectó un resultado falso positivo débil con Cp muy tardíos, indicativos de una amplificación escasa.

El amplicón de cada uno de estos pocillos de segunda etapa positivos se extrajo de los estuches perforando cada uno de los pocillos de la matriz de segunda etapa con una jeringa de insulina y extrayendo la solución que contenía el amplicón. A continuación, el amplicón se amplificó en un instrumento CFX (Bio-Rad) durante 20 ciclos adicionales utilizando los mismos cebadores internos de *Candida krusei* que se utilizaron en la segunda etapa del panel BCID. A continuación, este material amplificado adicionalmente se secuenció mediante secuenciación de Sanger en un instrumento ABI. Se pudo obtener una secuencia legible utilizando los cebadores directo e inverso con puntuaciones de calidad Phred superiores a 20 para 51 nucleótidos (cebador directo) y 75 nucleótidos (cebador inverso). La tabla 1 muestra los resultados de la comparación de secuencias utilizando el algoritmo BLAST de la secuencia contigua (realizada a partir de las regiones superpuestas de las secuencias directa e inversa) contra la base de datos GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Tabla 1

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura Query	Valor E	Ident.	Número de registro
Cepa SVGS_061 de <i>Streptococcus mitis</i> , genoma completo	194	194	99 %	3e-46	97 %	CP014326.1
ST556 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , genoma completo	194	194	99 %	3e-46	97 %	CP003357.2

Descripción	Puntuación máxima	Puntuación total	Cobertura Query	Valor E	Ident.	Número de registro
Ensamblaje del genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> S_pneumo-A66_v1, cromosoma: 1	194	194	99 %	3e-46	97 %	LN847353.1
Ensamblaje del genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> NCTC7465, cromosoma: 1	194	194	99 %	3e-46	97 %	LN831051.1
Cepa NT_110_58 de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , genoma completo	194	194	99 %	3e-46	97 %	CP007593.1
Genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> A026	194	194	99 %	3e-46	97 %	CP006844.1
Borrador del genoma de <i>Streptococcus pneumoniae</i> SPN994038	194	194	99 %	3e-46	97 %	PQ312041.2

Estos datos muestran que el ensayo de *C. krusei* en la segunda etapa del panel BCID amplifica específicamente una región del genoma de *Streptococcus mitis*. Esto demuestra que se pueden obtener buenos datos de secuencia a partir de la PCR múltiple anidada de dos etapas en el panel BCID incluso cuando la PCR que produjo la secuencia tenía un Cp muy tardío, lo que indica que el amplicón no era abundante.

EJEMPLO 3

En este ejemplo, se describen realizaciones ilustrativas de secuenciación de nucleótidos en un sistema de PCR de dos etapas. Con referencia, a continuación, a la figura 4, la figura 4 es similar a la figura 1, indicando los mismos números de referencia componentes similares. En esta realización, la matriz 580 con pocillos 582 se reemplaza por una micromatriz 680 con puntos 682 (a menudo denominados características). Los puntos 682 son áreas de la matriz que tienen, como mínimo, un oligonucleótido depositado sobre las mismas. Aunque en el presente documento se utiliza, de manera ilustrativa, tener un grupo homogéneo de oligonucleótidos depositados por punto 682, se entiende que cada punto 682 puede tener los dos miembros de un par de cebadores, o puede tener un conjunto de oligonucleótidos anidados depositados sobre los mismos, y son posibles otras configuraciones. De este modo, se entiende que cada punto 682 tiene un conjunto de oligonucleótidos depositado sobre el mismo, en el que cada conjunto es una o más especies de oligonucleótidos, y el grupo es específico de una diana.

En una realización ilustrativa, una especie de oligonucleótido se deposita en cada punto 682, que se utiliza para extender un extremo de un amplicón, y una pluralidad de puntos 682 tiene cada uno una especie de oligonucleótido diferente depositada sobre los mismos. Se entiende que cada punto 682 de la matriz 680 puede tener una especie diferente, o puede haber puntos replicados (de manera ilustrativa, duplicados o triplicados), o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización ilustrativa que se describirá con más detalle, a continuación, dos miembros de un par de cebadores se depositan en el mismo punto 682 de la matriz, lo que permite una PCR de puente en ese punto, de modo que todo el punto 682 se cubre con amplicón que es anclado por un extremo o por el otro. Los secuenciadores de próxima generación de la técnica anterior que utilizan PCR de puente depositan cebadores de manera aleatoria en toda la celda de flujo, lo que permite la amplificación de cualquier miembro individual de la biblioteca que se haya depositado en la matriz. Al depositar los dos miembros de un par de cebadores en un único punto 682, se obtendrá una secuencia a partir de ese punto 682 sólo si está presente la secuencia diana. De este modo, obtener una secuencia a partir de ese punto no solo proporciona la secuencia, sino que también puede proporcionar una señal positiva para esa diana.

De manera ilustrativa, el material de sustrato para la matriz 680 puede ser vidrio. Muchas micromatrices se fabrican en una superficie de vidrio, de manera ilustrativa, porque: (1) se entiende bien la química para acoplar oligonucleótidos al vidrio a alta densidad de carga; (2) la planitud y la falta de estiramiento significa que las impresoras de matriz pueden colocar pequeños puntos muy cerca unos de otros; y (3) el vidrio tiene una autofluorescencia relativamente baja, de modo que la relación señal/ruido para un colorante fluorescente en la matriz es más fácil de detectar. La integración de una matriz de vidrio en el estuche 610 puede requerir colocar un marco duro alrededor de la matriz 680 o alrededor del estuche 610, para reducir la rotura de una matriz de vidrio 680.

Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros materiales para la matriz 680. Se conocen en la técnica procedimientos para fijar oligonucleótidos al plástico. En algunas realizaciones, una matriz de plástico puede tener uno o más de los siguientes: (1) el plástico se une fácilmente a los otros componentes de plástico y se puede integrar más fácilmente en el estuche 610, (2) se puede utilizar un plástico flexible, de modo que la matriz 681 es menos frágil si el estuche 610 se somete a tensión. Una micromatriz de plástico puede funcionar bien en el estuche 610 porque (a) se pueden fabricar puntos relativamente grandes, por lo que la señal será relativamente grande y la precisión de la deposición no es crítica (256 puntos en un área de matriz de 1 cm cuadrado = puntos cuadrados de 0,39 mm²). Un punto de este tamaño es bastante grande para los estándares de micromatriz. En comparación, los

pocillos de FilmArray comerciales son círculos de un área de 1,98 mm² (los pocillos tienen un diámetro de 1,59 mm). Los puntos más grandes generarán señales más grandes, lo que significa que la cámara para obtener imágenes de la incorporación de nucleótidos fluorescentes necesitará menos elementos de detección o el chip de silicio utilizado para detectar los cambios de pH requerirá menos transistores, lo que hará que ambos dispositivos sean menos costosos de fabricar, y (b) se sabe que los plásticos tienen autofluorescencia baja y aún se pueden unir a oligonucleótidos a una densidad relativamente alta. Se entiende que se contempla una matriz de 512 puntos o menos, o 256 puntos o menos, o cualquier número de puntos.

Se entiende que las matrices ilustrativas que se dan a conocer en el presente documento pueden tener los oligonucleótidos anclados en el extremo 5' al pocillo 682. En ese sentido, son diferentes de muchas otras matrices conocidas en la técnica, por ejemplo, matrices de Affymetrix, que tienen el oligonucleótido unido por su extremo 3' al sustrato (por ejemplo, el pocillo). Por consiguiente, las matrices de Affymetrix solo se pueden utilizar para la hibridación, no para la extensión como cebador en una reacción de amplificación, tal como en las matrices ilustrativas.

Una ADN polimerasa con una actividad exonucleasa 3' a 5' (por ejemplo, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T7 o ADN polimerasa Vent), además de actuar como ADN polimerasa, puede realizar las siguientes actividades adicionales (en presencia de dNTP): (1) eliminar bases de un saliente 3' de un ADN bicatenario y (2) degradar el ADN monocatenario para dar nucleótidos. (Véase New England BioLabs, Nueva Inglaterra. "referencia técnica y catálogo de New England BioLabs". Beverly, MA: New England Biolabs (2014) y BEBENEK, K. et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 5408). En algunas realizaciones, estas ADN polimerasas exonucleasas 3' a 5' con estas actividades adicionales son útiles en la PCR múltiple anidada de dos etapas. En determinadas realizaciones comerciales, al final de la PCR de primera etapa, la mezcla de reacción se diluye, de manera ilustrativa, de 100 a 250 veces, antes de las reacciones de segunda etapa anidadas, y se utilizan cebadores anidados internos nuevos (cebadores que están anidados dentro de los cebadores de primera etapa). Esto se hace para evitar que los cebadores de PCR de primera etapa continúen amplificando cualquier dímero de cebadores, lo que evita una línea de base ascendente no específica en la curva de amplificación y un pico de fusión grande y amplio en la PCR de segunda etapa. Un tratamiento ilustrativo de una ADN polimerasa con actividad exonucleasa 3' a 5' (por ejemplo, una ADN polimerasa *exo+*) en presencia de dNTP degradará los cebadores de primera etapa que no se han incorporado al amplicón bicatenario. Los amplicones correctos, amplicones no específicos y dímeros de cebadores son todos bicatenarios, por lo que deberían permanecer intactos. Sin los cebadores de PCR de primera etapa, los dímeros de cebadores presentes en la PCR de primera etapa no se deberían amplificar en la PCR de segunda etapa, permitiendo de este modo una dilución menor (o ninguna dilución) entre la PCR de primera etapa y la PCR de segunda etapa, lo que significa que se necesitarán menos ciclos para que aparezca un amplicón de segunda etapa por encima del fondo (tenga un *C_p* más temprano en la reacción de segunda etapa).

Además, el tratamiento con ADN polimerasa *exo+* degradará segmentos de genomas de alta complejidad (tal como el ADN genómico humano, el ARNm humano convertido en ADNc (cuando se utiliza una etapa de RT-PCR), así como los patógenos no amplificados y la contaminación que puede estar presente) que tienen un número de copias bajo. Esto puede suceder porque las condiciones de ciclado de PCR convencional (en particular, la etapa de hibridación) pueden ser lo suficientemente rápidas para evitar que el ADN de alta complejidad de baja copia se vuelva a hibridar y, de este modo, se degradará por la actividad *exo+*, aunque algunas secuencias que están presentes en números de copia más altos se pueden volver a hibridar. Una ventaja de utilizar exonucleasa en esta etapa es que reduce la complejidad de la secuencia del ADN que entra en la reacción de PCR de segunda etapa. Esto puede dar como resultado una menor amplificación no específica en la PCR de segunda etapa que podría ser detectada por un colorante de unión a ADN bicatenario, tal como LCGreen. De este modo, puede ser posible añadir ciclos adicionales a la PCR de segunda etapa con menos interferencia de señal por amplificación incorrecta.

En un ejemplo ilustrativo, en el estuche 610, se preparan dos diluciones sucesivas de aproximadamente 10 a 15 veces cada una, que equivalen a una dilución total de 100 a 225 veces, utilizando componentes de los canales de inyección 616h, 615i y/o 615j. Como alternativa a realizar este nivel de dilución, en una realización ilustrativa, se puede añadir una pequeña cantidad de polimerasa *exo+* directamente a la PCR de primera etapa al final del ciclado, de manera ilustrativa, desde el canal de inyección 615h. Esto puede requerir una digestión más prolongada debido al gran número de cebadores presentes en la PCR de primera etapa altamente multiplexada. Se entiende que la mayoría de estos cebadores siguen siendo monocatenarios, ya que solo unas pocas dianas se suelen amplificar en una ejecución única. Sin embargo, cualquier ventaja en la velocidad reducida de la PCR de segunda etapa se puede perder por el tiempo que lleva realizar esta digestión grande. De este modo, puede ser deseable realizar una dilución única, de manera ilustrativa, de 10 a 15 veces, antes de la digestión con *exo+*, o simultáneamente con la misma. De manera ilustrativa, si la enzima *exo+* es T4 o T7, la mezcla se puede incubar a de 37 a 42 °C, respectivamente, durante un tiempo suficiente para permitir que se degraden los cebadores de PCR de primera etapa. Al final de esta etapa, la mezcla se puede calentar hasta de 80 a 90 °C durante un tiempo suficiente para inactivar la enzima *exo+*. A continuación, esta mezcla se puede inundar a través de la matriz de segunda etapa 681.

