

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 016**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2019 PCT/US2019/013441**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019 WO19140353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2019 E 19706056 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3737755**

54 Título: **Método para la síntesis enzimática geométrica de ácidos nucleicos sin molde**

30 Prioridad:

12.01.2018 US 201862617148 P

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

20.12.2024

73 Titular/es:

**CAMENA BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
The Science Village Chesterford Research Park,
Little Chesterford
Saffron Walden, Essex CB1 0XL, GB**

72 Inventor/es:

**STEMPLE, DEREK L.;
FRASER, ANDREW G.;
MANKOWSKA, SYLWIA y
BELL, NEIL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 993 016 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la síntesis enzimática geométrica de ácidos nucleicos sin molde

5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para la síntesis enzimática geométrica de ácidos nucleicos sin molde de una secuencia programada arbitrariamente. La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Las composiciones mencionadas en el presente documento no son parte de la presente invención.

ANTECEDENTES

En la última década se ha producido un aumento de la demanda de moléculas de ADN sintético, que se utilizan en una serie de aplicaciones de biología molecular. Este aumento ha sido impulsado en parte por los avances en la tecnología de secuenciación de ADN. Sin embargo, aunque ha habido desarrollos significativos en la tecnología de secuenciación de ADN, la tecnología de síntesis de ADN no ha progresado a un ritmo comparable y, por consiguiente, la tecnología del estado de la técnica no cumple las necesidades actuales del mercado. La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para la síntesis enzimática geométrica de ADN sin molde que proporciona una solución a las necesidades sin cumplir en la técnica para la producción de secuencias de ADN largas, económicas y sin error que tienen exactitud y velocidad de síntesis superiores demostradas por las composiciones y los métodos de la presente divulgación. Los documentos de patente WO0188173 A2, WO2011056866 A2, WO2012078312 A2, DE4343591 A1 y WO2013036810 A1 describen métodos de ligación para la preparación de ácidos nucleicos.

SUMARIO

La presente divulgación proporciona una composición que comprende una secuencia del ácido nucleico (AN) capaz de participar en reacciones de síntesis geométrica o síntesis paralelas, en donde el ácido nucleico comprende una longitud arbitraria. En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, que incluye los que comprenden una pluralidad de secuencias de AN, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende o consiste en un oligonucleótido de 3 nucleótidos (un 3-mero), un oligonucleótido de 4-nucleótidos (un 4-mero), o un oligonucleótido de 5-nucleótidos (un 5-mero). En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende o consiste en un 3-mero y en donde la pluralidad de secuencias de AN comprende 64 secuencias de AN únicas. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende o consiste en un 4-mero y en donde la pluralidad de secuencias de AN comprende 256 secuencias de AN únicas. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende o consiste en un 5-mero y en donde la pluralidad de secuencias de AN comprende 1024 secuencias de AN únicas. En algunos aspectos, la pluralidad de secuencias de AN comprende o consiste en cada secuencia de AN 3-mera única, cada secuencia de AN 4-mera única y cada secuencia de AN 5-mera única, y la pluralidad de secuencias de AN comprende 1344 secuencias de AN únicas.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un monofosfato en un extremo 3' o en un extremo 5' de la secuencia de AN. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un monofosfato en un extremo 3' y en un extremo 5' de la secuencia de AN.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN está adenilada en 5'.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un grupo hidroxilo en un extremo 3' o en un extremo 5' de la secuencia de AN. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un grupo hidroxilo en un extremo 3' y en un extremo 5' de la secuencia de AN.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un grupo de bloqueo fotoconvertible en un extremo 3' o en un extremo 5' de la secuencia de AN. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un grupo de bloqueo fotoconvertible en un extremo 3' o en un extremo 5' de la secuencia de AN.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un bloqueante de O-2-nitrobencilo en un extremo 3' o en un extremo 5' de la secuencia de AN. En algunos aspectos, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un bloqueante de O-2-nitrobencilo en un extremo 3' y en un extremo 5' de la secuencia de AN.

En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, cada secuencia de AN de la pluralidad de secuencias de AN comprende un trifosfato en un extremo 5' de la secuencia de AN.

5 La divulgación proporciona una composición que comprende una secuencia del ácido nucleico que comprende una secuencia del cebador de anclaje, en donde la secuencia del cebador de anclaje comprende una secuencia del ácido nucleico que comprende un espaciador y un resto y en donde el espaciador y el resto unen la secuencia del cebador de anclaje a un soporte sólido en un primer extremo, y un elemento de liberación, en donde el elemento de liberación comprende al menos una secuencia del ácido nucleico que facilita la liberación de una secuencia distal en un segundo extremo, en donde la secuencia distal está localizada 3' del elemento de liberación. En algunos aspectos, el resto está situado en un extremo 5' de la secuencia del cebador de anclaje o en un extremo 5' de la secuencia del ácido nucleico. En algunos aspectos, el resto está situado en un extremo 3' de la secuencia del cebador de anclaje o en un extremo 3' de la secuencia del ácido nucleico. En algunos aspectos, el resto permite la unión covalente directa de la secuencia del cebador de anclaje al soporte sólido. En algunos aspectos, el resto permite la unión indirecta o no covalente de la secuencia del cebador de anclaje al soporte sólido. En algunos aspectos, el resto comprende una azida. En algunos aspectos, el resto comprende un alquino. En algunos aspectos, el resto comprende un dibenzociclooctino (DBCO). En algunos aspectos, el resto comprende una biotina. En algunos aspectos, el espaciador comprende un polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende una desoxiuridina. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende una penúltima desoxiinosina en un extremo 5' del elemento de liberación, la secuencia distal o la secuencia del ácido nucleico. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende una desoxirribosa abásica. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende un sitio de endonucleasa S de tipo II, un sitio de endonucleasa cortadora oblicua, o un sitio de endonucleasa de restricción. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende un sitio de endonucleasa de restricción. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende un sitio MlyI de endonucleasa de restricción. En algunos aspectos, el elemento de liberación o la secuencia distal comprende una secuencia capaz de ser escindida por una endonucleasa Cas9 específica monocatenaria.

30 En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, la secuencia del cebador de anclaje o la secuencia del ácido nucleico que comprende la secuencia del cebador de anclaje tiene estructura secundaria mínima. En algunos aspectos, la secuencia del cebador de anclaje comprende un tramo homopolimérico largo o un tramo bipolimérico simple. En algunos aspectos, la secuencia del cebador de anclaje comprende un tramo bipolimérico largo que comprende una forma [CT]_N.

35 En algunos aspectos de las composiciones de la divulgación, la composición comprende una pluralidad de secuencias del ácido nucleico que comprenden una secuencia del cebador de anclaje o una pluralidad de secuencias de cebadores de anclaje, en donde al menos una secuencia del ácido nucleico de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico o al menos una secuencia del cebador de anclaje de la pluralidad de secuencias de cebadores de anclaje comprende una secuencia de AN o un N-mero de la divulgación. En algunos aspectos, cada secuencia del ácido nucleico de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico o cada secuencia del cebador de anclaje de la pluralidad de secuencias de cebadores de anclaje comprende una secuencia de AN o un N-mero de la composición. En algunos aspectos, la secuencia del cebador de anclaje de la al menos una secuencia de nucleótidos o de cada nucleótido de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico que comprende una secuencia del cebador de anclaje se ha extendido para comprender la secuencia de AN o un N-mero de la divulgación. En algunos aspectos, la al menos una secuencia del cebador de anclaje o cada secuencia del cebador de anclaje de la pluralidad de secuencias de cebadores de anclaje se ha extendido para comprender la secuencia de AN o un N-mero de la divulgación. En algunos aspectos, la composición comprende una pluralidad de 64, 256, 1024 o 1344 secuencias del ácido nucleico únicas. En algunos aspectos, la composición comprende una pluralidad de 64, 256, 1024 o 1344 secuencias del ácido nucleico únicas. En algunos aspectos, cada secuencia del ácido nucleico única comprende un monofosfato en un extremo 3' o en un extremo 5'. En algunos aspectos, cada secuencia del ácido nucleico única comprende un grupo hidroxilo en un extremo 3' o en un extremo 5'.

55 La divulgación proporciona una composición que comprende un soporte sólido para la unión de una secuencia del cebador de anclaje o una pluralidad de secuencias de cebadores de anclaje. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende una pluralidad de perlas monodispersas. En algunos aspectos, cada una de la pluralidad de perlas monodispersas comprende poliacrilamida. En algunos aspectos, cada una de la pluralidad de perlas monodispersas comprende agarosa. En algunos aspectos, cada una de la pluralidad de perlas monodispersas comprende poliestireno. En algunos aspectos, cada una de la pluralidad de perlas monodispersas comprende partículas ferromagnéticas. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un pocillo o cámara. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende una pluralidad de pocillos o cámaras. En algunos aspectos, la pluralidad de pocillos comprende una placa multipocillo. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un vidrio. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un portaobjetos de vidrio. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un cuarzo. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un portaobjetos de cuarzo. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un poliestireno. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un portaobjetos de poliestireno. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende un recubrimiento y en donde el recubrimiento previene la unión no específica de proteínas no deseadas, ácidos nucleicos no deseados, u otras biomoléculas no

deseadas. En algunos aspectos, el recubrimiento comprende polietilenglicol (PEG). En algunos aspectos, el recubrimiento comprende trietilenglicol (TEG).

La divulgación proporciona una composición que comprende una enzima, uno o más componentes de reacción y sustratos N-meros específicos, en donde cada sustrato N-mero es capaz de una y solo una extensión de unidades desde cualquiera de un extremo 3' o extremo 5' de un cebador de anclaje en una reacción de síntesis geométrica de AN. En algunos aspectos, el uno o más componentes de reacción comprenden acetato de potasio, tris-acetato, acetato de magnesio o albúmina de suero bovino. En algunos aspectos, el uno o más componentes de reacción comprenden polietilenglicol 8000, cloruro de hexaminocobalto o trifosfato de adenosina. En algunos aspectos, la enzima se selecciona del grupo que consiste en una ribozima, una ARN ligasa T4, una ADN ligasa T4, una fosfatasa alcalina intestinal de ternero, una fosfatasa alcalina de camarón, un fragmento grande de Klenow (exonucleasa 3'-5'), una exonucleasa lambda (exonucleasa 5'-3'), una polinucleótido cinasa, una desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una ADN polimerasa theta, una endonucleasa V, una uracil ADN glicosilasa, una endonucleasa VIII, una 5' desadenilasa o una transposasa. En algunos aspectos, la enzima es una ribozima. En algunos aspectos, la transposasa es una transposasa piggyBac, una transposasa Bella durmiente, o una transposasa Tn10. En algunos aspectos, la enzima comprende una mutación o una variante de secuencia que tiene una actividad nueva deseada o una selectivamente eliminada.

La divulgación proporciona una composición que comprende cualquier secuencia del ácido nucleico derivada de síntesis geométrica de extensión en 3', síntesis geométrica de extensión en 5', síntesis paralela de extensión en 3' o co-síntesis 5', 3'.

La divulgación proporciona una composición, en donde cada secuencia de AN de longitud arbitraria capaz de participar en reacciones de síntesis geométrica o síntesis paralela comprende ADN, ARN o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, la secuencia de AN comprende una base en el extremo 5' que es una base de ADN y una base en el extremo 3' que es una base de ARN. En algunos aspectos, cualquiera o ambos de los nucleótidos en los extremos 5' y 3' de cada secuencia de AN posee un grupo dimetoxitritil-fosfato reversible. En algunos aspectos, cada secuencia de AN posee un número arbitrario de nucleótidos de ADN o ARN en un orden arbitrario.