En algunas realizaciones, se utiliza la ADN polimerasa Vent con exonucleasa 3' a 5' y se deben realizar etapas para evitar la inactivación de los cebadores de la PCR de segunda etapa por la polimerasa Vent. La polimerasa Vent no es termolábil, por lo que no se puede inactivar con calor antes de llevar a cabo la amplificación por PCR de segunda

etapa. Para evitar la inactivación de los cebadores de PCR de segunda etapa por la actividad exonucleasa 3' a 5' de la polimerasa Vent, la concentración de polimerasa Vent se puede titular a un nivel lo suficientemente bajo como para no degradar los cebadores de segunda etapa (véase Barnes WM. PNAS USA. 15 de marzo de 1994; 91(6):2216-20. PMID: 8134376, que describe la utilización de una mezcla de polimerasa KlenTaq y ADN polimerasa Vent, en la que KlenTaq comprende un componente principal de la mezcla y la ADN polimerasa Vent es un componente minoritario de la mezcla). También es posible utilizar cebadores de segunda etapa que contienen unas pocas bases con enlaces fosforotioato en los extremos 3' del oligonucleótido porque estas bases son resistentes a la digestión por la actividad exo+ de las ADN polimerasas exonucleasas 3' a 5' (véase Chrisey, L.A. (1991) Antisense, Research and Development 1 (1), 65-113; Spitzer, S.; Eckstein, F. (1988) Nucl. Acids. Res. 16 (24), 11691-11704. Connolly, B.A.; Potter, B.V.L.; Eckstein, F.; Pingoud, A.; Grotjahn, L. (1984) Biochemistry 23, 3443-3453; Stein, C.A.; Pal, R.; Devico, A.L.; Hoke, G.; Mumbauer, S.; Kinstler, O.; Samgadharan, M.G.; Letsinger, R.L. (1991) Biochemistry 30 (9), 2439-2444. Sayers, J.R.; Olsen, D.B.; Eckstein, F. (1989) Nucl. Acids Res. 17 (22) 9495. Manson, J.; Brown, T.; Duff, G. (1990) Lymphokine Research 9 (1), 35-42. Woolf, T.M.; Jennings, C.B.G.; Rebagliati, M.; Melton, D.A. (1990) Nucl. Acids Res. 18 (7), 1763-1769. Leiter, J. M.E.; Agrawal, S.; Palese, P.; Zamecnik, P.C. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (9), 3430-3434. Reed, J.C.; Stein, C.; Subasinghe, C.; Haldar, S.; Croce, C.M.; Yum, S.; Cohen, J. (1990) Cancer Research 50 (20), 6565-6570; Iyer, R.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. (1990) J. Am. Chem. Soc. 112, 1254-1255. Iyer, R.P.; Phillips, L.R.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. (1990) J. Org. Chem. 55, 4693-4699; Dagle, J.M.; Weeks, D.L.; Walder, J.A. (1991) Antisense, Research and Development 1 (1), 11-20. Maher, L.J.; Dolnick, B.J. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 3341-3358. Walkder, R.Y.; Walkder, J.A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5011-5015).

Además de reducir la complejidad de la reacción de PCR de segunda etapa, también se puede utilizar una ADN polimerasa exo+ para convertir amplicones de PCR de primera etapa más largos en amplicones de PCR de segunda etapa más cortos que contienen, en su extremo 3', el complemento de la secuencia de cebador universal utilizada para la secuenciación.

En algunas realizaciones, determinados procedimientos de secuenciación (por ejemplo, Illumina SBS o Ion Torrent) determinan las lecturas de secuenciación de una población clonal única. Se entiende que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) y las inserciones y deleciones (In/Del) no provocan ambigüedades en estas secuencias que se determinan a partir de una población clonal única. De este modo, comparando secuencias a través de múltiples lecturas de secuencia, los SNP y/o las In/Del se pueden ubicar en la población de moléculas secuenciadas y, a continuación, se pueden determinar los cambios específicos en el SNP y en la In/Del. En otras realizaciones, en las que las secuencias no se determinan a partir de una población clonal única, los SNP y las In/Del pueden provocar ambigüedades en las secuencias porque múltiples poblaciones de moléculas pueden contribuir a la señal de secuencia. En algunos casos, estas ambigüedades en las secuencias pueden surgir por los mismos motivos en la secuenciación de Sanger convencional. De la misma manera que en esa técnica, puede ser posible determinar la naturaleza del polimorfismo, en el sentido de que un SNP se mostrará como dos bases diferentes en una posición particular. De manera similar, una inserción de una base será evidente como una secuencia única hasta esa posición de la base y, a continuación, una mezcla de dos secuencias que son un marco de una base cambian entre sí. Puede ser posible deconvolucionar esta información para determinar los SNP y las In/Del, tal como se ha hecho para la secuenciación de Sanger.

Volviendo a la figura 4, la matriz ilustrativa 681 puede tener entre 100 y 1.000 puntos, pero son posibles más o menos puntos, en algunos casos los puntos pueden tener, de manera ilustrativa, 2 mm de diámetro con la matriz total, de manera ilustrativa, de 25 mm x 25 mm. Sin embargo, este tamaño es solo ilustrativo y se contempla cualquier número de puntos y cualquier tamaño de matriz. En una realización, los puntos en esta matriz contendrían los dos de un par de cebadores internos para un amplicón dado generado en la amplificación de primera etapa, de manera ilustrativa, en el blíster 664. De manera ilustrativa, los cebadores internos tienen cada uno en sus extremos 5' una secuencia adicional que es complementaria o bien a un cebador directo universal o bien a un cebador inverso universal (por ejemplo, similar a los cebadores de secuenciación habituales introducidos durante la producción de la biblioteca en varios procedimientos de NGS diferentes). En una realización, se puede omitir una secuencia de cebador de código de barras, tal como se utiliza habitualmente en la secuenciación de próxima generación, porque la ubicación del punto codifica la información sobre el amplicón presente en ese punto y, por lo tanto, la identidad de la secuencia que se generará en ese punto.

Después de varios ciclos (entre aproximadamente 10 y aproximadamente 26 ciclos dependiendo del ensayo específico, en los que 10 ciclos pueden ser suficientes para patógenos abundantes y 26 ciclos para que las dianas menos abundantes lleguen a la saturación de la formación del producto en la PCR de primera etapa), este material de PCR de primera etapa se inunda en la matriz 681, tal como se describió anteriormente. En un ejemplo, la muestra se transfiere a la matriz 681 mientras está caliente (de modo que los productos de la PCR se desnaturalizan) y se deja enfriar e hibridar con los cebadores en la matriz 681. La ADN polimerasa y los dNTP que entran en la zona de amplificación de segunda etapa 680 pueden extender los oligonucleótidos anclados que se hibridan. De manera ilustrativa, el producto de amplificación de primera etapa se puede diluir o se puede utilizar sin diluir, ya que la secuenciación se puede realizar después de una única ronda de extensión del oligonucleótido anclado en la matriz. Después de la extensión, el material adicional se puede empujar hacia atrás a través del canal 665 o hacia afuera a través del canal 667, y se pueden introducir nuevos tampones de PCR, enzimas y dNTP desde cualquiera o todos

los pocillos de entrada 615i, 615j y 615k. Esto elimina todo el amplicón de la solución y los cebadores de primera etapa.

Tal como anteriormente, después de la amplificación en el blíster 664, la amplificación se puede realizar en la zona de amplificación de segunda etapa 680, moviendo el amplicón 221 a la zona 680. La amplificación en la matriz 681 utilizando un cebador anclado 224 y un cebador inverso opcionalmente con una secuencia complementaria al cebador universal, tal como se describió anteriormente. Las figuras 5A-5C muestran un ejemplo que utiliza PCR de puente. La amplificación del amplicón de primera etapa 221 se produce primero utilizando la parte S_{iFx} del cebador directo 224 (figura 5A (i) - (iii)) para generar el amplicón de segunda etapa 229. La hebra inversa 230 se puede generar utilizando el cebador inverso S_{iRx} (figura 5B (iv) - (v)). Se puede utilizar una ADN polimerasa $exo+$ para reparar un extremo 234 de un amplicón de primera etapa largo, de modo que tenga la secuencia del cebador U_R en su extremo 3' (figura 5C (vi) y (vii)) para estar disponible para la secuenciación utilizando un cebador U_R . La hebra 230 incluye el complemento del cebador universal, U_F , en su extremo 3', de modo que la hebra 230 también puede ser, de manera opcional, secuencias que utilizan el cebador universal U_F utilizando procedimientos similares a los utilizados en MiSeq o HiSeq (Illumina). De manera opcional, una o ambas hebras 229, 230 se pueden secuenciar en esta realización.

La PCR de puente se puede realizar en presencia de un colorante de unión a ADNbc, tal como LCGreen® (BioFire Diagnostics, LLC), o en presencia de sondas u otros procedimientos de detección, tal como se conocen en la técnica. En una realización ilustrativa, después de la PCR de puente, la matriz se funde y se utiliza la fluorescencia del colorante de unión a ADNbc para generar una curva de fusión que puede indicar la presencia de productos amplificados específicamente. Si la reacción falla por completo, entonces no habrá curva de fusión y es posible que el proceso no continúe con la reacción de secuenciación.

Si hay amplicón en la matriz, entonces los canales 665 y 667 se pueden utilizar para introducir y retirar soluciones para la secuenciación. A continuación, la secuenciación se puede realizar mediante cualquier procedimiento convencional, incluidos los que se dan a conocer en la presente solicitud, incluyendo procedimientos como los que se dan a conocer por Illumina (véase, por ejemplo, las Patentes US 7,544,794 y 8,946,397).

Se entiende que también se pueden utilizar otros mecanismos de secuenciación. Por ejemplo, se puede emplear una realización similar a la tecnología de pirosecuenciación 454, en la que los dNTP incorporados en un punto 682 particular generan pirofosfato, y las enzimas adicionales lo convierten en ATP y luego en luz. Esta luz se detecta para revelar la secuencia de nucleótidos. De manera similar, puede ser posible utilizar tecnología de tipo Ion Torrent, en la que la señal generada es un protón y la detección es un elemento de transistor sensible al pH debajo de la matriz.

La secuenciación también se podría realizar midiendo los cambios de corriente de las moléculas que fluyen a través de un canal del estilo Nanopore incorporado en la matriz 681, o la matriz 681 se puede mover al instrumento Nanopore. En la técnica se conocen otros procedimientos de secuenciación y se contemplan en el presente documento.

En una realización alternativa, se puede utilizar el mismo estuche 610, tal como se describió anteriormente, o se pueden emplear otros recipientes para PCR de dos etapas. Sin embargo, en esta realización, solo un cebador interno de cada par de cebadores está anclado a la matriz y todos los cebadores internos están presentes en la solución de amplificación en la zona de amplificación de segunda etapa 680. Esta implementación tiene la ventaja de que la amplificación en solución junto con la amplificación en la matriz es rápida y eficiente, pero también tiene la desventaja de que todos los cebadores internos están presentes en la mezcla, por lo que se fabricarán más productos no específicos y esto puede dar como resultado que los productos unidos a cada punto no sean una especie molecular única. En esta implementación, después de la amplificación y el análisis de fusión, la matriz se puede lavar de hebras inversas y la matriz se convierte en una biblioteca de secuenciación, con la serie apropiada de sustancias químicas de secuenciación inundadas sobre el volumen delgado de la matriz y la detección, tal como se describió anteriormente. Esta realización es similar a la descrita con respecto a la figura 1, excepto en que la amplificación en la matriz 682 se realiza en una mezcla de reacción única.

De manera ilustrativa, en una realización similar, solo los cebadores directos internos específicos S_{iFx} son 324 están anclados a la matriz 681 y solo los cebadores inversos 332 están presentes en solución (figura 6A) para una amplificación adicional del amplicón de primera etapa 321. Una ventaja es que la reacción múltiple de segunda etapa tiene aproximadamente la mitad del número de cebadores presentes, lo que debería reducir la amplificación no específica. Sin embargo, también significa que las cinéticas de amplificación son más lentas ya que solo se forma una hebra en la matriz y la otra hebra solo se produce en solución (figuras 6A-6B (i) - (iv)). En esta realización, después de la amplificación y el análisis de fusión opcional (figuras 6A-6B (i) - (iv)), la matriz se lava de hebras inversas (después de la desnaturalización, figura 6B (iii) - (iv)) y la matriz funciona como una biblioteca de secuenciación, con la serie apropiada de sustancias químicas de secuenciación inundadas sobre el volumen delgado de la matriz y la detección, tal como se describió anteriormente.

Además, la amplificación no específica con los cebadores inversos de segunda etapa en solución alrededor de la

matriz 681 no debería interferir con la generación de especies moleculares únicas de un amplicón de segunda etapa en cada punto 682 en la matriz 681, ya que la complejidad de la secuencia del material que entra en esta reacción de segunda etapa se ha reducido por el enriquecimiento de la PCR de primera etapa. Sin embargo, se entiende que se pueden realizar etapas adicionales, juntas o por separado, para garantizar la especie molecular única. En una de estas etapas, se puede utilizar una ADN polimerasa exo^+ 3' a 5', tal como se describió anteriormente, para reducir aún más la complejidad de la secuencia del material de entrada.

En otro ejemplo ilustrativo, la especificidad de la PCR se puede aumentar utilizando procedimientos, tales como el procedimiento Templex de Genaco Biomedical Products, Inc. (Han J. et al. JCM. noviembre de 2006; 44 (11): 4157-62. PMID: 17005760). En esta realización ilustrativa, los cebadores 332 presentes en solución sobre la matriz 681 incluyen una secuencia universal inversa 330 que se une en el lado 5' de los cebadores internos específicos (se observa mejor en las figuras 6C-6D). De manera ilustrativa, estos cebadores están presentes en de una décima a una centésima parte de la concentración normal presente en una PCR convencional (convencional es de 0,4 a 0,8 μ M). La creación de dímeros de cebadores requiere un complejo trimolecular de dos cebadores y ADN polimerasa, y la velocidad de formación de este complejo es función de la concentración de los cebadores. De este modo, si cada uno de los cebadores está presente en una décima parte de la concentración en una PCR convencional, entonces la velocidad de formación del dímero de cebadores se debe reducir hasta una centésima parte. Además de los cebadores $U_{R}Si_{IR}$ 332 presentes a baja concentración, hay un cebador adicional, la secuencia U_R , presente a la concentración del cebador convencional. Después de algunos ciclos (de manera ilustrativa, de 3 a 10 ciclos) de PCR realizada con tiempos de extensión largos para que los cebadores $U_{R}Si_{IR}$ de baja concentración tengan tiempo de hibridarse con sus dianas (figuras 6C-6D (v)-(viii)), hay suficiente complemento de la secuencia U_R en los amplicones nacientes 329. En este punto, de manera opcional, los cebadores $U_{R}Si_{IR}$ se pueden eliminar por lavado y se puede introducir una ADN polimerasa exo^+ para reparar el amplicón 329 para generar el amplicón 329a, de modo que contenga una secuencia complementaria al cebador universal 320 (figuras 6D-6E (viii)-(ix)). A continuación, se puede introducir un único cebador U_R a la concentración alta para hibridarse con sus moldes (figura 6E (xi)) y el ciclado de la PCR puede continuar con tiempos de hibridación y extensión convencionales. El resultado neto es que la especificidad de la PCR de segunda etapa aumenta y, de este modo, es más probable que cada característica de la matriz sea una especie molecular única. De este modo, se obtiene una mayor especificidad a cambio de unos pocos ciclos más lentos en la primera parte de la PCR.

En un tercer ejemplo, una extensión adicional del procedimiento Templex utiliza el "sistema de reconocimiento molecular de auto-evitado" (SAMRS, *self-avoiding molecular recognition system*) y el "sistema de información genética expandido artificialmente" (AEGIS, *artificially expanded genetic information system*) de Benner (Glushakova et al. J. Virol. Methods. marzo de 2015; 214: 60-74. PMID: 25680538). Esto permite una amplificación por PCR múltiple limpia de alto nivel en formatos de PCR anidados. Esto se puede implementar directamente, tal como se describe en la reacción múltiple de segunda etapa en la zona de reacción de segunda etapa 680.

EJEMPLO 4

A continuación, se describe la secuenciación de múltiples regiones anidadas dentro de un amplicón de PCR de primera etapa. En algunas situaciones, será ventajoso determinar la secuencia de muchas regiones del amplicón de PCR de primera etapa, derivado de manera ilustrativa de diferentes amplicones de segunda etapa anidados dentro de la diana de la PCR de primera etapa. Por ejemplo, las mutaciones en TEM de beta-lactamasa que confieren el fenotipo BLEE se pueden diseminar a través del gen. Se puede amplificar una gran parte del gen en la reacción de amplificación de primera etapa y, a continuación, amplificar diversas regiones más pequeñas en la PCR de segunda etapa.

En un ejemplo ilustrativo, se generan amplicones superpuestos en la PCR de segunda etapa. Cuando se realiza en reacciones discretas, tal como en los pocillos 582 del dispositivo de la figura 1, estos amplicones superpuestos se pueden generar fácilmente. En la matriz 681 de la figura 4, la especificidad de la amplificación proviene de los cebadores unidos al punto de matriz 682. Sin embargo, los cebadores en solución y los cebadores en las puntos 682 se pueden superponer (véase la figura 7A (i)-(ii)), de tal manera que, en lugar de hacer un conjunto discreto de amplicones de segunda etapa superpuestos (I1 a I5 en la figura 7A, (i)), se pueden generar amplicones incluso más cortos (por ejemplo, entre Si_{Fb1} y Si_{Ra1} , lo que generaría un amplicón que es solo la parte de I1 e I2 que se superpone) que no se superponen y que no cubren completamente la secuencia.

Este problema se puede evitar dividiendo la PCR de segunda etapa en dos compartimentos, ambos similares a la zona de amplificación de segunda etapa 680, con dos conjuntos de reacciones (figuras 7B y 7C). En esta implementación, los amplicones generados en la segunda etapa A (figura 7B (iv)) no se superponen, de modo que se minimizan o eliminan los amplicones cortos no deseados. Los amplicones intermedios se generan en la segunda etapa B (figura 7B (v)) y, de manera similar, no se superponen, de modo que los amplicones cortos no deseados se minimizan o eliminan de manera similar.

EJEMPLO 5

Esta implementación es similar al ejemplo 3 anterior, excepto en que todos los cebadores internos están presentes en la mezcla (figura 8A). Esto tiene la ventaja de que la amplificación en solución junto con la amplificación en la

matriz es rápida y eficiente (figura 8B). Para añadir un filtro opcional para la especificidad de la especie molecular única que se sintetiza en la matriz 681, los cebadores de captura pueden ser "internos de internos". Los cebadores internos de internos S_{iiF_x} se hibridan con una secuencia interna de los cebadores internos basados en solución S_{iF_x} , que es interna a los cebadores externos S_{oF_x} (véase la figura 8A (i)). El cebador interno de interno S_{iiF_x} se puede superponer parcialmente con el cebador interno S_{iF_x} en esa dirección siempre que unas pocas bases (de manera ilustrativa, como mínimo, 4 bases) sean internas a la secuencia de S_{iF_x} (o en 3' de la misma). La PCR basada en solución se lleva a cabo utilizando los cebadores internos S_{iF_n} y $U_R S_{iRn}$, tal como se muestra en la figura 8B (iv), y simultáneamente en la matriz 682, tal como se muestra en la figura 8B (iii), lo que da como resultado un amplicón anclado que tiene el cebador universal apropiado, tal como se muestra en la figura 8C (v). En esta realización, debido a que se proporciona una especificidad adicional utilizando los dos conjuntos de cebadores anidados S_{iF_x} y S_{iiF_x} , se entiende que la amplificación de primera etapa con S_{oF_x} es opcional, y que toda la amplificación puede tener lugar en una única cámara de amplificación. La preparación de la matriz 681 para la secuenciación se puede realizar según cualquiera de los procedimientos que se dan a conocer anteriormente.

15

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la amplificación e identificación de la secuencia o las secuencias de ácido nucleico en una muestra mediante secuenciación, que comprende las etapas de:

- (a) colocar la muestra en una cámara de amplificación de primera etapa, en la que la cámara de amplificación de primera etapa está configurada para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra;
- (b) someter la cámara de amplificación de primera etapa a condiciones de amplificación;
- (c) mover la muestra a una matriz de pocillos de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada pocillo de amplificación de segunda etapa para amplificar, adicionalmente, un ácido nucleico individual que puede estar presente en la muestra, de modo que una parte de la muestra se mueve a cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa;
- (d) realizar una amplificación de segunda etapa en los pocillos de amplificación de segunda etapa para generar un amplicón en cada pocillo de amplificación de segunda etapa si el ácido nucleico individual está presente en la muestra, y
- (e) secuenciar directamente la muestra, como mínimo, en un pocillo de amplificación de segunda etapa.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa adicionales tiene un cebador anclado al mismo, y la secuenciación tiene lugar en los pocillos de amplificación de segunda etapa.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) hasta (e) se realizan en un solo recipiente y en el que las etapas (d) y (e) se realizan en los pocillos, de manera preferente, en el que el recipiente está provisto de uno o más puertos sellables, proporcionando los puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente a la cámara de amplificación de primera etapa y la matriz de los pocillos de amplificación de segunda etapa, de modo que cuando el uno o más puertos sellables se sellan, el recipiente está completamente cerrado.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) se realiza en un recipiente de muestra separado.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) hasta (e) se realizan en aproximadamente 5 horas o menos.

6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que todos los pocillos de amplificación de segunda etapa se someten a condiciones de secuenciación.

7. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende, adicionalmente, la etapa de detectar si el amplicón se ha generado en cada pocillo de amplificación de segunda etapa para generar una señal positiva para cada pocillo de amplificación de segunda etapa en el que se ha generado el amplicón.

8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) se realiza solo en aquellos pocillos de amplificación de segunda etapa en los que existe la señal positiva.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la cámara de amplificación de primera etapa comprende una pluralidad de pares de cebadores de primera etapa, estando configurado cada par de cebadores de primera etapa para amplificar uno de la pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, y en el que cada uno de los pocillos de amplificación de segunda etapa comprende un par de cebadores de segunda etapa configurado para amplificar uno de la pluralidad de ácidos nucleicos individuales que pueden estar presentes en la muestra, de manera preferente, en el que, como mínimo, uno de cada par de cebadores de segunda etapa está anidado dentro de su cebador de primera etapa correspondiente.

10. Recipiente para su utilización en el procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el recipiente comprende:

una pluralidad de pares de cebadores de primera etapa en la cámara de amplificación de primera etapa, estando configurado cada par de cebadores de primera etapa para la amplificación de uno de la pluralidad de ácidos nucleicos para generar amplicones de primera etapa; y una pluralidad de pares de cebadores de segunda etapa en la cámara de amplificación de segunda etapa, estando configurado cada par de cebadores de segunda etapa para la amplificación, como mínimo, de una parte de una secuencia de uno de los amplicones de primera etapa para generar amplicones de segunda etapa, en el que, como mínimo, un miembro de cada uno de los pares de cebadores de segunda etapa está anclado a un soporte por el extremo 5'.

11. Recipiente, según la reivindicación 10, en el que, como mínimo, un miembro de cada par de cebadores de segunda etapa está anidado dentro de un cebador de primera etapa correspondiente.

12. Recipiente, según la reivindicación 10, en el que los amplicones de segunda etapa comprenden una especie

molecular única.

5 13. Recipiente, según la reivindicación 10, que comprende, adicionalmente, uno o más puertos sellables, proporcionando el uno o más puertos sellables el único acceso desde el exterior del recipiente a la cámara de amplificación de primera etapa y la cámara de amplificación de segunda etapa, de modo que cuando el uno o más puertos sellables se sellan, el recipiente está completamente cerrado.

10 14. Recipiente, según la reivindicación 10, en el que la cámara de amplificación de segunda etapa comprende un canal de entrada y un canal de salida y la apertura y el cierre del canal de entrada y el canal de salida controla el flujo de fluido a través de la cámara de amplificación de segunda etapa.

15 15. Recipiente, según la reivindicación 10, que comprende, adicionalmente, una cámara de lisis configurada para recibir una muestra y para preparar una muestra lisada, de manera preferente, que comprende, adicionalmente, una cámara de extracción de ácidos nucleicos configurada para recibir la muestra lisada y para extraer los ácidos nucleicos de la muestra lisada.

20 16. Recipiente, según la reivindicación 10, en el que la cámara de amplificación de segunda etapa comprende una matriz de pocillos, estando configurado cada pocillo para realizar la reacción de amplificación de segunda etapa.