La divulgación proporciona un vector que comprende una composición de la divulgación. En algunos aspectos, el vector comprende además una repetición terminal invertida (ITR) en 5' y una 3' ITR. En algunos aspectos, de 5' a 3', el vector comprende la 5' ITR, al menos una secuencia de N-meros y la 3' ITR. En algunos aspectos, el vector comprende además un marcador de selección. En algunos aspectos, el marcador de selección comprende una secuencia que codifica un gen de resistencia a antibióticos. En algunos aspectos, la secuencia que codifica un gen de resistencia a antibióticos comprende una secuencia que codifica un gen de resistencia a ampicilina.

La divulgación proporciona una composición que comprende un vector de la divulgación.

La divulgación proporciona un método que comprende: a) poner en contacto al menos una primera pluralidad de soportes sólidos y al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 3' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una primera pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato; b) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una primera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un primer cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; c) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una segunda pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo donante; d) poner en contacto al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos y al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 3' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato; e) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una tercera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un segundo cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; f) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo diana; g) liberar al menos una composición que comprende el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros y el al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros del al menos un primer complejo donante para producir al menos un complejo intermedio liberado; y h) poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado en condiciones que anexan un extremo 3' del al

- menos un complejo intermedio liberado a un extremo 5' del al menos un complejo diana para producir al menos un primer complejo diana extendido.
- 5 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la anexión comprende ligación enzimática en condiciones que permiten actividad ligasa. En algunos aspectos, la anexión comprende ligación que no es enzimática. En algunos aspectos, la ligación enzimática comprende actividad ARN ligasa T4.
- 10 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de la producción del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar al menos un cebador de anclaje no unido.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un cebador de anclaje no unido, desadenilar el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato.
- 15 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar los cebadores de anclaje no unidos.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un cebador de anclaje no unido, desadenilar el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato.
- 20 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el al menos un cebador de anclaje no unido comprende actividad exonucleasa. En algunos aspectos, la exonucleasa comprende una exonucleasa 5' a 3' específica. En algunos aspectos, la exonucleasa 5' a 3' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo OH en 5'.
- 25 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un N-mero no anexado, desadenilar el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- 30 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo donante, retirar al menos un N-mero no anexado.
- 35 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un N-mero no anexado, desadenilar el al menos un primer complejo donante.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.
- 40 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un N-mero no anexado, desadenilar el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo diana, retirar al menos un N-mero no anexado.
- 45 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un N-mero no anexado, desadenilar el al menos un primer complejo diana.
- 50 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo diana extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de retirar el al menos un N-mero no anexado, desadenilar el al menos un primer complejo diana extendido.
- 55 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el al menos un N-mero no anexado comprende actividad exonucleasa. En algunos aspectos, la exonucleasa comprende una exonucleasa 5' a 3' específica. En algunos aspectos, la exonucleasa 5' a 3' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo OH en 5'. En algunos aspectos, la exonucleasa 5' a 3' comprende una exonucleasa lambda, una exonucleasa XRN-1 o una combinación de las mismas.
- 60 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, desadenilar comprende una actividad enzimática. En algunos aspectos, la actividad enzimática comprende una actividad desadenilasa. En algunos aspectos, la desadenilasa comprende una desadenilasa en 5' de *S. cerevisiae*.
- 65 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, desadenilar comprende una actividad no enzimática.

- 5 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la al menos una primera pluralidad de N-meros, la al menos una segunda pluralidad de N-meros, la al menos una tercera pluralidad de N-meros, la al menos una cuarta pluralidad de N-meros o cualquier combinación de las mismas comprende(n) al menos un N-mero que comprende un grupo OH en el extremo 3' y el extremo 5' del N-mero.
- 10 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido con al menos una segunda pluralidad de N-meros, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros.
- 15 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros.
- 20 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros.
- 25 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, anexar un grupo PO₄ comprende fosforilación enzimática. En algunos aspectos, la fosforilación enzimática comprende actividad T4 polinucleótido cinasa.
- 30 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, anexar un grupo PO₄ comprende fosforilación no enzimática.
- 35 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, liberar la al menos una composición ocurre en condiciones que preservan el grupo OH en el extremo 3' y el grupo OH en el extremo 5' del al menos un N-mero.
- 40 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la al menos una primera pluralidad de N-meros, la al menos una segunda pluralidad de N-meros, la al menos una tercera pluralidad de N-meros, la al menos una cuarta pluralidad de N-meros o cualquier combinación de las mismas comprende(n) al menos un N-mero que comprende un grupo OH en el extremo 3' y un grupo PO₄ en el extremo 5' del N-mero.
- 45 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el grupo PO₄ está unido operativamente a un grupo protector. En algunos aspectos, el grupo protector comprende fosfato de 4,4'-dimetoxitritilo.
- 50 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo donante, retirar el grupo protector del menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- 55 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo diana, retirar el grupo protector del menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- 60 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de producir el al menos un primer complejo diana extendido, retirar el grupo protector del al menos un primer complejo diana.
- 65 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la liberación de la al menos una composición ocurre en condiciones que preservan el grupo OH en el extremo 3' y el grupo PO₄ en el extremo 5' del N-mero.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo donante, adenilar el extremo 5' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo diana, adenilar el extremo 5' del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de producir el al menos un primer complejo diana extendido, adenilar el extremo 5' del al menos un primer complejo diana.
- En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, adenilar comprende actividad enzimática. En algunos aspectos, actividad enzimática comprende una actividad ARN ligasa Mth.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la adenilación comprende actividad no enzimática.

5 La divulgación proporciona un método que comprende: a) poner en contacto al menos una primera pluralidad de soportes sólidos y al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 5' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una primera pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato; b) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una primera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros a un extremo 3' del al menos un primer cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; c) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una segunda pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros a un extremo 3' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo donante; d) poner en contacto al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos y al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 5' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato; e) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una tercera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros a un extremo 3' del al menos un segundo cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; f) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros a un extremo 3' del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo diana; g) liberar al menos una composición que comprende el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros y el al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros del al menos un primer complejo donante para producir al menos un complejo intermedio liberado h) poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un complejo intermedio liberado a un extremo 3' del al menos un complejo diana para producir al menos un primer complejo diana extendido.

35 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la anexión comprende ligación enzimática en condiciones que permiten actividad ligasa. En algunos aspectos, la ligación enzimática comprende una actividad ARN ligasa T4.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la anexión comprende ligación que no es enzimática.

40 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende, después de la producción del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar al menos un cebador de anclaje no unido.

45 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de la producción del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar al menos un cebador de anclaje no unido.

50 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el al menos un cebador de anclaje no unido comprende actividad exonucleasa. En algunos aspectos, la exonucleasa comprende una exonucleasa 3' a 5' específica. En algunos aspectos, la exonucleasa 3' a 5' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo PO₄ en 3'.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.

55 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un donante complejo, retirar al menos un N-mero no anexado.

60 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un complejo diana, retirar al menos un N-mero no anexado.

65 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo diana extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el al menos un N-mero no anexado comprende actividad exonucleasa. En algunos aspectos, la exonucleasa comprende una exonucleasa 3' a 5' específica. En algunos aspectos, la exonucleasa 3' a 5' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo PO₄ en 3'. En algunos aspectos, la exonucleasa 3' a 5' comprende una polimerasa de Klenow.

5

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la al menos una primera pluralidad de N-meros, la al menos una segunda pluralidad de N-meros, la al menos una tercera pluralidad de N-meros, la al menos una cuarta pluralidad de N-meros o cualquier combinación de las mismas comprende(n) al menos un N-mero que comprende un grupo PO₄ en el extremo 3' y el extremo 5' del N-mero.

10

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo donante, retirar el grupo PO₄ en el extremo 3' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.

15

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo diana, retirar el grupo PO₄ en el extremo 3' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido.

20

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el método comprende además, antes de producir el al menos un primer complejo diana extendido, retirar el grupo PO₄ en el extremo 3' del al menos un primer complejo diana.

25

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el grupo PO₄ comprende actividad enzimática fosfatasa. En algunos aspectos, la actividad enzimática fosfatasa comprende actividad fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP), actividad fosfatasa alcalina de camarón (SAP) o cualquier combinación de las mismas.

30

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, retirar el grupo PO₄ comprende actividad enzimática no fosfatasa.

35

La divulgación proporciona un método que comprende, a) proporcionar una primera composición que comprende una primera pluralidad de cebadores de anclaje, en donde un extremo 5' de al menos un cebador de anclaje está unido operativamente a al menos un sustrato sólido y en donde el al menos un cebador de anclaje comprende un grupo de bloqueo reversible en un extremo 3' para formar un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato bloqueado y una segunda composición que comprende al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje, en donde un extremo 5' de al menos un cebador de anclaje está unido operativamente a al menos un sustrato sólido y en donde el al menos un cebador de anclaje comprende un grupo de bloqueo reversible en un extremo 3' para formar un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato bloqueado, b) retirar el grupo de bloqueo reversible de cualquiera del primer complejo de anclaje-sustrato de cebador bloqueado o el segundo complejo de anclaje-sustrato de cebador para producir al menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato no bloqueado; c) poner en contacto el complejo de cebador de anclaje-sustrato no bloqueado y al menos una primera pluralidad de N-meros, comprendiendo cada N-mero un grupo de bloqueo reversible en un extremo 3' del N-mero, en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad a un extremo 3' del al menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato no bloqueado para formar al menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido bloqueado; d) retirar el grupo de bloqueo reversible del menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido bloqueado para producir al menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido no bloqueado; y e) poner en contacto el complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido no bloqueado y al menos una segunda pluralidad de N-meros, comprendiendo cada N-mero un grupo de bloqueo reversible en un extremo 3' del N-mero, en condiciones que anexan un extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad a un extremo 3' del al menos un complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido no bloqueado para formar al menos un complejo donante bloqueado.

40

45

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, una porción de los cebadores de anclaje de la primera pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a al menos un sustrato sólido.

50

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, una porción de los cebadores de anclaje de la segunda pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a al menos un sustrato sólido.

55

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, cada uno cebador de anclaje de la primera pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a al menos un sustrato sólido.

60

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, cada cebador de anclaje de la segunda pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a al menos un sustrato sólido.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, cada cebador de anclaje de la primera pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a un primer sustrato sólido. En algunos aspectos, cada cebador de anclaje de la segunda pluralidad de cebadores de anclaje está unida operativamente a un segundo sustrato sólido. En algunos aspectos, el primer sustrato y el segundo sustrato son el mismo. En algunos aspectos, el primer sustrato y el segundo sustrato no son los mismos.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la al menos primera pluralidad de cebadores de anclaje o la al menos segunda pluralidad de cebadores de anclaje está dispuesta en una matriz. En algunos aspectos, la al menos primera pluralidad de cebadores de anclaje está dispuesta en una primera matriz y la al menos segunda pluralidad de cebadores de anclaje está dispuesta en una segunda matriz. En algunos aspectos, la primera matriz y la segunda matriz son la misma. En algunos aspectos, la primera matriz y la segunda matriz no son la misma.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, el grupo de bloqueo reversible es un grupo de bloqueo fotolábil. En algunos aspectos, retirar comprende exponer el grupo de bloqueo fotolábil a luz con una longitud de onda suficiente para inducir la retirada del grupo de bloqueo fotolábil.