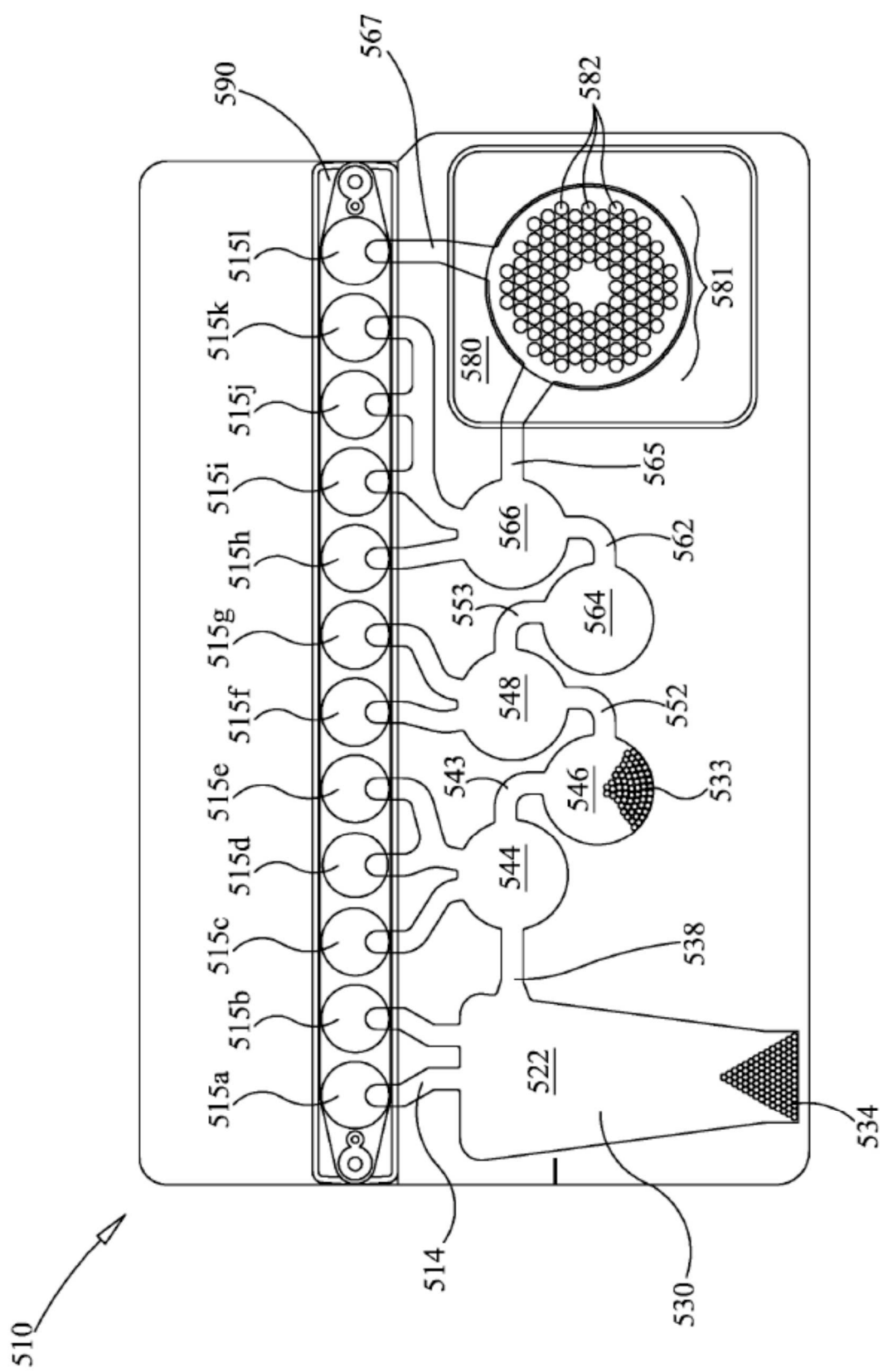


FIG. 1

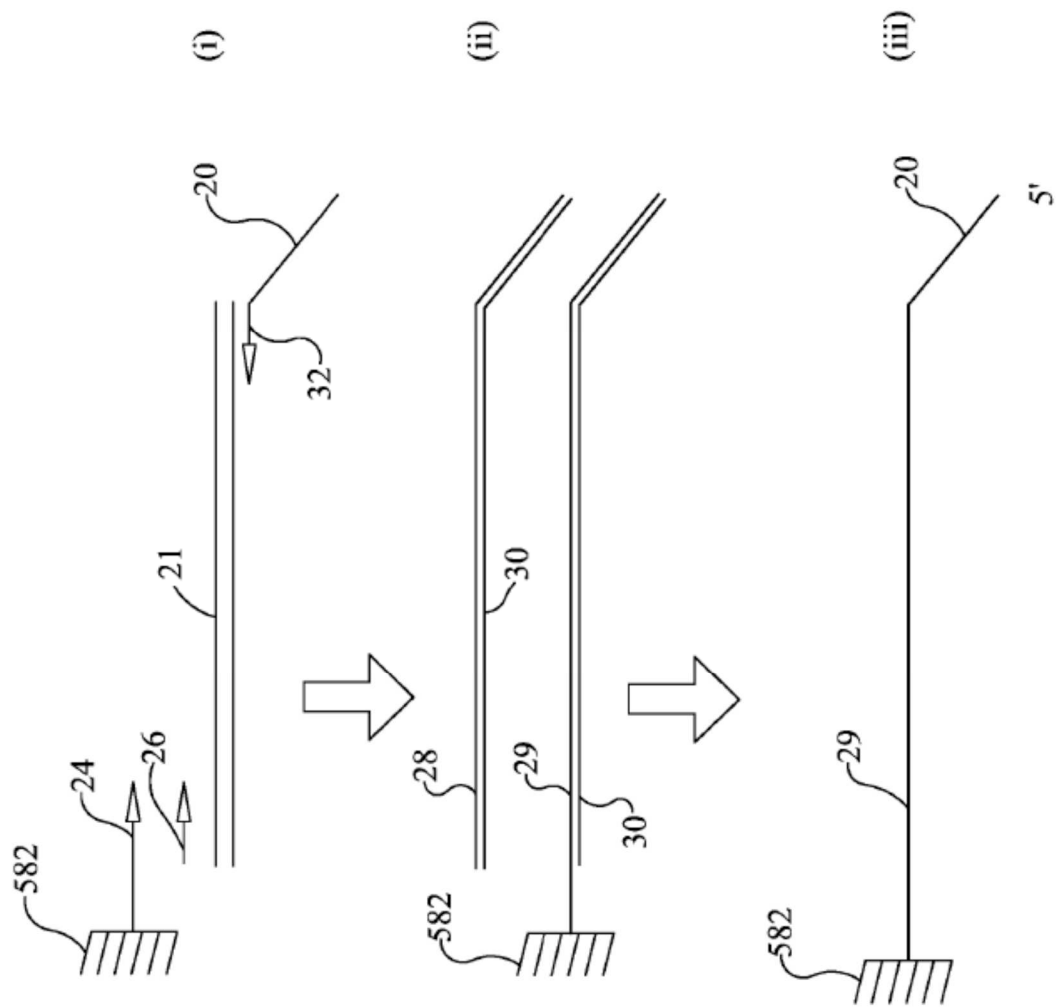
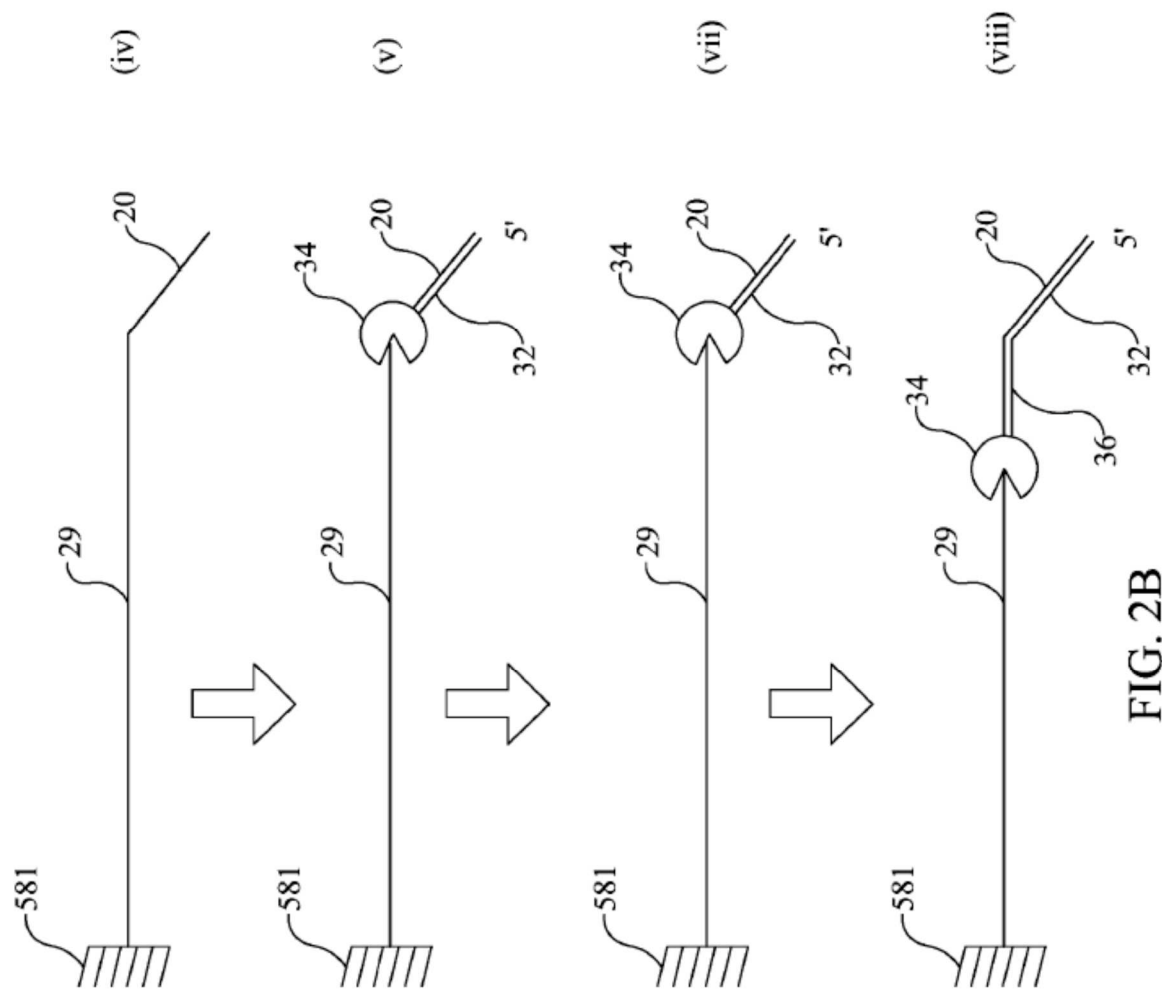