La divulgación proporciona un método que comprende: a) poner en contacto al menos una primera pluralidad de soportes sólidos y al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo de al menos un cebador de anclaje de la al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una primera pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato; b) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una primera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros a al menos un primer cebador de anclaje-sustrato, en donde el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros comprende una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 5' y una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 3' que están orientadas de forma inversa entre sí, para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; c) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una segunda pluralidad de N-meros en condiciones que anexan al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros a al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, en donde el al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros comprende una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 5' y una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 3' que están orientadas de forma inversa entre sí, para producir al menos un primer complejo alargado; d) corta del al menos un primer complejo alargado una secuencia del ácido nucleico situada entre la ITR de orientación inversa en 3' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros y la ITR de orientación inversa en 5' del al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros para producir al menos un primer complejo donante; e) poner en contacto al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos y al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo de al menos un cebador de anclaje de la al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato; f) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una tercera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros a al menos un segundo cebador de anclaje-sustrato, en donde el al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros comprende una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 5' y una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 3' que están orientadas de forma inversa entre sí, para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido; g) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros en condiciones que anexan al menos un N-mero de esa al menos una cuarta pluralidad de N-meros a al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, en donde el al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros comprende una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 5' y una secuencia que codifica una repetición invertida en el extremo (ITR) 3' que están orientadas de forma inversa entre sí, para producir al menos un segundo complejo alargado; h) liberar una composición que comprende la ITR de orientación inversa en 5', el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros, la al menos una segunda pluralidad de N-meros, y una ITR de orientación inversa en 3' del al menos un primer complejo donante para producir al menos un complejo intermedio liberado; i) poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado en condiciones que anexan el al menos un complejo intermedio liberado a al menos un primer complejo diana para producir al menos un primer complejo diana extendido; y j) cortar del al menos un primer complejo diana extendido una secuencia del ácido nucleico entre el al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros y el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros situados para producir al menos un primer complejo diana extendido cortado.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la secuencia que codifica la 5' ITR y secuencia que codifica la 3' ITR del al menos un N-mero derivan de un transposón que corta con precisión.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la liberación comprende una actividad enzimática. En algunos aspectos, la liberación comprende una rotura en una secuencia de uno o más de una 3' ITR, un extremo 3', un extremo 5' o una 5' ITR. En algunos aspectos, la liberación produce nucleótidos protuberantes en 5' o a 3'.

5 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la liberación comprende una actividad no enzimática.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la anexión comprende una actividad enzimática. En algunos aspectos, la anexión comprende una ligación.

10 En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la anexión comprende una actividad no enzimática.

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, al menos un cebador de anclaje comprende una composición de la divulgación.

15 La divulgación proporciona un método que comprende: a) proporcionar un complejo molde que comprende al menos un molécula del ácido nucleico molde, en donde un primer extremo de la molécula del ácido nucleico molde está unido operativamente a un soporte sólido, en donde el primer extremo comprende una primera región de unión al cebador y, en donde un segundo extremo de la molécula del ácido nucleico molde comprende una segunda región de unión al cebador; b) poner en contacto el complejo molde y al menos un primer cebador de amplificación, en donde el al menos un primera cebador de amplificación comprende una secuencia del ácido nucleico que es complementaria a la segunda región de unión al cebador en condiciones suficientes para la hibridación del menos un primer cebador de amplificación a la segunda región de unión al cebador; c) extender el al menos un primer cebador de amplificación para producir al menos una primera molécula del ácido nucleico replicada; d) poner en contacto la al menos una primera molécula del ácido nucleico replicada y al menos un complejo de sustrato-cebador unido, en donde el al menos un complejo de sustrato-cebador unido comprende al menos un segundo cebador de amplificación unido operativamente a un soporte sólido, en donde el al menos un segundo cebador de amplificación comprende una secuencia del ácido nucleico complementaria a la primera región de unión al cebador en condiciones suficientes para la hibridación de ese al menos un segundo cebador de amplificación a al menos una primera molécula del ácido nucleico replicada; y e) extender el al menos un segundo cebador de amplificación para producir al menos un primer dúplex replicado.

20
25
30

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, al menos un soporte sólido comprende una composición de la divulgación.

35 La divulgación proporciona un método que comprende: (a) poner en contacto una pluralidad de secuencias del ácido nucleico en condiciones adecuados para al menos una primera secuencia para formar el primer dúplex con una segunda secuencia y la primera secuencia para formar un segundo dúplex con una tercer secuencia, en donde cada secuencia que comprende una primera región de complementariedad y una segunda región de complementariedad, en donde la primera región de complementariedad comprende una porción de la secuencia que puede formar un primer dúplex en presencia de la segunda secuencia, en donde la segunda región de complementariedad comprende una porción de secuencia que puede formar un segundo dúplex con una tercer secuencia, en donde la segunda secuencia y la tercera secuencia son distintas; y (b) inducir la síntesis desde un extremo 3' de al menos una secuencia del primer dúplex o el segundo dúplex en condiciones adecuadas para la polimerización del ácido nucleico para formar al menos 1 secuencia extendida.

40
45

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, la pluralidad de secuencias del ácido nucleico comprende secuencias codificantes y secuencias no codificantes. En algunos aspectos, la pluralidad de secuencias del ácido nucleico comprende al menos 2 secuencias codificantes o al menos 2 secuencias no codificantes. En algunos aspectos, la pluralidad de secuencias del ácido nucleico comprende al menos 2 secuencias codificantes o al menos 2 secuencias no codificantes. En algunos aspectos, el método forma al menos 2 secuencias codificantes extendidas o al menos 2 secuencias no codificantes extendidas. En algunos aspectos, el método comprende además la anexión de al menos 2 secuencias codificantes extendidas o al menos 2 secuencias no codificantes extendidas para formar una hebra codificante unificada o una hebra no codificante unificada. En algunos aspectos, la anexión comprende una actividad enzimática. En algunos aspectos, la anexión comprende una ligación o una actividad ligasa. En algunos aspectos, la anexión comprende una actividad no enzimática.

50
55

En algunos aspectos de los métodos de la divulgación, al menos una secuencia de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico comprende un N-mero. En algunos aspectos, el N-mero es un 3-mero o un 5-mero. En algunos aspectos, al menos una secuencia de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico se produce según el método de la divulgación. En algunos aspectos, una porción de las secuencias de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico se produce según el método de la divulgación. En algunos aspectos, cada secuencia de la pluralidad de secuencias del ácido nucleico se produce según el método de la divulgación.

60

La divulgación proporciona una secuencia del ácido nucleico producida según el método de la divulgación.

65

La divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia del ácido nucleico de la divulgación, que incluye las producidas según el método de la divulgación.

5 La divulgación proporciona una composición que comprende una secuencia del ácido nucleico de la divulgación, que incluye las producidas según el método de la divulgación.

La divulgación proporciona una composición que comprende el vector de la divulgación.

10 La divulgación proporciona una célula que comprende una secuencia del ácido nucleico de la divulgación, que incluye las producidas según el método de la divulgación.

La divulgación proporciona una célula que comprende el vector de la divulgación.

15 La divulgación proporciona una célula que comprende la composición de la divulgación.

La divulgación proporciona una composición que comprende una célula de la divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) en color tras la solicitud y pago de la tasa necesaria.

25 La Fig. 1 es un diagrama esquemático que representa la idea central tras la síntesis geométrica. En este ejemplo, ocho N-meros diferentes y las secuencias de cebadores de anclaje unidas al sustrato sólido son los materiales de partida. La primera fila representa la situación después de las dos primeras rondas de ligación, en donde dos N-meros se han añadido a cebadores de anclaje. En etapas posteriores, tales como la fila dos, hay muestras diana, y muestras donantes. La muestra diana sigue unida a soportes sólidos y las muestras donantes son liberadas y usadas para extender muestras diana correspondientes. 30 Después de varias rondas, una única muestra diana posee la sintetizada completa. Aquí, la cadena sintética completa comprende el 16 N-mero en una configuración única.

35 La Fig. 2A-D es un diagrama que muestra cuatro secuencias de cebadores de anclaje posibles diferentes. A) para la extensión de 3' y B) para la extensión de 5' son ejemplos de secuencias de baja complejidad que poseen un sitio de enzima de restricción S de tipo II, MlyI. C) para la extensión de 3' es una secuencia de baja complejidad que posee una desoxiuridina (U) para la liberación usando una combinación de uracil ADN glicosilasa y ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. Finalmente, D) la combinación de desoxiadenosina (A) y desoxiinosina (I) en el extremo 5' de una secuencia del cebador de anclaje de baja complejidad es una diana de la endonucleasa V para la liberación del producto de AN sintético.

40 La Fig. 3A-B destaca un fragmento de ADNc de GFP, usado en la presente divulgación para demostrar el método de síntesis geométrico en 3'. A) muestra una representación de FASTA de la secuencia de ADNc completa para la proteína verde fluorescente (GFP) (número de acceso NCBI L29345). El fragmento de demostración comprende las ocho primeras secuencias 21-meras. Estas están destacadas en una gama de colores. B) muestra la distribución de secuencias 21-meras en dos conjuntos de placas para el ensamblaje usando el método de síntesis geométrico en 3'. Los ocho primeros 21-meros están 45 destacados en los colores correspondientes a la representación del archivo de FASTA.

50 La Fig. 4 es una representación esquemática de la primera etapa de ligación. En este ejemplo, los pocillos 1A1, 1A2, 1A3 y 1A4 reciben un fragmento 21-mero con $-PO_4$ en 3' y 5', se añade ligasa a las reacciones. Después de la ligación, la polimerasa de Klenow con actividad exonucleasa 3'-5' se añade para retirar los cebadores de anclaje no ligación. Finalmente, se añade fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) para retirar los grupos $-PO_4$ en 3' para preparar el AN para la segunda ronda de ligación.

55 La Fig. 5 es una representación esquemática de la segunda etapa de ligación. Al igual que con la primera etapa de ligación, cada uno de los pocillos 1A1, 1A2, 1A3 y 1A4 recibe un fragmento 21-mero que lleva grupos $-PO_4$ en 3' y 5', se añade ligasa a las reacciones. Después de la elongación por ligación, se añade polimerasa de Klenow con actividad exonucleasa 3'-5' para retirar los cebadores de anclaje no ligación. Finalmente, se añade fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) a 1A1 y 1A3 para retirar los grupos $-PO_4$ en 3' para preparar el AN en los pocillos como dianas para la siguiente ligación. Los pocillos 1A2 y 60 1A4 se dejan con grupos $-PO_4$ en 3'.

65 La Fig. 6 es una representación esquemática de la primera reacción de liberación. En primer lugar se mezclan muestras donantes 1A2 y 1A4 con oligonucleótidos complementarios inversos cortos, que generan sitios MlyI bicatenarios en ADN parcialmente bicatenario. Estas muestras se digieren a continuación con endonucleasa de restricción MlyI, momento en el que el fragmento monocatenario

liberado recién sintetizado está listo para la ligación a la muestra diana apropiada. En este caso, el fragmento liberado de 1A2 se ligará a la muestra diana 1A1 y el fragmento de 1A4 se unirá a la muestra diana 1A3.

5 La Fig. 7 es una representación esquemática de la tercera ligación, que combinará extender el AN en 1A1 por ligación del AN sintetizado de 1A2, así como extender el AN de 1A3 con el AN de 1A4. Finalmente, el AN producto de 1A3 se libera por escisión con MlyI.

10 La Fig. 8 es una representación esquemática de la cuarta ligación y final para este ejemplo. El producto de AN de la muestra 1A3 se liga al AN extendido del pocillo 1A1. Después de la purificación, el AN producto final se libera de los soportes sólidos por digestión con MlyI.

15 La Fig. 9 muestra una disposición de placas y movimientos de pipeteo. En este ejemplo, una placa de 384 pocillos se representa usando 16 x 16 pocillos (A1-P16). Las transferencias se realizan en dos fases. En primer lugar, las transferencias de columna (la columna inicial destacada en rojo) tienen lugar durante 4 ciclos (después de la adición inicial de dos N-meros a cada pocillo). En el primer ciclo, los contenidos de los pocillos de la columna 16 sirven de donantes para la columna 15, la columna 14 para la columna 13 y así sucesivamente. En el segundo ciclo, los pocillos de la columna 15 sirven de donantes para la columna, etc. En el ciclo 4, los pocillos de la columna 9 sirven de donantes para la columna 1. En la segunda fase, todas las transferencias ocurren dentro de la columna 1. En primer lugar, para el ciclo 5, el pocillo P1 (destacado en verde) sirve de donante para el pocillo O1, el pocillo N1 para el pocillo M1 y así sucesivamente. Por último lugar, el pocillo I1 es el donante para el pocillo A1 dando un producto final. Si los N-meros iniciales fueran todos 3-meros, el producto final sería de 1536 bases de longitud. Asimismo, con 5-meros, el producto final sería de 2560 bases de longitud.

20 Fig 10. Se puede variar el tamaño del N-mero. En 4 ciclos, los 3-meros generarán 96 bases, 4-meros -> 128 bases y 5-meros -> 160 bases. Se pueden variar el número y la longitud de los fragmentos, así como el tamaño de superposición. En este ejemplo con 6 fragmentos, 96 bases cada uno y 24 pb de superposición, el producto resultante sería de 456 pb de longitud, 160 fragmentos de bases y 24 pb de superposición darían un producto de 840 pb.

25 La Fig. 11 representa la síntesis rápida y acelerada de AN largos usando una co-síntesis mixta 3', 5' con relleno de ADN polimerasa y ligación. En este ejemplo, se lleva a cabo una reacción de hibridación con 16 fragmentos complementarios parcialmente superpuestos. En una reacción de polimerasa posterior, se extiende cada extremo 3' de superposición. Finalmente, en una reacción de ligasa, se resuelven las roturas entre fragmentos.

30 La Fig. 12 es un mapa genérico de plásmidos para la síntesis geométrica mediada por transposasa. El plásmido lleva un transposón modificado. En lugar de la orientación normal de las secuencias de repeticiones invertidas en los extremos (ITR) izquierdo (verde con triángulo violeta) y derecho (rojo con triángulo violeta), aquí las ITR están orientadas de forma inversa con la secuencia de N-meros entre ellas. La secuencia a la izquierda y a la derecha de las ITS (gris) está presente para cumplir un requisito para un tamaño de transposón mínimo más un sitio de endonucleasa de restricción apropiado. Además del transposón y las secuencias N-meras, la construcción también tiene un plásmido troncal, tal como pUC19 que lleva un gen LacZ alfa con un sitio de clonación múltiple, un origen de replicación y un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a ampicilina.

35 La Fig. 13 representa la síntesis geométrica de ADN bicatenario mediada por ligación y la actividad de transposasas de corte con precisión. 1) La ligación de un N-mero que lleva un transposón inverso en cebadores de anclaje va seguida de la purificación de la reacción. 2) Un segundo N-mero que lleva un transposón inverso se liga a continuación a la cadena de AN en extensión en el soporte sólido seguido de purificación. 3) El tratamiento de la cadena de AN en extensión con transposasa conduce al corte de la secuencia intercalada entre las dos secuencias de N-meros. 3) La cadena de AN cortada ligada puede ser liberada de las perlas por una reacción de RE y a continuación puede servir de 'donante' para una reacción de ligación posterior. 4) Ciclos de escisión y transferencia, ligación y purificación, seguidos de corte usando 'donantes' y 'dianas' apropiados conducirán con el tiempo a la secuencia de AN deseada.

40 La Fig. 14 representa composiciones y métodos para la amplificación de AN por amplificación por transferencia de superficie a superficie. En este ejemplo, el molde (rosa oscuro con un extremo verde oscuro y un extremo negro) se hace reaccionar sobre una perla (círculo pequeño azul) (superficie donante). Las moléculas de AN molde (rosa oscuro) poseen secuencias únicas en el extremo proximal (cerca de la perla, representado en negro) y el extremo distal (lejos de la perla, representado en verde oscuro). En el caso de una reacción de síntesis geométrica, la secuencia única distal (verde oscuro) se puede ligar en la secuencia molde. Estas secuencias se usan como dianas para cebadores: cebadores negros unidos a las perlas (círculo pequeño azul y semicírculo grande azul), que en el caso de síntesis geométrica, sería esencialmente los cebadores de anclaje, y los cebadores de color verde claro que están

libres en disolución. En la reacción de amplificación, que puede estar mediada por PCR o RPA, una polimerasa (flecha violeta) que se sintetiza a partir de un cebador libre unido al molde (verde claro) hará una copia del complemento inverso (rosa claro con un extremo verde claro y un extremo gris) del AN molde. La cadena replicada (copia) liberada, por ejemplo, durante la fase de fusión de un ciclo de PCR, se puede hibridar a continuación con los cebadores unidos a la superficie aceptora (semicírculo grande azul) (superficie aceptora). Las cadenas de la copia sirven entonces de moldes para la nueva generación de moléculas de AN originales mediada por polimerasa que se sintetizan a partir de cebadores unidos a la superficie (negro).

5

La Fig. 15 es una visión general esquemática de síntesis geométricas. En este ejemplo, los materiales de partida son ocho N-meros diferentes y las secuencias de cebadores de anclaje unido al sustrato sólido.

10

La Fig. 16 es una visión general esquemática del método de síntesis geométrica por extensión de 5' de la presente divulgación.

15

La Fig. 17 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos del método de síntesis geométrica por extensión de 5' de la presente divulgación.

20

La Fig. 18 es una visión general esquemática del método de síntesis lineal modular de 5' de la presente divulgación.

La Fig. 19 es un diagrama y una imagen que demuestra que un aptámero de ARN de espinaca baby sintetizado usando los métodos de la presente divulgación es activo y potencia la fluorescencia de DRHBI.

25

La Fig. 20 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos del método de síntesis lineal modular de 5' de la presente divulgación.

La Fig. 21 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos del método de síntesis lineal modular de 5' con adenilación en 5'.

30

La Fig. 22 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos del método de síntesis lineal modular de 5' con fosforilación en 5'.

La Fig. 23 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos del método de síntesis geométrica por extensión de 3' de la presente divulgación.

35

La Fig. 24 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos de diversas reacciones de ligación que comprenden 3-meros, 6-meros y 12-meros de la presente divulgación.

40

La Fig. 25 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos de reacciones de digestión de XRN-1 tras diversas reacciones de ligación que comprenden N-meros de la presente divulgación.

La Fig. 26 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos de diversas reacciones de unión de N-meros que comprenden ADN, ARN y combinaciones de los mismos.

45

La Fig. 27 es un gráfico que muestra la eficiencia de ligación de diversos N-meros que comprenden ADN, ARN o combinaciones de los mismos.

La Fig. 28 es un gráfico que muestra la eficiencia de ligación de diversas reacciones de ligación en las que el nucleótido ligado en 5' es un desoxinucleótido y el nucleótido ligado en 3' es un ribonucleótido.

50

La Fig. 29 es una imagen de un gel de poliacrilamida usado para analizar los productos de las reacciones de ligación que comprenden cebadores de anclaje unidos a perlas usando química de Click o biotina.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona composiciones, kits y métodos para la síntesis enzimática geométrica de ácidos nucleicos sin molde de una secuencia programada arbitrariamente.

60

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos para la síntesis enzimática e independiente de molde de polímeros de ácido nucleico (AN) usando fragmentos de AN cortos sin error, ensamblados sistemáticamente para formar cadenas de AN arbitrariamente larga. Se pueden sintetizar secuencias de AN únicas por la unión sistemática de secuencias de AN más cortas usando amplias bibliotecas de oligonucleótidos cortos purificados y secuencias constantes de cebadores. Las bibliotecas de secuencias de fragmentos de AN cortos sin error pueden variar en tamaño, pero una amplia cobertura de todas las posibles secuencias es más factible con 3-

65

meros, que tiene 64 secuencias posibles, 4-meros, con 256 secuencias posibles y 5-meros con 1024 secuencias posibles. Se puede ensamblar cualquier secuencia más larga por una combinación secuencial de 3-meros, 4-meros o 5-meros, denominados conjuntamente N-meros. La presente divulgación también proporciona composiciones de bibliotecas de plásmidos que contienen todos los posibles 3-meros, 4-meros y 5-meros en forma de elementos enzimáticamente cortables. La presente divulgación proporciona composiciones de N-meros modificados, secuencias ensambladas, construcciones de plásmido, condiciones de reacción, sustratos de reacción y secuencias de oligonucleótidos cortas patentadas. Además, la presente divulgación proporciona varios métodos diferentes para la generación rápida y precisa de cadenas de AN largas arbitrarias, así como amplificación de superficie a superficie de moléculas de AN.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden N-meros para tanto la extensión en 3' como en 5' en síntesis de AN sin molde. Estos N-meros incluyen todos los posibles 3-meros (64), 4-meros (256) y 5-meros (1024) que comprenden ARN o ADN. Durante la extensión en 5' sin molde, los oligonucleótidos N-meros no requieren un grupo fosfato en ninguno del extremo 3' o 5'. Durante la extensión en 3' sin molde, los N-meros pueden poseer un grupo fosfato en tanto los extremos 3' y como 5' de cada oligonucleótido. Además, los N-meros pueden incluir grupos de bloqueo de extensión reversible, tales como grupos de bloqueo fotolábiles o el grupo fosfato de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-PO₄), en cualquiera del extremo 5', el extremo 3', o ambos extremos del oligonucleótido N-mero. Además, los extremos 5' se pueden activar por adenilación en 5' para la ligación posterior con enzimas apropiadamente selectivas. La adenilación en 5' se puede realizar, por ejemplo, por tratamiento del N-mero con ARN ligasa Mth.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden N-meros de cualquier posible 3-mero (64), 4-mero (256) y 5-mero (1024) que comprenda ARN, ADN o una combinación de los mismos. Estos N-meros pueden ser moléculas de AN quiméricas con un extremo 5' de desoxirribosa (ADN) y un extremo 3' de ribosa (ARN). Estos N-meros pueden estar comprendidos completa o parcialmente en esqueletos de ADN, ARN.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden módulos ensamblados de N-meros en oligonucleótidos de AN de longitud y secuencia arbitrarias. Estos oligonucleótidos pueden comprender completa o parcialmente ADN o ARN.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden N-meros para la extensión en 3' en la síntesis de AN sin molde. Estos N-meros incluyen todos los posibles 3-meros (64), 4-meros (256) y 5-meros (1024) que comprenden ARN o ADN. Estos N-meros poseen grupos trifosfato en 5' que pueden ser un sustrato para la actividad transferasa terminal.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de cebadores de anclaje, que son secuencias de oligonucleótidos cortas patentadas unidas generalmente a un soporte sólido con el extremo 3' o 5' distal al soporte sólido. Estas secuencias de oligonucleótidos se diseñan para permitir la retirada específica de secuencias adicionales que se han extendido desde el extremo de la secuencia del cebador de anclaje. La retirada específica desde el extremo distal de la secuencia del cebador de anclaje se puede llevar a cabo de varias formas.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden uniones de cebadores de anclaje a soportes sólidos. Las uniones pueden estar mediadas no covalentemente, tales como por interacciones de biotina y avidina, o pueden ser enlaces covalentes, tales como una variedad de químicas de 'click'. Las uniones pueden incluir moléculas espaciadoras, tales como polietilenglicol (PEG) o trietilenglicol (TEG).

En ciertos aspectos de las composiciones de la presente divulgación, para la liberación precisa de AN sintéticos, se incluyen AN de cebadores de anclaje con sitios abásicos situados apropiadamente, que se pueden cortar con la ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII. Además, los sitios de desoxiuridina (U) situados apropiadamente pueden hacerse abásico por primera vez mediante la actividad de uracil ADN glicosilasa, a continuación el sitio abásico resultante se puede cortar usando la ADN glicosilasa-liasa endonucleasa VIII.

En ciertos aspectos de las composiciones de la presente divulgación, para la liberación precisa de AN sintéticos, se incluyen AN de cebadores de anclaje con sitios de desoxiinosina (I) situados apropiadamente, que se pueden cortar con la endonucleasa V.

En ciertos aspectos de las composiciones de la presente divulgación, para la liberación precisa de AN sintéticos, se incluyen AN de cebadores de anclaje con sitios situados apropiadamente para la escisión mediante una variedad de endonucleasas de restricción (RE). Estos sitios de nucleasa de restricción pueden ser para las RE de corte oblicuo, denominadas endonucleasas de restricción S de tipo II, tales como la enzima MlyI.