FIG. 2A



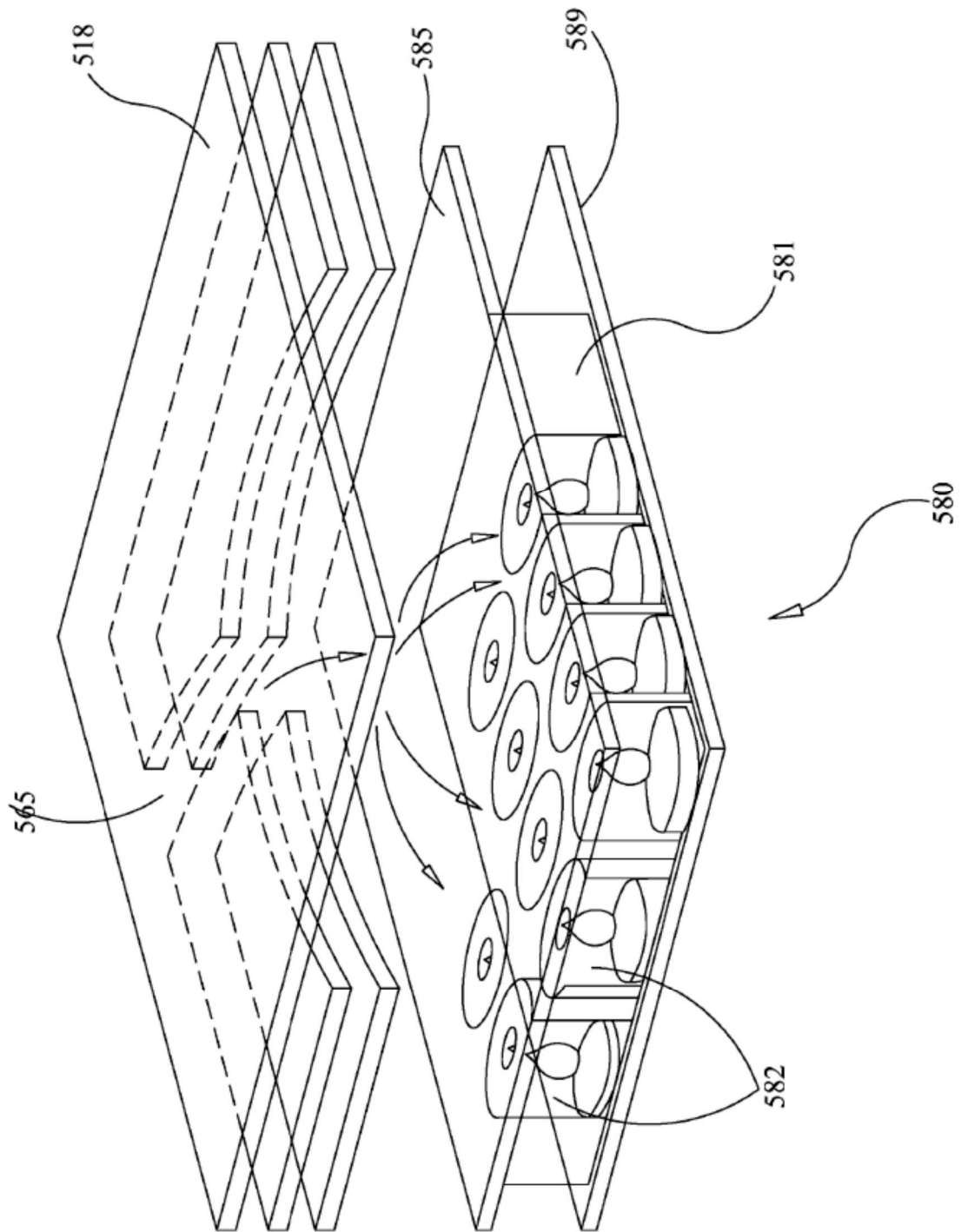


FIG. 3

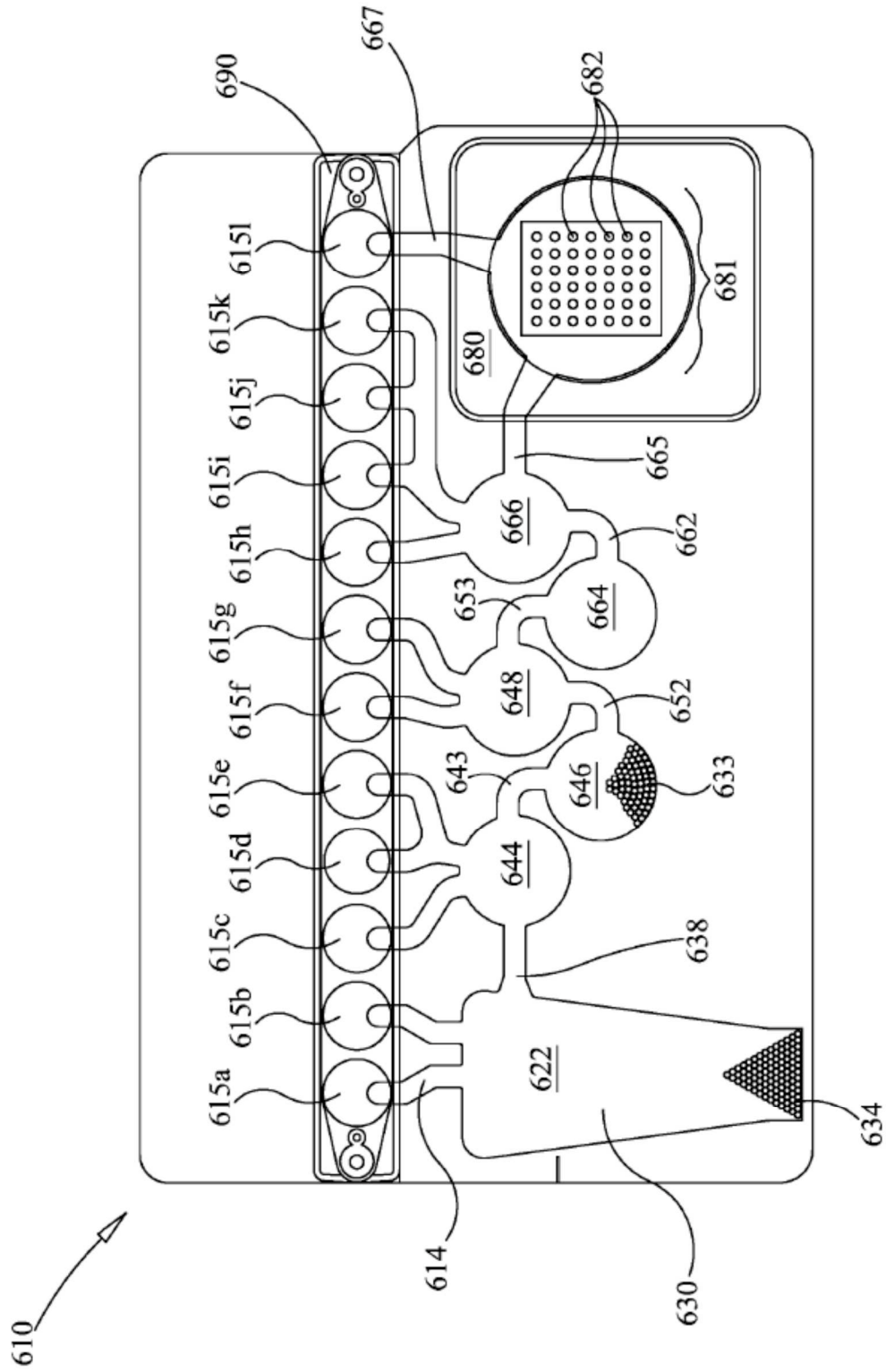


FIG. 4

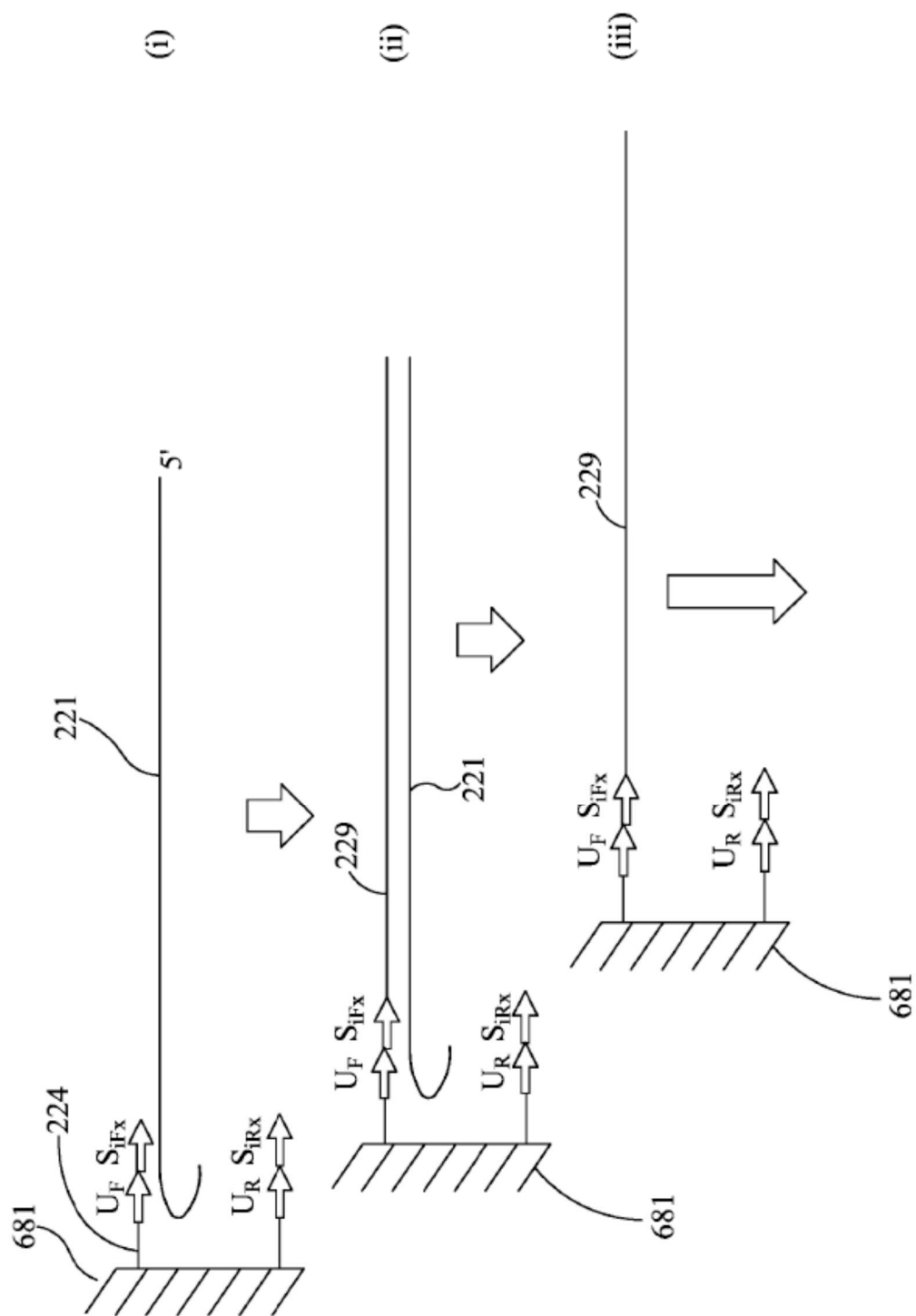


FIG. 5a

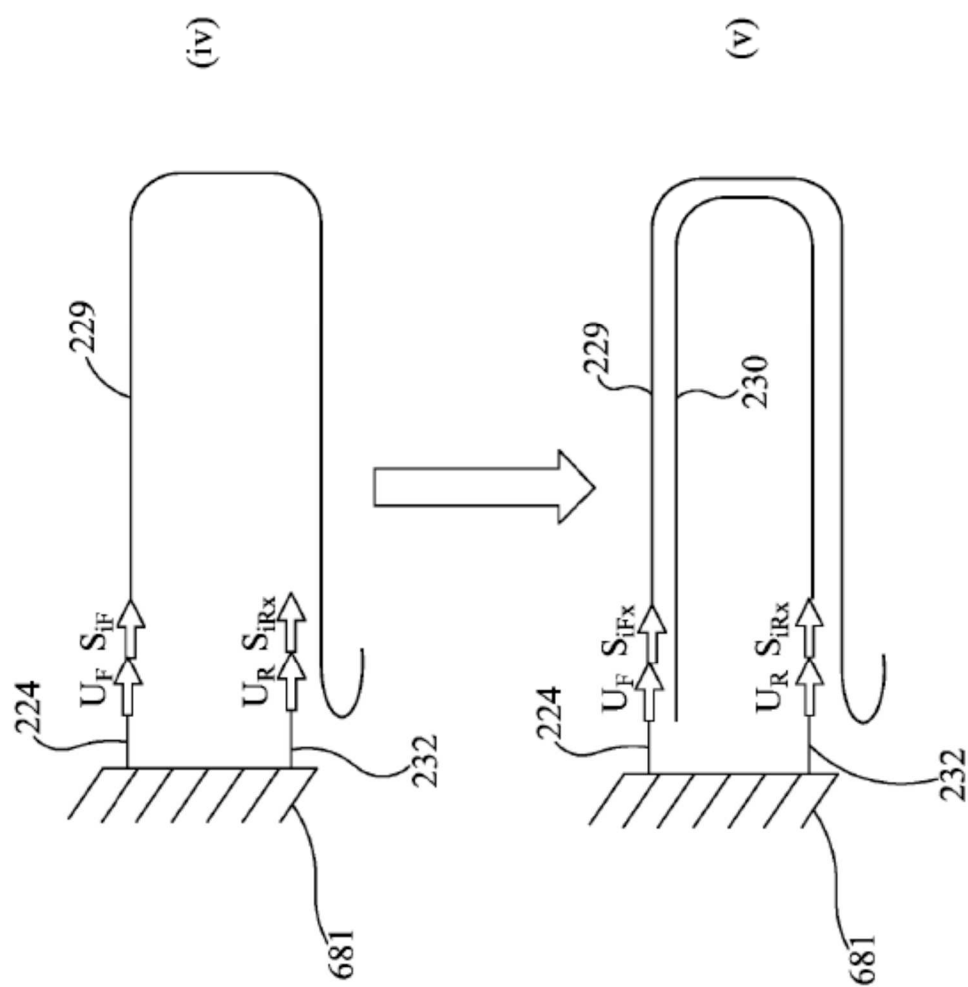


FIG. 5b

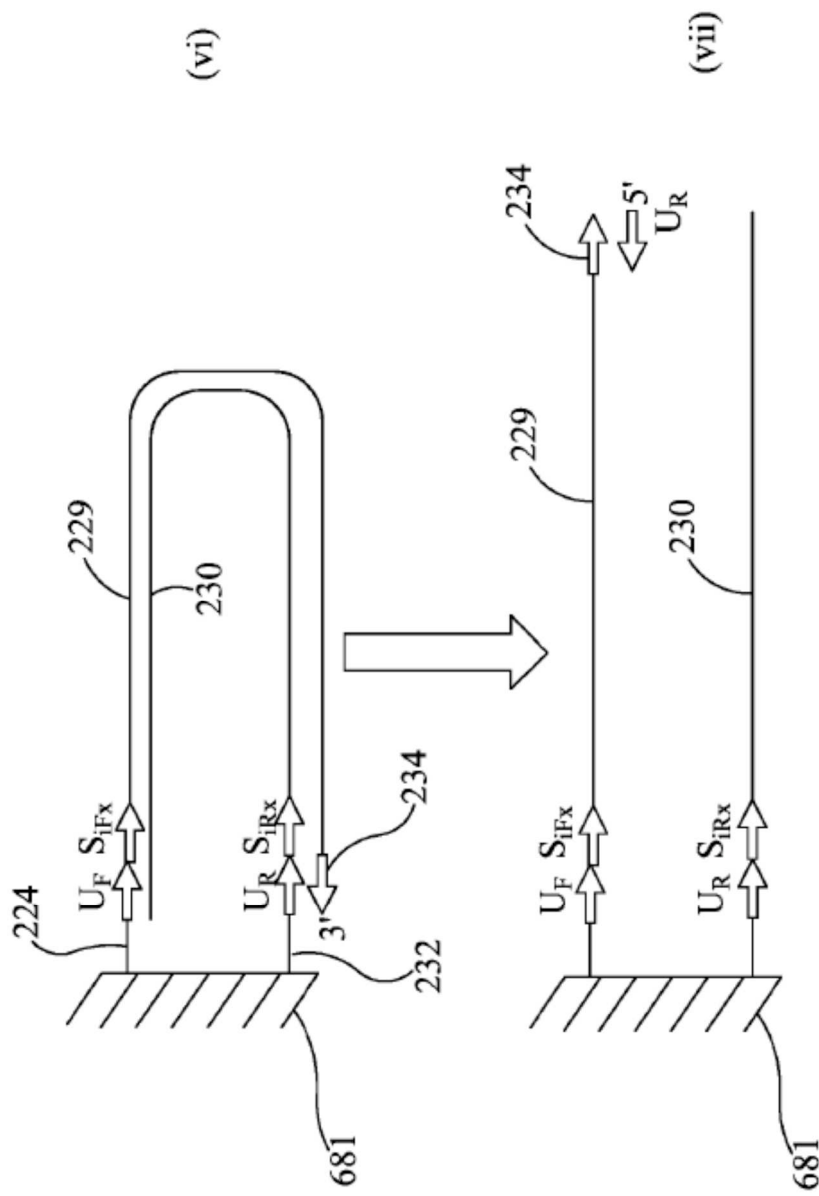


FIG. 5c

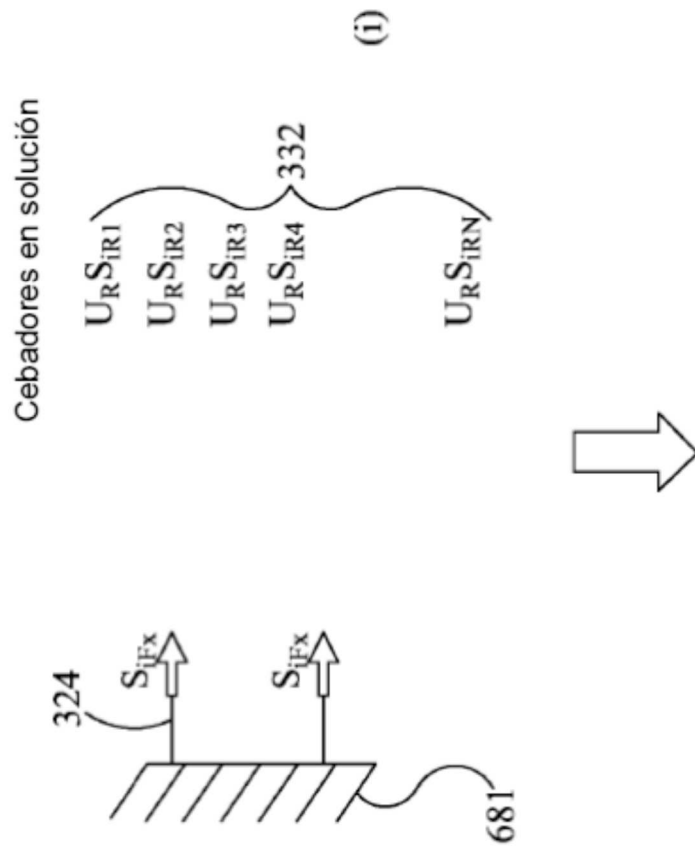


FIG. 6a

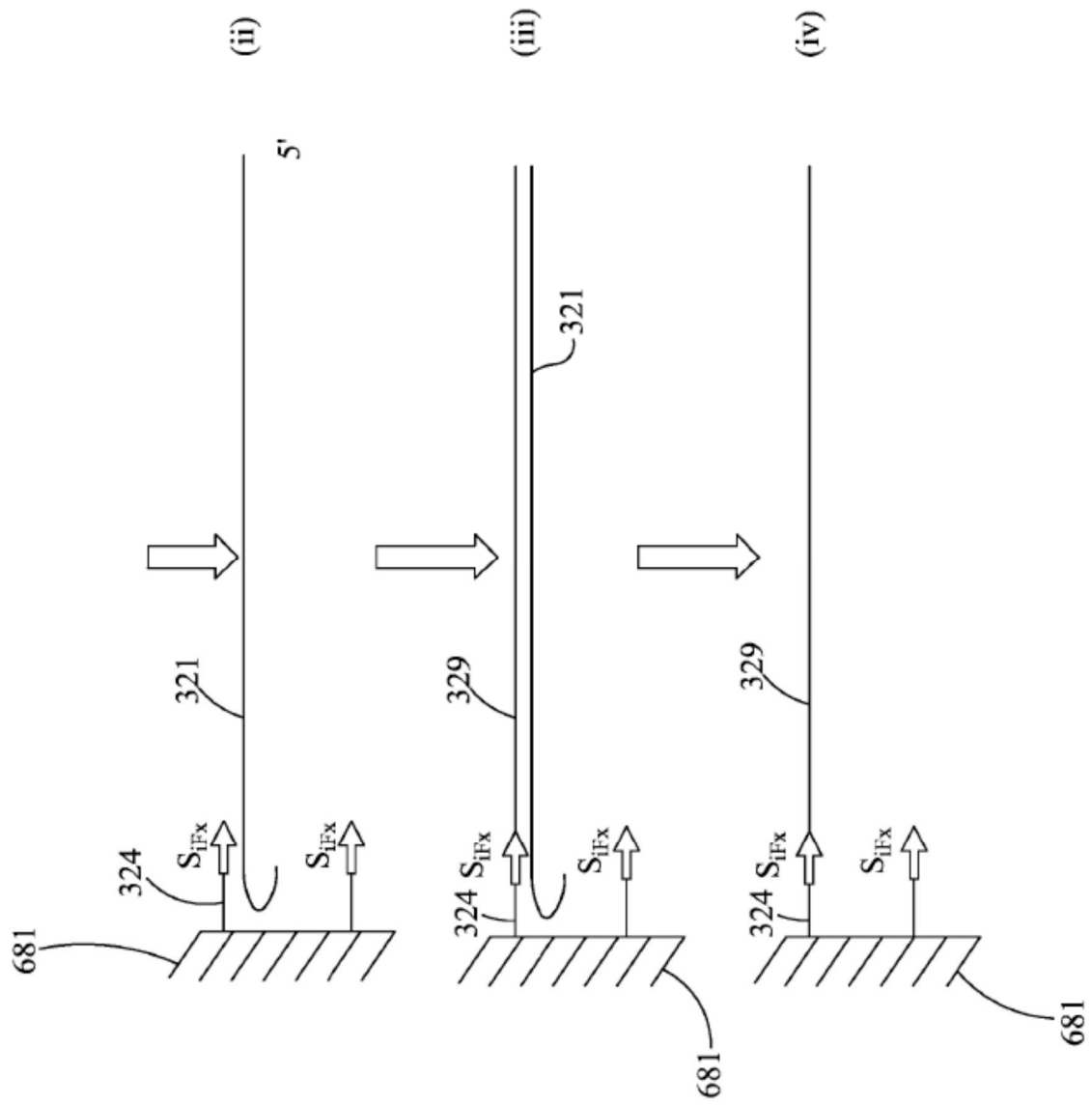


FIG. 6b

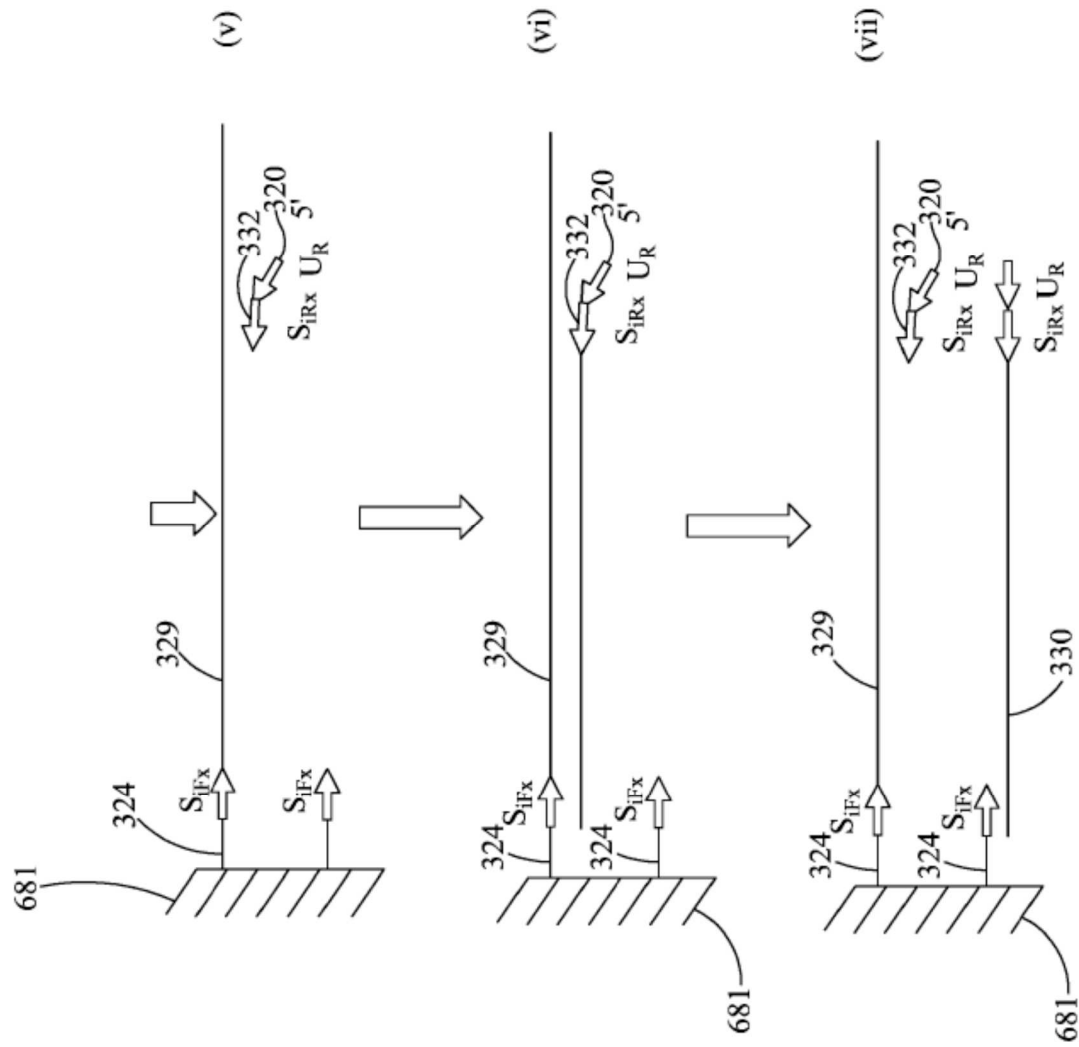


FIG. 6c

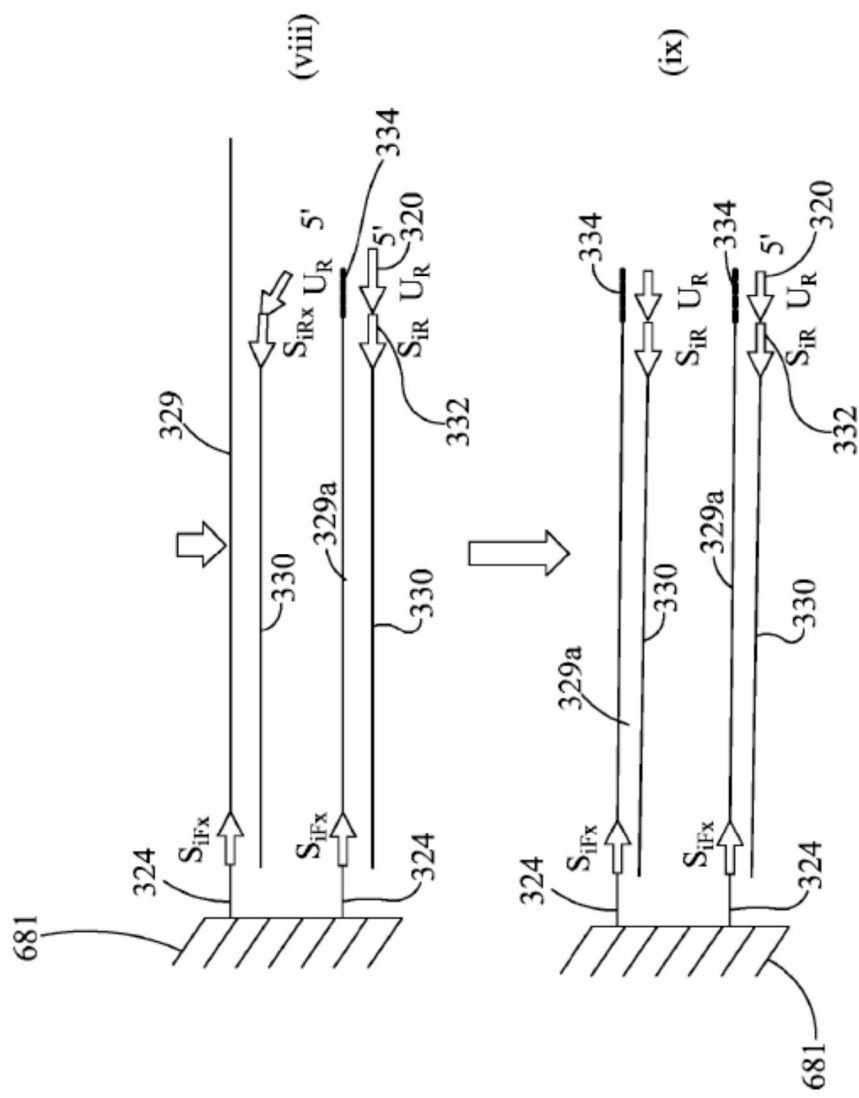


FIG. 6d

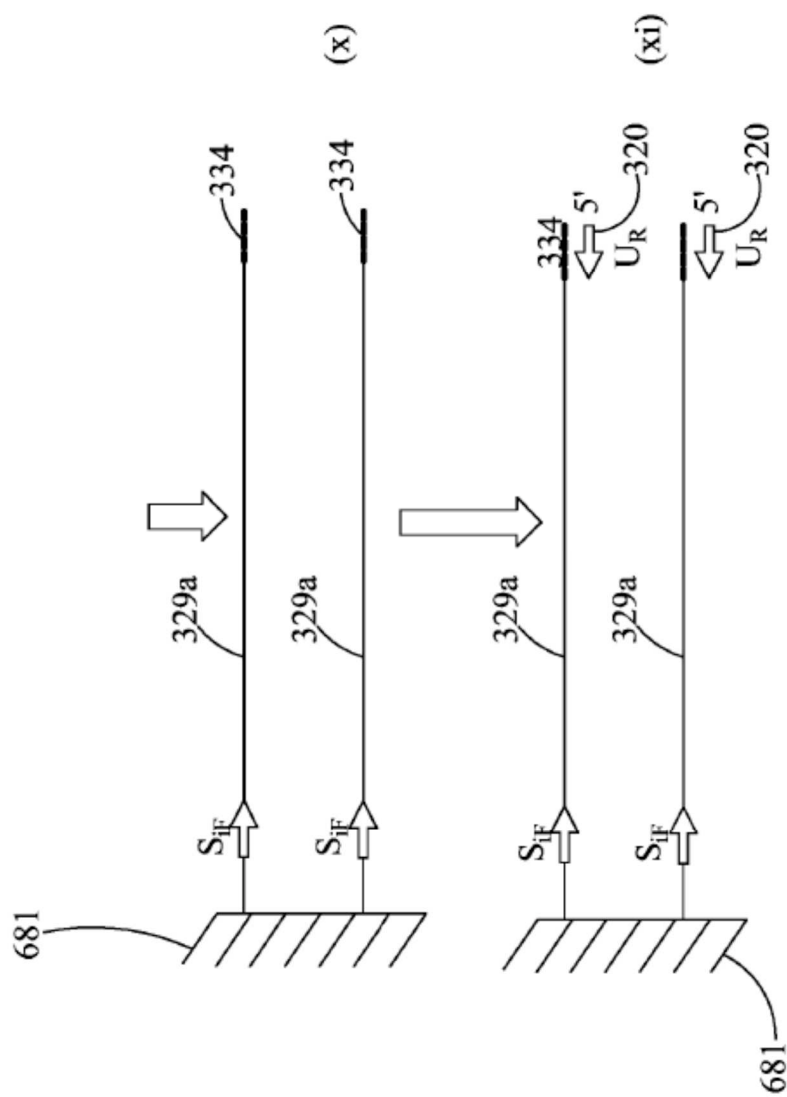


FIG. 6e

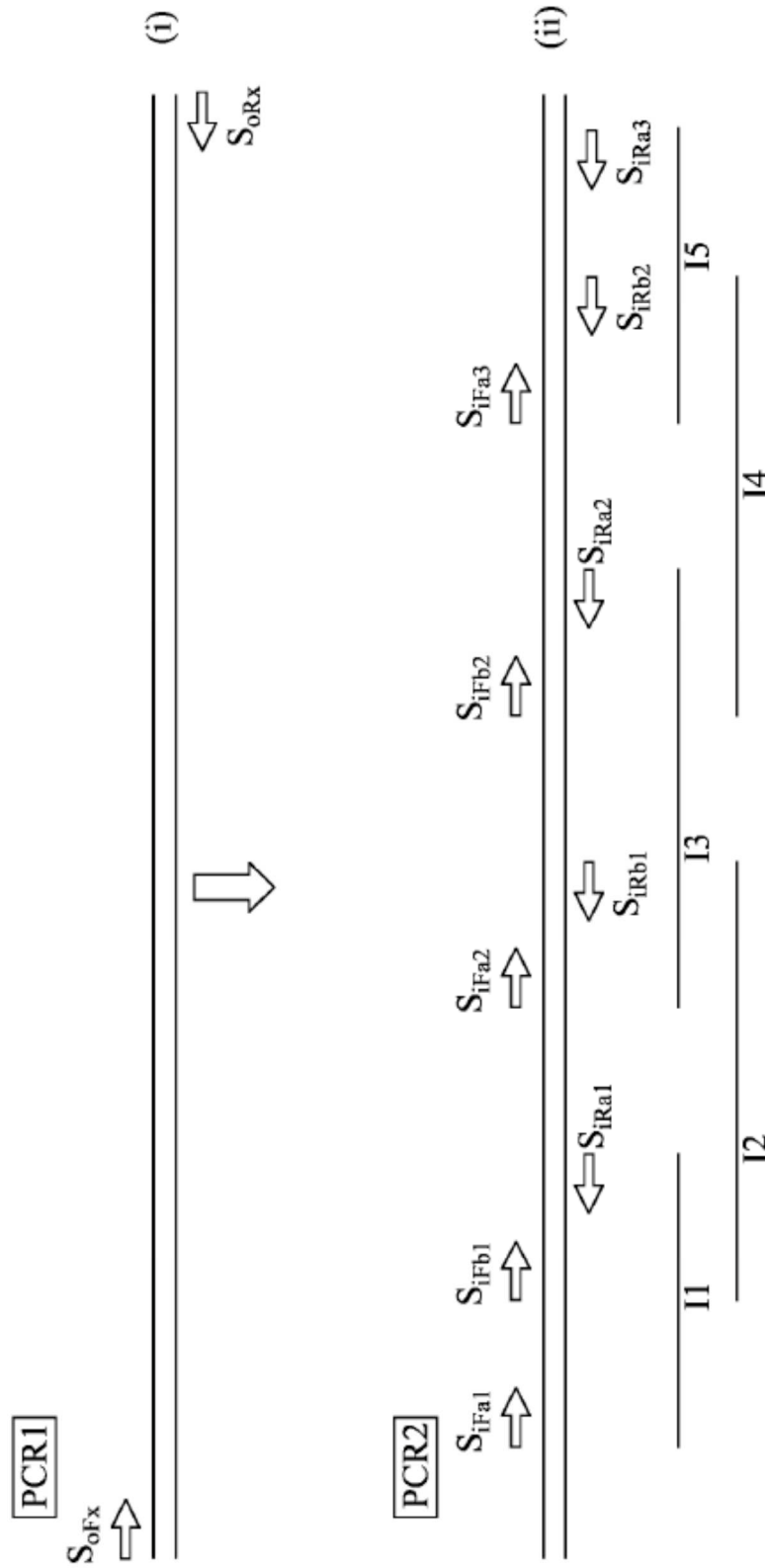


FIG. 7a

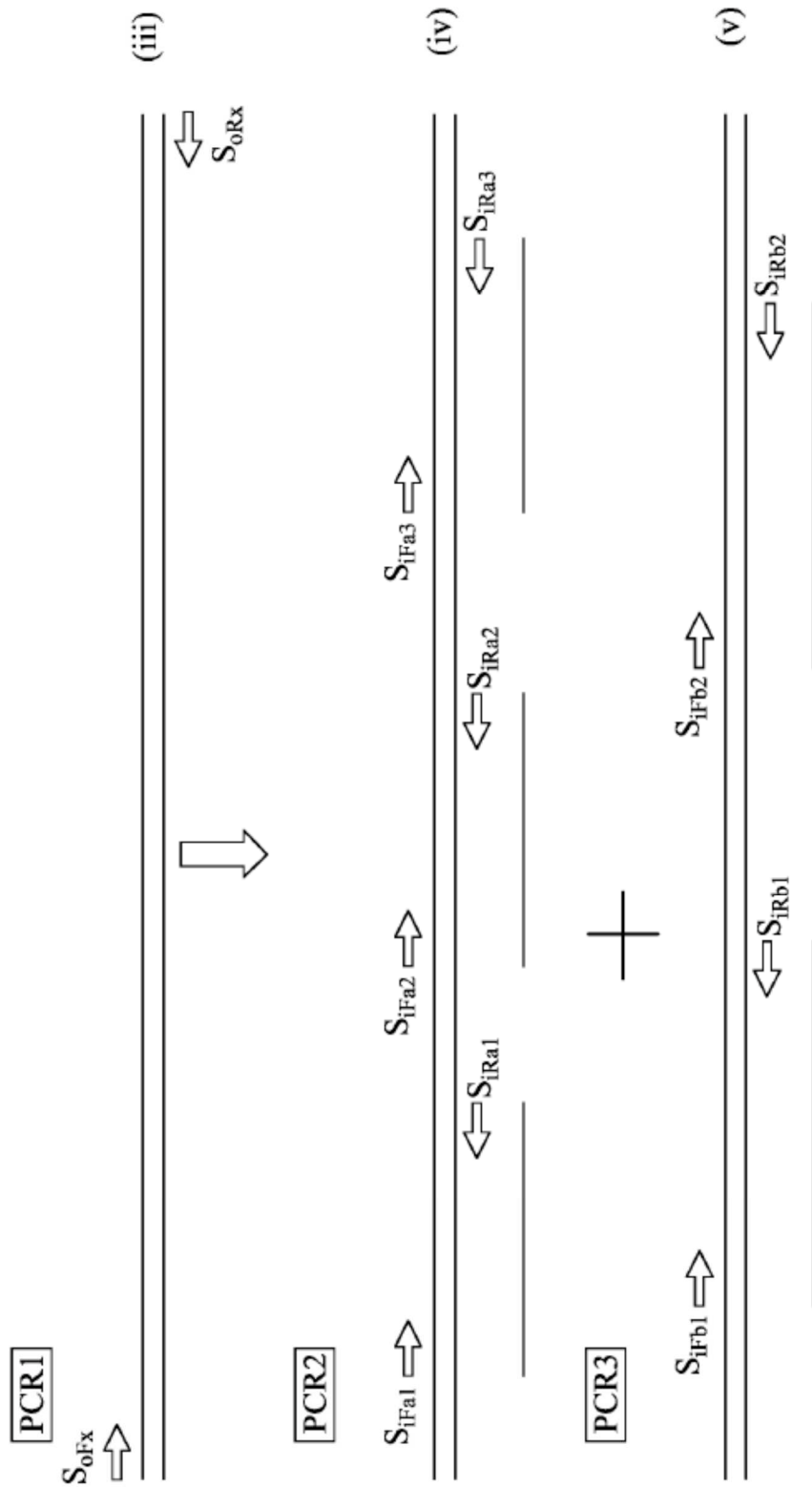


FIG. 7b

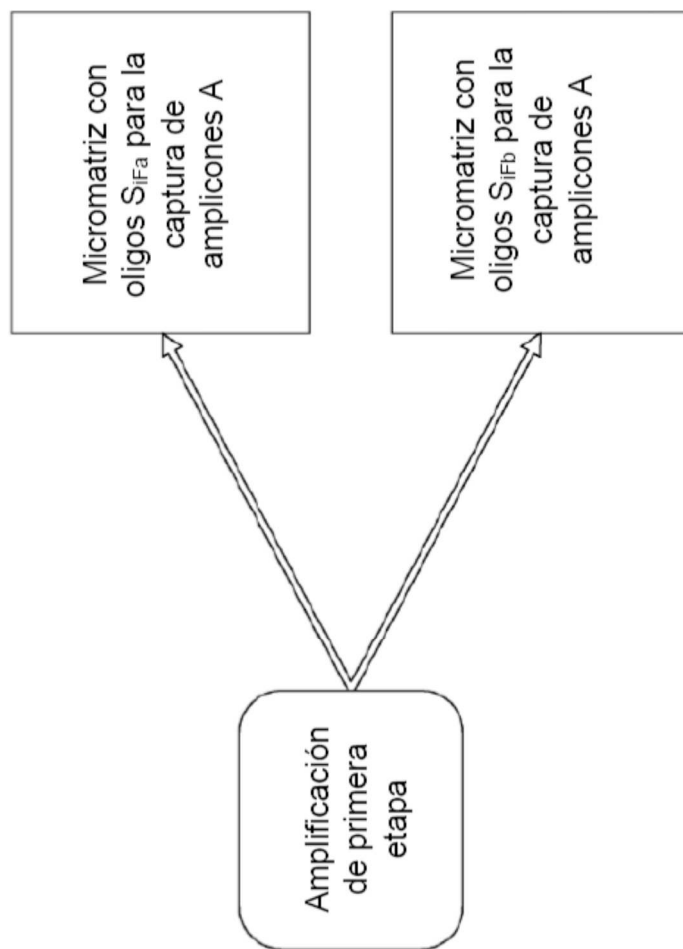


FIG. 7c

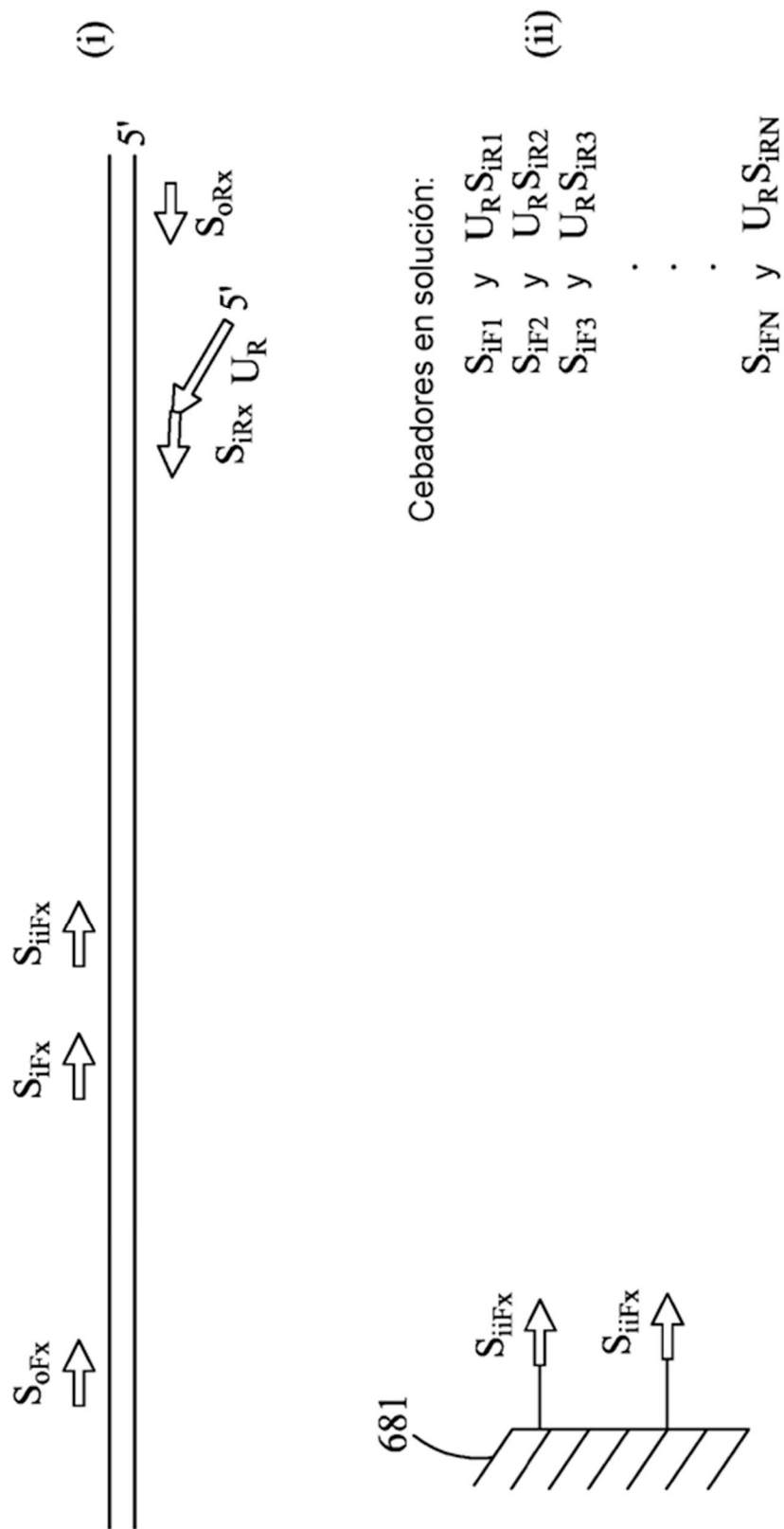


FIG. 8a

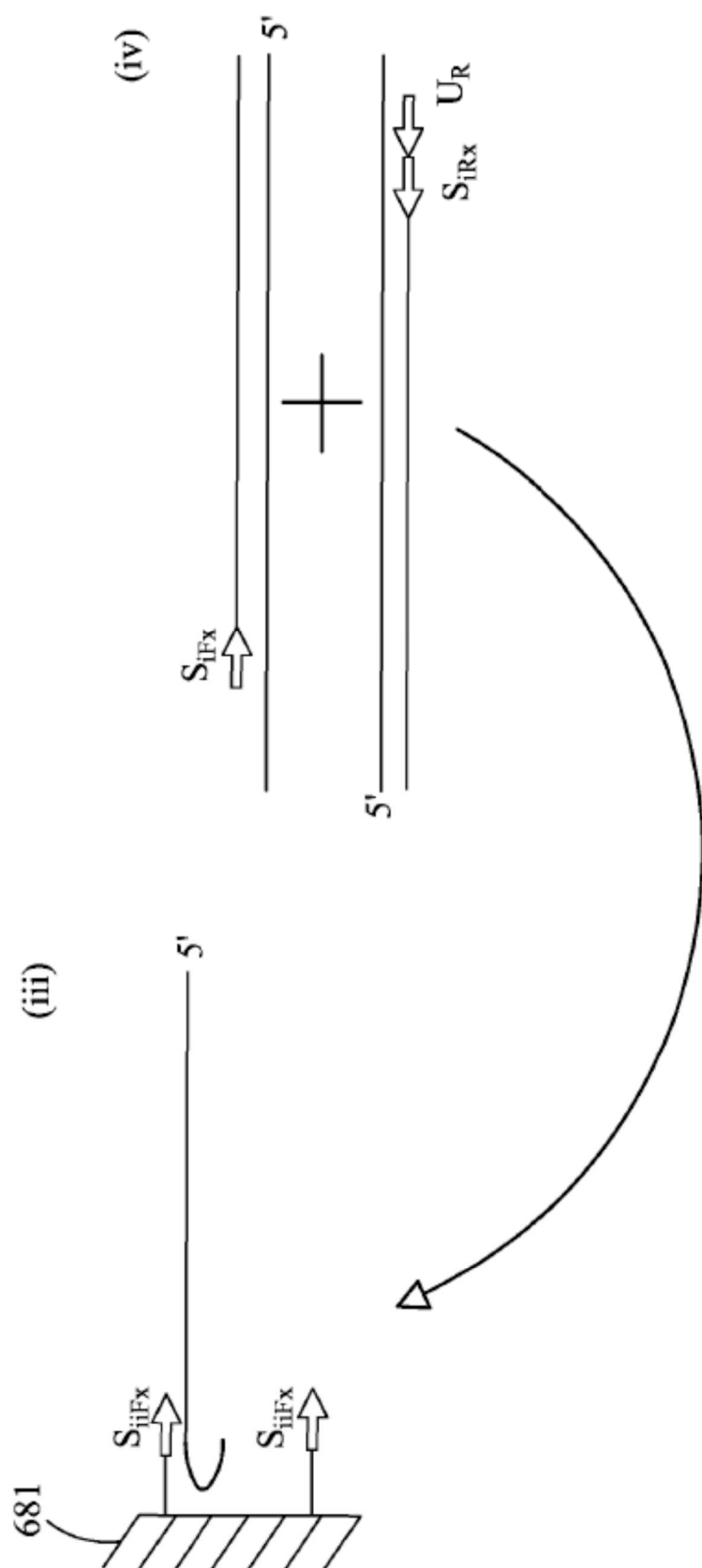


FIG. 8b

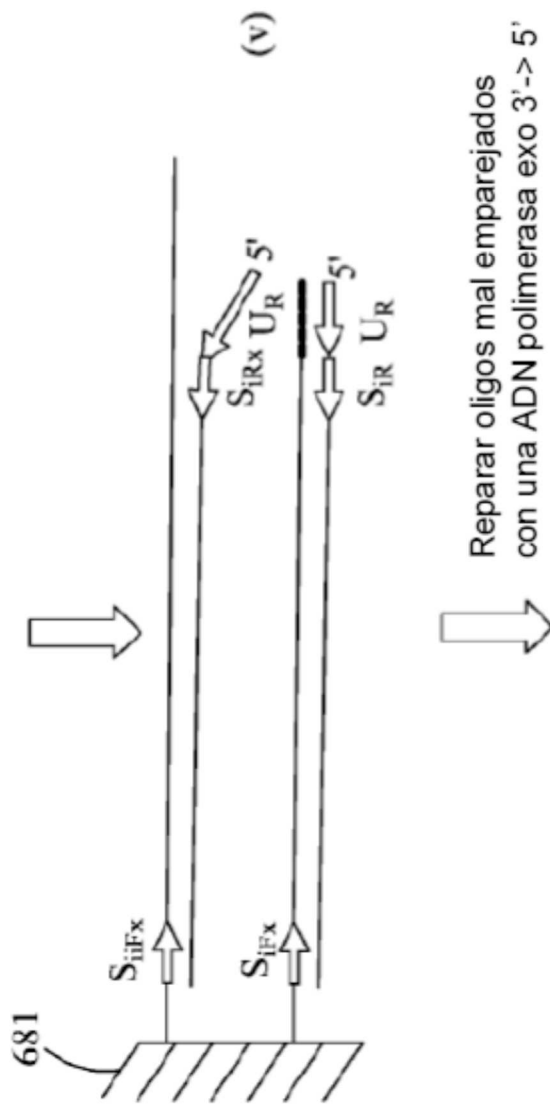


FIG. 8c

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2007025340 A1
- US 20110076674 A1
- US 8354225 B
- US 8871469 B
- US 7387887 B
- US 8394608 B
- US 8895295 B
- US 20140283945 A
- US 8895295 A
- US 14403369 B
- WO 2013177429 A
- WO 2013158740 A
- US 14395002 B
- WO 7544794 A
- WO 8946397 A

Literatura no patente citada en la descripción

- WOLNA AH et al. Electrical Current Signatures of DNA Base Modifications in Single Molecules Immobilized in the α -Hemolysin Ion Channel. *Isr J Chem.*, 01 June 2013, vol. 53 (6-7), 417-430
- MAGLIA, GIOVANNI et al. Analysis of single nucleic acid molecules with protein nanopores. *Methods in enzymology*, 2010, vol. 475, 591-623
- CLARKE, JAMES et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 2009, vol. 4.4, 265-270
- BEBENEK, K. et al. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 5408
- BARNES WM. *PNAS USA*, 15 March 1994, vol. 91 (6), 2216-20
- CHRISSEY, L.A. *Antisense, Research and Development*, 1991, vol. 1 (1), 65-113
- SPITZER, S. ; ECKSTEIN, F. *Nucl. Acids. Res.*, 1988, vol. 16 (24), 11691-11704
- CONNOLLY, B.A. ; POTTER, B.V.L. ; ECKSTEIN, F. ; PINGOUD, A. ; GROTHJAHN, L. *Biochemistry*, 1984, vol. 23, 3443-3453
- STEIN, C.A. ; PAL, R. ; DEVICO, A.L. ; HOKE, G. ; MUMBAUER, S. ; KINSTLER, O. ; SARNGADHARAN, M.G. ; LETSINGER, R.L. *Biochemistry*, 1991, vol. 30 (9), 2439-2444
- SAYERS, J.R. ; OLSEN, D.B. ; ECKSTEIN, F. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17 (22), 9495
- MANSON, J. ; BROWN, T. ; DUFF, G. *Lymphokine Research*, 1990, vol. 9 (1), 35-42
- WOOLF, T.M. ; JENNINGS, C.B.G. ; REBAGLIATI, M. ; MELTON, D.A. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18 (7), 1763-1769