En ciertos aspectos de las composiciones de la presente divulgación, para la liberación precisa de AN sintéticos, se incluyen AN de cebadores de anclaje con sitios situados apropiadamente para el corte monocatenario específico por Cas9 y ARN guía apropiados.

- 5 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden soportes sólidos. Varios soportes sólidos son eficaces en el contexto de la síntesis geométrica. Específicamente, los soportes sólidos incluyen perlas microscópicas, magnéticas o no magnéticas, hechas de poliacrilamida, poliestireno, agarosa reticulada u otros materiales similares. Los soportes sólidos también pueden incluir superficies de plástico o vidrio, tales como las superficies de pocillos de placas multipocillo. Los soportes sólidos se pueden tratar para potenciar las propiedades de unión de AN o permitir las actividades enzimáticas específicas. Asimismo, las superficies se pueden tratar para prevenir la unión no específica o no deseada.
- 10 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden ADN o ARN ligasas, ya sea ribozima o proteína, tal como ARN ligasa T4, que incluye ADN o ARN ligasas mutantes o modificadas, que requieren sustratos N-meros adenilados en 5'. La ligasa se mezcla con cebadores de anclaje unidos a la superficie sólida y / o AN extendido y N-meros en disoluciones de reacción apropiadas para afectar la extensión de la cadena de AN por una y solo una unidad N-mera.
- 15 En ciertos aspectos de las composiciones de la presente divulgación, la extensión de la cadena de AN sintética está mediada por enzimas transferasas terminales, tales como la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), miembros de la familia X de ADN polimerasas o ADN polimerasa Pol theta.
- 20 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de AN obtenidas por primera vez a partir de un proceso de síntesis geométrica. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las secuencias de AN se generan por combinaciones de N-meros. Estas secuencias de AN se pueden generar por el método geométrico en 3', por el método geométrico en 5', por el método geométrico de transposasa o por el método de co-síntesis geométrica de 3', 5'.
- 25 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de AN obtenidas por primera vez de una síntesis paralela por extensión en 3' usando N-meros. Se prepara una multiplicidad de secuencias de AN generadas en paralelo por una extensión de uno en uno de los cebadores de anclaje unidos al soporte sólido.
- 30 La presente divulgación proporciona composiciones de secuencias plasmídicas que poseen secuencias N-meras para la adición enzimática de N-meros usando elementos de transposasa. La actividad de transposasas conduce al corte de secuencias específicas del transposón a partir de la cadena de AN sintética que se alarga, dejando solo adiciones N-meras. El diseño de plásmidos básicos incluye 1) elementos de repeticiones invertidas en los extremos (ITR) derecho e izquierdo derivados de transposón de orientación inversa situados en cualquier lado de una secuencia de N-meros, 2) un marcador de selección, tal como resistencia a ampicilina, 3) un origen de replicación y 4) un sitio de clonación múltiple que contiene un conjunto apropiado de sitios de endonucleasa de restricción. La presente divulgación proporciona composiciones para una pluralidad de secuencias plasmídicas, cada una de las cuales posee una secuencia de N-meros única, así como secuencias específicas de transposón y elementos para la propagación del plásmido en células bacterianas.
- 35 La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un sistema para la amplificación de productos intermedios o productos finales de la síntesis geométrica de AN. Los soportes sólidos, por ejemplo perlas, superficies de placas de micropocillos o superficies de portaobjetos de vidrio, están recubiertas con cebadores de oligonucleótidos, que también son cebadores de anclaje para las reacciones de síntesis en curso. Se ponen juntos una superficie que lleva un molde y una superficie que lleva el cebador de anclaje en un tampón de reacción común, junto con cebadores de oligonucleótidos libres, que son la secuencia complementaria inversa del extremo distal del AN molde. La amplificación se lleva a cabo por reacción en cadena de la polimerasa, reacción de recombinasa-polimerasa o una replicación de AN similar, amplificación sistema.
- 40 La presente divulgación proporciona un método de síntesis geométrica por extensión en 5'. Inicialmente, se configura un número apropiado de muestras, por ejemplo en placas multipocillo. Cada muestra contiene en primer lugar cebadores de anclaje, que llevan -PO₄ en los extremos 5' y se han fijado a soportes sólidos. 1) El proceso empieza con la ligación de una especie de N-mero en cebadores de anclaje. Los N-meros llevan un -OH en cada uno de los extremos 3' y 5'. 2) Después de la primera ligación, una exonucleasa 5' a 3' específica, tal como la exonucleasa lambda, se usa para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos. Lambda no puede digerir los AN que llevan un -OH en 5'. 3) Después de la digestión con exonucleasa, las muestras se tratan con el polinucleótido cinasa (PNK), para producir un -PO₄ en cada extremo 5'. 4) Se lleva a cabo una segunda ronda de ligación con otra especie de N-mero como en la primera ligación, esto va seguido de una digestión similar con exonucleasa 5' a 3'. 5) Después de las dos primeras rondas de ligación y tratamiento con exonucleasa, las muestras se convierten en 'dianas' o 'donantes'. 5a) Las muestras diana reciben tratamiento con PNK. 5b) Las muestras donantes son liberadas del soporte sólido, preservando los grupos -OH tanto en los grupos 3' como 5', usando los métodos descritos, tales como una enzima de restricción para cortar un cebador de anclaje parcialmente bicatenario. En las rondas posteriores, las muestras 'donantes' se ligan a las muestras 'diana' según 1), 2) y 5).
- 45 La presente divulgación proporciona un método de síntesis geométrica por extensión en 3'. Inicialmente, se configura un número apropiado de muestras, por ejemplo en placas multipocillo. Cada muestra contiene en primer

lugar cebadores de anclaje, que llevan -OH en los extremos 3' y se han fijado a soportes sólidos. 1) El proceso empieza con la ligación de una especie de N-mero en cebadores de anclaje. Los N-meros llevan un -PO₄ en cada uno de los extremos 3' y 5'. 2) Después de la primera ligación, una exonucleasa 5' a 3' específica, tal como Klenow, se usa para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos. Klenow no puede digerir los AN que llevan un -PO₄ en 3'. 3) Después de la digestión con exonucleasa, las muestras se tratan con fosfatasa, tal como fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) o fosfatasa alcalina de camarón (SAP), para retirar -PO₄ de 3'. 4) Se lleva a cabo una segunda ronda de ligación con otra especie de N-mero como en la primera ligación, esto va seguido de una digestión similar con exonucleasa 3' a 5'. 5) Después de las dos primeras rondas de ligación y tratamiento con exonucleasa, las muestras se convierten en 'dianas' o 'donantes'. 5a) Las muestras diana reciben tratamiento con fosfatasa. 5b) Las muestras donantes son liberadas del soporte sólido, preservando los grupos -PO₄ tanto en 3' como en 5' usando los métodos descritos, tales como una enzima de restricción que corta un cebador de anclaje parcialmente bicatenario. En las rondas posteriores, las muestras 'donantes' se ligan a las muestras 'diana' según 1), 2) y 5).

La presente divulgación proporciona un método de síntesis paralela por extensión en 3' usando N-meros. Los N-meros descritos en la presente divulgación también pueden poseer bloques reversibles en el grupo hidroxilo de 3', que hacen que el sitio no esté disponible para la incorporación enzimática de nucleótidos adicionales, N-meros u oligonucleótidos más largos. El bloque reversible se puede retirar mediante una variedad de métodos, que incluyen exposición a luz o reactivos químicos. En la síntesis paralela, se pueden controlar específicamente muchas reacciones diferentes permitiendo la incorporación arbitraria de N-meros específicos. En una rejilla bidimensional, las regiones son tratadas específicamente por luz enfocada en elementos de rejilla. Las áreas expuestas se activan y a continuación son capaces de incorporar la secuencia de oligonucleótidos corta disponible. La rejilla bidimensional puede empezar con la unión general de secuencias de cebadores de anclaje bloqueadas reversiblemente en 3'. Si se requiere la incorporación de un N-mero específico, tal como ACG, entonces la región de la rejilla bidimensional donde se requiere ACG se expone a la luz, que invertirá el bloqueo y permitirá que el N-mero de ACG se incorpore únicamente allí. Dicho proceso ocurre para los 64 3-meros posibles bloqueados adecuadamente en el extremo 3'. Cualquier combinación de secuencias posible se puede manifestar en cualquier ubicación específica en la rejilla. La rejilla puede ser una cámara con regiones activadas sobre un vidrio plano o superficie similar. Además, la rejilla puede ser una cámara capaz de contener una matriz de perlas con cebadores de anclaje unidos. En cualquier caso, los reactivos de las reacciones se suministran por un sistema microfluídico.

La presente divulgación proporciona un método de síntesis geométrica bicatenaria mediada por transposasas. Este método se basa en un conjunto de plásmidos con repeticiones en los extremos izquierdo y derecho orientadas de forma inversa de un transposón de corte con precisión, tal como piggyBac. Cada plásmido en el conjunto lleva una secuencia de N-meros diferente (3-, 4- y 5-meros). Antes de las reacciones de síntesis, cada secuencia de N-meros requerida es cortada de su plásmido troncal por endonucleasa de restricción (RE) apropiada o digestión similar. Al igual que con los métodos de síntesis geométricos de extensión en 5' y 3', se llevan a cabo reacciones paralelas múltiples. Cada reacción posee un soporte sólido que lleva una secuencia del cebador de anclaje bicatenaria con un sitio de RE distal compatible con la RE usada para cortar la secuencia de N-meros de los plásmidos. 1) El proceso empieza con la ligación de un N-mero que lleva transposón inverso en cebadores de anclaje, seguido de purificación de la reacción. Al colocar la secuencia de repeticiones invertidas en los extremos (ITR) de lado izquierdo normal en el lado derecho y la ITR de lado izquierdo en el lado izquierdo de la secuencia de N-meros, el transposón inverso resultante no es una actividad transposasa diana. 2) Un segundo N-mero que lleva un transposón inverso se liga a continuación a la cadena de AN en extensión en el soporte sólido seguido de purificación. 3) El tratamiento de la cadena de AN en extensión con transposasa conduce al corte de la secuencia intercalada entre las dos secuencias de N-meros. 3) La cadena de AN cortada ligada puede ser liberada de las perlas por una reacción de RE y a continuación puede servir de 'donante' para una reacción de ligación posterior. 4) Ciclos de escisión y transferencia, ligación y purificación, seguidos de corte usando 'donantes' y 'dianas' apropiados conducirán con el tiempo a la secuencia de AN deseada.

La presente divulgación proporciona un método de co-síntesis geométrica por extensión en 5' y extensión en 3'. Esto permite la síntesis de AN largo acelerada y rápida usando una co-síntesis mixta de 3', 5' con relleno y ligación de ADN polimerasa. Inicialmente, se genera un conjunto de fragmentos de AN parcialmente superpuestos usando otro método. Se lleva a cabo una reacción de hibridación con los fragmentos complementarios parcialmente superpuestos. Una reacción de polimerasa extiende cada uno de los extremos 3' que se extienden. El producto final se genera por una reacción de ligasa que resolvió las roturas entre fragmentos.