- LEITER, J. M.E. ; AGRAWAL, S. ; PALESE, P. ; ZAMECNIK, P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87 (9), 3430-3434
- REED, J.C. ; STEIN, C. ; SUBASINGHE, C. ; HALDAR, S. ; CROCE, C.M. ; YUM, S. ; COHEN, J. *Cancer Research*, 1990, vol. 50 (20), 6565-6570
- IYER, R.P. ; EGAN, W. ; REGAN, J.B. ; BEAUCAGE, S.L. *J. Am. Chem Soc.*, 1990, vol. 112, 1254-1255
- IYER, R.P. ; PHILLIPS, L.R. ; EGAN, W. ; REGAN, J.B. ; BEAUCAGE, S.L. *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, 4693-4699
- DAGLE, J.M. ; WEEKS, D.L. ; WALDER, J.A. *Antisense, Research and Development*, 1991, vol. 1 (1), 11-20
- MAHER, L.J. ; DOLNICK, B.J. *Nucl. Acids Res.*, 1988, vol. 16, 3341-3358
- WALKDER, R.Y. ; WALKDER, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5011-5015
- HAN J. et al. *JCM*, November 2006, vol. 44 (11), 4157-62
- GLUSHAKOVA et al. *J. Virol. Methods.*, March 2015, vol. 214, 60-74