La presente divulgación proporciona un método de amplificación por transferencia de superficie a superficie. La amplificación empieza con moléculas molde, que se hacen reaccionar sobre un soporte sólido. Las moléculas de AN molde llevan secuencias únicas en los extremos proximal y distal. En el caso de una reacción de síntesis geométrica, la secuencia distal única se puede ligar en la secuencia molde. Estas secuencias se usan como dianas para los cebadores: cebadores unidos a las perlas, que en el caso de la síntesis geométrica serían esencialmente los cebadores de anclaje, y cebadores opuestos que están libres en disolución. En la reacción de amplificación, que puede estar mediada por PCR o RPA, una polimerasa que se sintetiza a partir de un cebador libre unido al molde hará una copia del complemento inverso del AN molde. La cadena replicada se libera, por ejemplo, durante la fase de fusión de un ciclo de PCR, y a continuación se puede hibridar con cebadores unidos a la superficie

5 aceptora. Las cadenas de la copia sirven entonces de moldes para la nueva generación de moléculas de AN originales mediada por polimerasa que se sintetizan a partir de cebadores unidos a la superficie (negro). En la amplificación por transferencia de superficie a superficie, muchas superficies funcionarán. La superficie donante podría ser una perla pequeña y la aceptora una perla más grande. Si la perla más pequeña tuviera 20 μm de diámetro y la perla más grande 150 μm de diámetro, el grado de amplificación sería superior a 50 veces. Alternativamente, el molde puede estar inicialmente sobre la superficie de un pocillo de una placa multipocillo y la superficie aceptora podría ser una perla introducida en el pocillo. Asimismo, la superficie donante puede ser una perla pequeña introducida en un pocillo de gran superficie o en una superficie plana de un portaobjetos de microscopio. Los AN son tanto amplificados como transferidos en la reacción.

10 Cualquiera de los anteriores aspectos se puede combinar con cualquier otro aspecto.

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. En la memoria descriptiva, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario; como ejemplos, los términos "un", "una" y "el" se entienden en singular o plural y el término "o" se entiende como inclusivo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa uno o más elementos. A lo largo de la memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "que comprende" o variaciones de la misma, como "comprende" o "que comprende" implica la inclusión de un elemento, número entero o paso indicado, un grupo de elementos, números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos. Aproximadamente se puede entender dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor indicado. A menos que quede claro lo contrario a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en el presente documento se modifican por el término "aproximadamente".

25 **N-meros**

30 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un N-mero, como se describe en detalle en el presente documento. Un N-mero puede comprender un polinucleótido. Un N-mero puede comprender al menos aproximadamente 1 nucleótido, o al menos aproximadamente 2 nucleótidos, o al menos aproximadamente 3 nucleótidos, o al menos aproximadamente 4 nucleótidos, o al menos aproximadamente 5 nucleótidos, o al menos aproximadamente 6 nucleótidos, o al menos aproximadamente 7 nucleótidos, o al menos aproximadamente 8 nucleótidos, o al menos aproximadamente 9 nucleótidos, o al menos aproximadamente 10 nucleótidos, o al menos aproximadamente 11 nucleótidos, o al menos aproximadamente 12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 13 nucleótidos, o al menos aproximadamente 14 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15 nucleótidos, o al menos aproximadamente 16 nucleótidos, o al menos aproximadamente 17 nucleótidos, o al menos aproximadamente 18 nucleótidos, o al menos aproximadamente 19 nucleótidos, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos, o al menos aproximadamente 21 nucleótidos, o al menos aproximadamente 22 nucleótidos, o al menos aproximadamente 23 nucleótidos, o al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 25 nucleótidos, o al menos aproximadamente 26 nucleótidos, o al menos aproximadamente 27 nucleótidos, o al menos aproximadamente 28 nucleótidos, o al menos aproximadamente 29 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o al menos aproximadamente 31 nucleótidos, o al menos aproximadamente 32 nucleótidos, o al menos aproximadamente 33 nucleótidos, o al menos aproximadamente 34 nucleótidos, o al menos aproximadamente 35 nucleótidos, o al menos aproximadamente 40 nucleótidos, o al menos aproximadamente 45 nucleótidos, o al menos aproximadamente 50 nucleótidos, o al menos aproximadamente 60 nucleótidos. Un N-mero que comprende 1 nucleótidos se denomina en el presente documento un 1-mero, un N-mero que comprende 2 nucleótidos se denomina en el presente documento un 2-mero, etc.

50 En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo $-\text{PO}_4$ en 3'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo $-\text{PO}_4$ en 5'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo $-\text{PO}_4$ en 3' y un grupo $-\text{PO}_4$ en 5'.

55 En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo $-\text{OH}$ en 3'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender a un grupo $-\text{OH}$ en 5'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo $-\text{OH}$ en 3' y un grupo $-\text{OH}$ en 5'.

60 En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo trifosfato en 3'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo trifosfato en 5'. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo trifosfato en 3' y un grupo trifosfato en 5'.

65 En algunos aspectos, un N-mero puede comprender ADN. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender ADN. En algunos aspectos, un N-mero puede comprender ADN y ARN, denominado en el presente documento un N-mero quimérico. Un N-mero pueden estar comprendido completa o parcialmente de ADN o ARN. Un N-mero puede ser aproximadamente 1 %, o aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 %, o aproximadamente 25 %, o aproximadamente 30 %, o aproximadamente 35 %, o aproximadamente 40 %, o aproximadamente 45 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 55 %, o

aproximadamente 60 %, o aproximadamente 65 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de ARN. Un N-mero puede ser aproximadamente 1 %, o aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 %, o aproximadamente 25 %, o aproximadamente 30 %, o aproximadamente 35 %, o aproximadamente 40 %, o aproximadamente 45 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 55 %, o aproximadamente 60 %, o aproximadamente 65 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de ADN.

En algunos aspectos, un N-mero puede ser un N-mero quimérico que comprende un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo de 3' (ARN) de ribosa. En algunos aspectos, un N-mero puede ser un N-mero quimérico que comprende un extremo 3' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 5' (ARN) de ribosa. En algunos aspectos, un N-mero puede ser un N-mero quimérico que comprende un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 3' (ADN) de desoxirribosa. En algunos aspectos, un N-mero puede ser un N-mero quimérico que comprende un extremo 5' (ARN) de ribosa y un extremo de 3' (ARN) de ribosa.

En algunos aspectos, un N-mero puede comprender un grupo de bloqueo de la extensión reversible. Un grupo de bloqueo de la extensión reversible es un grupo químico que previene la ligación y/o extensión en los extremos de la molécula del ácido nucleico al que está unido y que se puede retirar, por ejemplo, por exposición a luz de una longitud de onda específica o a sustancias químicas particulares. En algunos aspectos, un grupo de bloqueo de la extensión reversible puede ser un grupo de bloqueo fotolábil o un fosfato de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-PO₄). Un N-mero puede tener un grupo de bloqueo reversible en el extremo 5'. Un N-mero puede tener un grupo de bloqueo reversible en el extremo 3'. Un N-mero puede tener un grupo de bloqueo reversible en tanto el extremo 5' como 3'. Como se usa en el presente documento, los términos "grupo de bloqueo" y "grupo protector" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, los términos "retirar el grupo de bloqueo" y "desproteger" se usan indistintamente.

En algunos aspectos, el extremo 5' de un N-mero se puede activar por adenilación en 5' para la posterior ligación con enzimas selectivas apropiadamente.

Los N-meros como se describen en el presente documento se pueden usar en cualquier método de la presente divulgación, como se describe en el presente documento.

Bibliotecas de N-meros

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una biblioteca de N-meros. Una biblioteca de N-meros comprende una pluralidad de especies de N-meros, de forma que existe al menos un N-mero que comprende cada posible secuencia del ácido nucleico para la longitud dada de N-meros en la biblioteca. Por ejemplo, en una biblioteca de N-meros, en donde los N-meros comprenden 3 nucleótidos (3-mero), existen 64 secuencias posibles de 3 nucleótidos. Así, una biblioteca de 3-meros de la presente divulgación comprende al menos 64 especies de 3-meros. En otro ejemplo, en una biblioteca de N-meros, en donde los N-meros comprenden 4 nucleótidos (4-mero), existen 256 secuencias posibles de 4 nucleótidos. Por lo tanto, una biblioteca de 4-meros de la presente divulgación comprende al menos 256 especies de N-meros. En otro ejemplo, en una biblioteca de N-meros, en donde los N-meros comprenden 5 nucleótidos (5-mero), existen 1024 secuencias posibles de 5 nucleótidos. Por lo tanto, una biblioteca de 5-meros de la presente divulgación comprende al menos 1024 especies de N-meros. Esto se puede extrapolar a bibliotecas de N-meros con cualquier número de nucleótidos en cada N-mero: una biblioteca de N-meros que comprenden x nucleótidos (x -mero) comprenden al menos 4^x especies diferentes de x -meros.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona bibliotecas de N-meros que comprenden todos los posibles 3-meros (64), o 4-meros (256), o 5-meros (1024), o 6-meros (4096), o 7-meros (16,384), u 8-meros (65,536), o 9-meros (262,144), o 10-meros (1,048,576), etc., en donde los N-meros en la biblioteca comprenden ADN, ARN o una combinación de ARN y ADN.

En algunos aspectos, en las bibliotecas de la presente divulgación, cada especie de N-mero puede estar presente en la misma cantidad. En algunos aspectos, en las bibliotecas de la presente divulgación, cada especie de N-mero puede estar presente en cantidades diferentes. En algunos aspectos, en las bibliotecas de la presente divulgación, algunas especies de N-mero están presentes en la misma cantidad y otras especies de N-meros están presentes en cantidades diferentes.

Cada N-mero en una biblioteca de N-meros puede comprender cualquier atributo o característica como se describe en el presente documento.

Las bibliotecas de N-meros como se describe en el presente documento se pueden usar en cualquier método de la presente divulgación, como se describe en el presente documento.

Cebadores de anclaje

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden secuencias de cebadores de anclaje. Los términos "secuencias de cebadores de anclaje" y "cebadores de anclaje" se usan indistintamente en el presente documento.

Las secuencias de cebadores de anclaje pueden comprender un polinucleótido. Las secuencias de cebadores de anclaje pueden comprender al menos aproximadamente 1 nucleótido, o al menos aproximadamente 2 nucleótidos, o al menos aproximadamente 3 nucleótidos, o al menos aproximadamente 4 nucleótidos, o al menos aproximadamente 5 nucleótidos, o al menos aproximadamente 6 nucleótidos, o al menos aproximadamente 7 nucleótidos, o al menos aproximadamente 8 nucleótidos, o al menos aproximadamente 9 nucleótidos, o al menos aproximadamente 10 nucleótidos, o al menos aproximadamente 11 nucleótidos, o al menos aproximadamente 12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 13 nucleótidos, o al menos aproximadamente 14 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15 nucleótidos, o al menos aproximadamente 16 nucleótidos, o al menos aproximadamente 17 nucleótidos, o al menos aproximadamente 18 nucleótidos, o al menos aproximadamente 19 nucleótidos, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos, o al menos aproximadamente 21 nucleótidos, o al menos aproximadamente 22 nucleótidos, o al menos aproximadamente 23 nucleótidos, o al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 25 nucleótidos, o al menos aproximadamente 26 nucleótidos, o al menos aproximadamente 27 nucleótidos, o al menos aproximadamente 28 nucleótidos, o al menos aproximadamente 29 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o al menos aproximadamente 31 nucleótidos, o al menos aproximadamente 32 nucleótidos, o al menos aproximadamente 33 nucleótidos, o al menos aproximadamente 34 nucleótidos, o al menos aproximadamente 35 nucleótidos, o al menos aproximadamente 40 nucleótidos, o al menos aproximadamente 45 nucleótidos, o al menos aproximadamente 50 nucleótidos, o al menos aproximadamente 60 nucleótidos, o aproximadamente 70 nucleótidos, o aproximadamente 80 nucleótidos, o aproximadamente 90 nucleótidos, o aproximadamente 100 nucleótidos.

En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender ARN. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender ADN. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender ADN y ARN. Una secuencia del cebador de anclaje puede estar comprendida completa o parcialmente de ADN o ARN. Una secuencia del cebador de anclaje puede ser aproximadamente 1 %, o aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 %, o aproximadamente 25 %, o aproximadamente 30 %, o aproximadamente 35 %, o aproximadamente 40 %, o aproximadamente 45 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 55 %, o aproximadamente 60 %, o aproximadamente 65 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de ARN. Una secuencia del cebador de anclaje puede ser aproximadamente 1 %, o aproximadamente 5 %, o aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 %, o aproximadamente 25 %, o aproximadamente 30 %, o aproximadamente 35 %, o aproximadamente 40 %, o aproximadamente 45 %, o aproximadamente 50 %, o aproximadamente 55 %, o aproximadamente 60 %, o aproximadamente 65 %, o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de ADN.

En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede ser bicatenaria. Una secuencia del cebador de anclaje puede ser monocatenaria. Una secuencia del cebador de anclaje puede ser parcialmente bicatenaria. Una secuencia del cebador de anclaje puede ser parcialmente monocatenaria.

En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender un sitio de endonucleasa de restricción. Los términos "sitio de endonucleasa de restricción" y "sitio de restricción" se usan indistintamente en el presente documento. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender al menos aproximadamente 1 sitio de restricción, o al menos aproximadamente 2 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 3 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 4 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 5 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 6 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 7 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 8 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 9 sitios de restricción, o al menos aproximadamente 10 sitios de restricción.

En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender un sitio de restricción EcoRI. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender un sitio de restricción MlyI. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender un sitio de restricción EcoRV. En algunos aspectos, una secuencia del cebador de anclaje puede comprender un sitio de restricción SbfI. Los sitios de restricción de endonucleasas incluyen, pero no se limitan a, sitios AclI, HindIII, SspI, MluCI, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, Bmri, BgIII, Afel, AluI, StuI, BspDI, ClaI, P1-SceI, NsiI, AseI, SmaI, CspCI, MfeI, Nb.BssSI, BssSai, BmgBI, PmlI, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, NdeI, CviAI, FatI, NlaIII, MspI, FspEI, XcmI, BstXI, PfiMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, TspMI, XmaI, SmaI, Nt.CviPII, LpnPI, Acil, SacII, BsrBI, HpaII, MspI, ScrFI, StyD4I, BsaJI, BstII, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, Nt.BbvCI, Nb.BbvCI, BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Esp3I, Hpy99I, MspAII, AbaSI, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, PaeR7I, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfiI, AflII, BpuEI,

5 SmlI, Aval, BsoBI, MbolI, BbsI, XmnI, Bsml, Nb.Bsml, EcoRI, HgaI, ZraI, AatII, Tth111I, PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, MlyI, P1eI, Nt.BstNBI, HinfI, EcoRV, Sau3AI, MboI, DpnII, DpnI, BsaBI, Tfil, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, Nb.BtsI, BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, SrfI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HhaI, HinPII, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, BmtI, NheI, Nt.BspQI, BspQI, SapI, B1pI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, BtsCI, FokI, HaeIII, FseI, Sfil, NarI, PfuTI, SfoI, KasI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, Avail, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, CviQI, RsaI, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BcoDI, BsmAI, ApaLI, BsgI, AclI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, TspRI, ApoI, ApoI-HF, NspI, BsrFai, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, BclI-HF, HpyCH4V, FspI, P1-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PstI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI o EaeI. Un sitio de restricción puede ser un sitio de restricción para las enzimas de restricción de corte oblicuo, también denominadas endonucleasa de restricción S de tipo II. Un ejemplo no limitante de una endonucleasa de restricción S de tipo II es la enzima MlyI.

15 Una secuencia del cebador de anclaje puede estar unida directa o indirectamente a un soporte sólido. Las uniones pueden estar mediadas no covalentemente, tales como por interacciones de biotina y avidina, o pueden ser enlaces covalentes, tales como una variedad de químicas de 'click'. Las uniones pueden incluir moléculas espaciadoras, tales como polietilenglicol (PEG) o trietilenglicol (TEG).

20 Una secuencia del cebador de anclaje puede comprender al menos aproximadamente 1, o al menos aproximadamente 2, o al menos aproximadamente 3, o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 7, o al menos aproximadamente 8, o al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10 moléculas abásicas del ácido nucleico. Los términos "molécula abásica del ácido nucleico" y "sitio abásico" se usan indistintamente en el presente documento. Una molécula abásica del ácido nucleico es una molécula del ácido nucleico que no tiene ni una base purina ni pirimidina. Un polinucleótido que comprende una molécula básica del ácido nucleico se puede escindir con ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII.

30 Una secuencia del cebador de anclaje puede comprender al menos aproximadamente 1, o al menos aproximadamente 2, o al menos aproximadamente 3, o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 7, o al menos aproximadamente 8, o al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10 moléculas del ácido nucleico desoxiuridina. Los términos "moléculas del ácido nucleico desoxiuridina" y "sitios de desoxiuridina" se usan indistintamente en el presente documento. Un sitio de desoxiuridina se puede transformar en uno abásico mediante tratamiento con uracil ADN glicosilasa, a continuación el sitio abásico resultante se puede escindir usando ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII.

40 Una secuencia del cebador de anclaje puede comprender al menos aproximadamente 1, o al menos aproximadamente 2, o al menos aproximadamente 3, o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 7, o al menos aproximadamente 8, o al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10 moléculas del ácido nucleico desoxiinosina. Los términos "molécula del ácido nucleico desoxiinosina" y "sitio de desoxiinosina" se usan indistintamente en el presente documento. Un sitio de desoxiinosina se puede escindir con endonucleasa V.

45 Una secuencia del cebador de anclaje puede comprender una secuencia del ácido nucleico diana que es complementaria a un ARN guía. La secuencia del ácido nucleico diana se puede escindir entonces por Cas9 y el ARN guía complementario.

50 En algunos aspectos, los cebadores de anclaje se diseñan para permitir la retirada específica de cualquier secuencia y/o fragmento de ácido nucleico adicional que se haya extendido desde el extremo de la secuencia del cebador de anclaje. La retirada específica de la secuencia y/o fragmento de ácido nucleico adicional se puede llevar a cabo de varias formas. En un ejemplo no limitante, un sitio de restricción ubicado entre la secuencia/fragmento de ácido nucleico adicional y la secuencia del cebador de anclaje se puede escindir con la endonucleasa de restricción apropiada. En algunos aspectos, el sitio de restricción situado entre la secuencia/fragmento de ácido nucleico adicional y la secuencia del cebador de anclaje se puede formar hibridándose un oligonucleótido complementario inverso corto con la secuencia del cebador de anclaje. En otro ejemplo no limitante, un sitio abásico situado entre la secuencia/fragmento de ácido nucleico adicional y la secuencia del cebador de anclaje se puede escindir usando la ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII. En otro ejemplo no limitante, un sitio de desoxiuridina situado entre la secuencia/fragmento de ácido nucleico adicional y la secuencia del cebador de anclaje puede convertirse en primer lugar en un sitio abásico usando la uracil ADN glicosilasa, y el sitio abásico se escinde a continuación usando la ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII. En otro ejemplo no limitante, un sitio de desoxiinosina entre la secuencia/fragmento de ácido nucleico adicional y la secuencia del cebador de anclaje se puede escindir usando endonucleasa V.

65 La Figura 2 muestra cuatro secuencias de cebadores de anclaje a modo de ejemplo de la presente divulgación unidas a soportes sólidos. En estos ejemplos no limitantes, los soportes sólidos son perlas.

La Figura 2A muestra una secuencia del cebador de anclaje para su uso en el método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación. La secuencia del cebador de anclaje comprende un polinucleótido de baja complejidad que está unido a la perla de soporte sólido en su extremo 5'. Por lo tanto, el extremo 3' se expone para la ligación y extensión de fragmentos de ácido nucleico. Con la secuencia del cebador de anclaje se hibrida un oligonucleótido complementario inverso corto. El oligonucleótido complementario inverso corto se hibrida de forma que la estructura bicatenaria resultante comprenda un sitio de restricción MlyI, mostrado en letra roja.

La Figura 2B muestra una secuencia del cebador de anclaje para su uso en un método de síntesis geométrica por extensión en 5' de la presente divulgación. La secuencia del cebador de anclaje comprende un polinucleótido de baja complejidad que está unido a la perla de soporte sólido en su extremo 3'. Por lo tanto, el extremo 5' se expone para la ligación y extensión de fragmentos de ácido nucleico. Con la secuencia del cebador de anclaje se hibrida un oligonucleótido complementario inverso corto. El oligonucleótido complementario inverso corto se hibrida de forma que la estructura bicatenaria resultante comprenda un sitio de restricción MlyI (mostrado en letra roja), un sitio de restricción EcoRI (mostrado en letra verde), un sitio EcoRV (mostrado en letra azul) y SbfI (mostrado en letra violeta).

La Figura 2C muestra una secuencia del cebador de anclaje para su uso en un método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación. La secuencia del cebador de anclaje comprende un polinucleótido de baja complejidad que está unido a la perla de soporte sólido en su extremo 5'. Por lo tanto, el extremo 3' se expone para la ligación y extensión de fragmentos de ácido nucleico. La secuencia del cebador de anclaje comprende un sitio de desoxiuridina (U) en el extremo 3' (mostrado en rojo) que se puede transformar en un sitio abásico mediante la actividad de uracil ADN glicosilasa. El sitio abásico resultante sitio se puede cortar entonces usando la ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII.

La Figura 2D muestra una secuencia del cebador de anclaje para su uso en un método de síntesis geométrica por extensión en 5' de la presente divulgación. La secuencia del cebador de anclaje comprende un polinucleótido de baja complejidad que está unido a la perla de soporte sólido en su extremo 3'. Por lo tanto, el extremo 5' se expone para la ligación y extensión de fragmentos de ácido nucleico. La secuencia del cebador de anclaje comprende una combinación de desoxiadenosina (A) y desoxiinosina (I) en el extremo 5' (mostrado en letra roja) que se puede escindir por endonucleasa V.

Los cebadores de anclaje como se describen en el presente documento se pueden usar en cualquier método de la presente divulgación, como se describe en el presente documento.

Soportes sólidos

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden soportes sólidos. Los soportes sólidos pueden incluir, pero no se limitan a, perlas microscópicas magnéticas o perlas microscópicas no magnéticas. Las perlas pueden comprender poliacrilamida, poliestireno, agarosa reticulada, u otros materiales similares. Los soportes sólidos pueden incluir, pero no se limitan a, superficies de plástico o vidrio, tales como las superficies de pocillos de placas multipocillo. En algunos aspectos, los soportes sólidos se pueden tratar para potenciar las propiedades de unión del ácido nucleico o permitir actividades enzimáticas específicas. En algunos aspectos, los soportes sólidos se pueden tratar para prevenir la unión no específica o no deseada.

En algunos aspectos, un soporte sólido de la presente divulgación puede comprender una pluralidad de cámaras. Las cámaras se pueden disponer en una rejilla. Por ejemplo, un soporte sólido de la presente divulgación puede ser una microplaca de 6, 12, 24, 48, 96, 384 o 1536 pocillos. Las cámaras pueden contener una matriz de perlas con cebadores de anclaje unidos.

En algunos aspectos, un soporte sólido de la presente divulgación se puede conectar a un sistema microfluídico para el suministro de reactivos.

Los soportes sólidos como se describe en el presente documento se pueden usar en cualquier método de la presente divulgación, como se describe en el presente documento.

Conjuntos superpuestos de fragmentos de ácido nucleico

La presente divulgación proporciona una composición que comprende un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos. Un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos puede comprender una pluralidad de fragmentos de ácido nucleico. Cada fragmento de ácido nucleico en la pluralidad de fragmentos de ácido nucleico puede comprender al menos aproximadamente 2, o al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 10, o al menos aproximadamente 20, o al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30, o al menos aproximadamente 35, o al menos aproximadamente 40, o al menos aproximadamente 45, o al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 55, o al menos aproximadamente 60, o al menos aproximadamente 65, o al menos aproximadamente 70, o al menos aproximadamente 75, o al menos aproximadamente 80, o al menos aproximadamente 85, o al menos aproximadamente 90, o al menos

aproximadamente 95, o al menos aproximadamente 100, o al menos aproximadamente 105, o al menos aproximadamente 110, o al menos aproximadamente 115, o al menos aproximadamente 120, o al menos aproximadamente 125, o al menos aproximadamente 130, o al menos aproximadamente 135, o al menos aproximadamente 140, o al menos aproximadamente 145, o al menos aproximadamente 150 nucleótidos. En algunos aspectos, cada fragmento de ácido nucleico en la pluralidad de fragmentos de ácido nucleico puede comprender al menos aproximadamente 96 nucleótidos.

En un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos, un primer fragmento de ácido nucleico puede comprender una primera región que es complementario a un segundo fragmento de ácido nucleico, el segundo fragmento de ácido nucleico puede comprender una primera región que es complementaria a al primer fragmento de ácido nucleico y una segunda región que es complementario a un tercer fragmento de ácido nucleico, el tercer fragmento de ácido nucleico puede comprender una primera región que es complementaria al segundo fragmento de ácido nucleico y una segunda región que es complementaria a un cuarto fragmento de ácido nucleico, etc. Las regiones de un fragmento de ácido nucleico que son complementarias a otro fragmento de ácido nucleico en un conjunto se pueden denominar las regiones superpuestas. Las regiones superpuestas pueden comprender al menos aproximadamente 1 nucleótido, o al menos aproximadamente 2 nucleótidos, o al menos aproximadamente 3 nucleótidos, o al menos aproximadamente 4 nucleótidos, o al menos aproximadamente 5 nucleótidos, o al menos aproximadamente 6 nucleótidos, o al menos aproximadamente 7 nucleótidos, o al menos aproximadamente 8 nucleótidos, o al menos aproximadamente 9 nucleótidos, o al menos aproximadamente 10 nucleótidos, o al menos aproximadamente 11 nucleótidos, o al menos aproximadamente 12 nucleótidos, o al menos aproximadamente 13 nucleótidos, o al menos aproximadamente 14 nucleótidos, o al menos aproximadamente 15 nucleótidos, o al menos aproximadamente 16 nucleótidos, o al menos aproximadamente 17 nucleótidos, o al menos aproximadamente 18 nucleótidos, o al menos aproximadamente 19 nucleótidos, o al menos aproximadamente 20 nucleótidos, o al menos aproximadamente 21 nucleótidos, o al menos aproximadamente 22 nucleótidos, o al menos aproximadamente 23 nucleótidos, o al menos aproximadamente 24 nucleótidos, o al menos aproximadamente 25 nucleótidos, o al menos aproximadamente 26 nucleótidos, o al menos aproximadamente 27 nucleótidos, o al menos aproximadamente 28 nucleótidos, o al menos aproximadamente 29 nucleótidos, o al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o al menos aproximadamente 31 nucleótidos, o al menos aproximadamente 32 nucleótidos, o al menos aproximadamente 33 nucleótidos, o al menos aproximadamente 34 nucleótidos, o al menos aproximadamente 35 nucleótidos, o al menos aproximadamente 40 nucleótidos, o al menos aproximadamente 45 nucleótidos, o al menos aproximadamente 50 nucleótidos, o al menos aproximadamente 60 nucleótidos. En algunos aspectos, las regiones superpuestas pueden comprender 24 nucleótidos.

Las regiones de un fragmento de ácido nucleico que no son complementarias a otro fragmento de ácido nucleico pueden comprender al menos aproximadamente 30 nucleótidos, o al menos aproximadamente 31 nucleótido, o al menos aproximadamente 32 nucleótidos, o al menos aproximadamente 33 nucleótidos, o al menos aproximadamente 34 nucleótidos, o al menos aproximadamente 35 nucleótidos, o al menos aproximadamente 36 nucleótidos, o al menos aproximadamente 37 nucleótidos, o al menos aproximadamente 38 nucleótidos, o al menos aproximadamente 39 nucleótidos, o al menos aproximadamente 40 nucleótidos, o al menos aproximadamente 41 nucleótidos, o al menos aproximadamente 42 nucleótidos, o al menos aproximadamente 43 nucleótidos, o al menos aproximadamente 44 nucleótidos, o al menos aproximadamente 45 nucleótidos, o al menos aproximadamente 46 nucleótidos, o al menos aproximadamente 47 nucleótidos, o al menos aproximadamente 48 nucleótidos, o al menos aproximadamente 49 nucleótidos, o al menos aproximadamente 50 nucleótidos, o al menos aproximadamente 51 nucleótidos, o al menos aproximadamente 52 nucleótidos, o al menos aproximadamente 53 nucleótidos, o al menos aproximadamente 54 nucleótidos, o al menos aproximadamente 55 nucleótidos, o al menos aproximadamente 56 nucleótidos, o al menos aproximadamente 57 nucleótidos, o al menos aproximadamente 58 nucleótidos, o al menos aproximadamente 59 nucleótidos, o al menos aproximadamente 60 nucleótidos, o al menos aproximadamente 61 nucleótidos, o al menos aproximadamente 62 nucleótidos, o al menos aproximadamente 63 nucleótidos, o al menos aproximadamente 64 nucleótidos, o al menos aproximadamente 65 nucleótidos, o al menos aproximadamente 70 nucleótidos, o al menos aproximadamente 75 nucleótidos, o al menos aproximadamente 80 nucleótidos, o al menos aproximadamente 85 nucleótidos.

Los conjuntos superpuestos de fragmentos de ácido nucleico como se describen en el presente documento se pueden usar en cualquier método de la presente divulgación, como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, en un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos, al menos uno de los fragmentos de ácido nucleico puede ser un fragmento de ácido nucleico quimérico que comprende un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 3' (ARN) de ribosa. En algunos aspectos, al menos uno de los fragmentos de ácido nucleico puede ser un fragmento de ácido nucleico quimérico que comprende un extremo 3' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 5' (ARN) de ribosa. En algunos aspectos, al menos uno de los fragmentos de ácido nucleico puede ser un fragmento de ácido nucleico quimérico que comprende un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 3' (ADN) de desoxirribosa. En algunos aspectos, al menos uno de los fragmentos de ácido nucleico puede ser un fragmento de ácido nucleico quimérico que comprende un extremo 5' (ARN) de ribosa y un extremo 3' (ARN) de ribosa.

En algunos aspectos, los fragmentos de ácido nucleico en un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos pueden ser un N-mero de la presente divulgación.

Métodos de la presente divulgación

5

Síntesis geométrica

La presente divulgación proporciona métodos de síntesis geométrica de secuencias del ácido nucleico. Los métodos de síntesis geométrica incluyen un método geométrico en 3' (también denominado el método de síntesis geométrica por extensión en 3'), un método geométrico en 5' (también denominado el método de síntesis geométrica por extensión en 5'), un método geométrico de transposasa, un método de co-síntesis de 3', 5' (también denominado la co-síntesis geométrica por extensión en 5' y extensión en 3'), un método de síntesis paralela por extensión en 3' y un método de síntesis paralela por extensión en 5'.

Las Figuras 1 y 15 representan una visión general esquemática de los métodos de síntesis geométrica de la presente divulgación. En primer lugar, se proporciona una pluralidad de N-meros como se ha descrito anteriormente. En las Figuras 1 y 15, se proporcionan 8 especies diferentes de N-meros. También se proporcionan cebadores de anclaje que están unidos a soportes sólidos. En ligación 1, un único N-mero se liga sobre los cebadores de anclaje que están unidos al soporte sólido para crear un complejo de N-mero-cebador de anclaje. En ligación 2, se liga un segundo N-mero al extremo opuesto del primer N-mero para extender el primer N-mero y crean un complejo de N-mero₂-cebador de anclaje. Después de la ligación, un subconjunto de los complejos de N-mero₂-cebador de anclaje se designa como muestras diana. Los N-meros ligados se escinden de los cebadores de anclaje en las muestras donantes, liberando un fragmento de ácido nucleico que comprende dos N-meros ligados. En ligación 3, los fragmentos de ácido nucleico liberados se ligan entonces sobre el extremo expuesto de un N-mero en una muestra diana para extender la muestra diana complejo de N-mero-cebador de anclaje, formando así un complejo de N-mero-cebador de anclaje. Después de la ligación, un subconjunto de los complejos de N-mero-cebador de anclaje se designa como muestras donantes y el otro subconjunto de los complejos de N-mero-cebador de anclaje se designa como muestras diana. Los N-meros ligados se escinden de los cebadores de anclaje en las muestras donantes, liberando un fragmento de ácido nucleico que comprende cuatro N-meros ligados. En ligación 4, los fragmentos de ácido nucleico liberados entonces se ligan entonces sobre el extremo expuesto de un N-mero en una muestra diana para extender la muestra diana complejo de N-mero₄-cebador de anclaje, formando así un complejo de N-mero₈-cebador de anclaje. Después de la ligación, un subconjunto de los complejos de N-mero₈-cebador de anclaje se designa como muestras donantes y el otro subconjunto de los complejos de N-mero₈-cebador de anclaje se designa como muestras diana. Los N-meros ligados se escinden de los cebadores de anclaje en las muestras donantes, liberando un fragmento de ácido nucleico que comprende ocho N-meros ligados. En ligación 5, los fragmentos de ácido nucleico liberado se ligan entonces sobre el extremo expuesto de un N-mero en una muestra diana para extender la muestra diana el complejo de N-mero₈-cebador de anclaje, formando así un complejo de N-mero₁₆-cebador de anclaje.

40

Síntesis geométrica por extensión en 3'

La presente divulgación proporciona un método de síntesis geométrica por extensión en 3'. Un método de síntesis geométrica por extensión en 3' es una síntesis geométrica como se describe en las Figuras 1 y 15, en donde los cebadores de anclaje están unidos al soporte sólido mediante sus extremos 5', dejando así sus extremos 3' expuestos para la ligación y extensión.

45

En un método de síntesis geométrica por extensión en 3', se proporciona una pluralidad de N-meros como se ha descrito anteriormente, en donde los N-meros comprenden un grupo -PO₄ en el extremo 3' y el extremo 5'. También se proporcionan cebadores de anclaje que están unidos a un soporte sólido mediante su extremo 5'. Por lo tanto, los extremos 3' de los cebadores de anclaje, que comprenden un grupo -OH, se exponen para la ligación y extensión.

50

Un método de síntesis geométrica por extensión en 3' puede comprender las etapas:

55

- 1) ligar una especie de N-meros en el extremo 3' expuesto de los cebadores de anclaje;
- 2) opcionalmente, incubar los productos de ligación de la etapa (1) con una endonucleasa 3' a 5' específica, tal como polimerasa de Klenow, para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos. Una polimerasa, tal como una polimerasa de Klenow, no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo -PO₄ en 3';
- 3) incubar las muestras de la etapa (2) con una fosfatasa, tal como fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) o fosfatasa alcalina de camarón (SAP) para retirar el -PO₄ en 3' de los N-meros ligados;
- 4) ligar un segundo N-mero al extremo 3' de un N-mero ligado en la etapa 1;

65

5) opcionalmente, incubar los productos de ligación de la etapa (4) con una endonucleasa 3' a 5' específica, tal como polimerasa de Klenow, para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos;

6) designar un subconjunto de las muestras de la etapa (5) como muestras donantes y un subconjunto de muestras de la etapa (5) como muestras diana;

7) incubar las muestras diana de la etapa (6) con una fosfatasa, tal como fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) o fosfatasa alcalina de camarón (SAP), para retirar los grupos -PO₄ en 3';

8) liberar los N-meros ligados en las muestras donantes del cebador de anclaje al que están ligados, en donde la liberación preserva los grupos -PO₄ tanto de 3' como de 5';

9) ligar los N-meros ligados liberados de la etapa (8) a las muestras diana de la etapa (7);

10) repetir las etapas 5-9 con los productos de ligación de la etapa (9).

En un método de síntesis geométrica por extensión en 3', la etapa (10) se puede repetir hasta que se haya sintetizado el fragmento de ácido nucleico deseado. A continuación, el fragmento de ácido nucleico deseado se puede liberar del cebador de anclaje al que está ligado.

Las Figuras 3-8 muestran una visión general esquemática de una síntesis a modo de ejemplo de una molécula del ácido nucleico usando un método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación. El ácido nucleico a sintetizar comprende un fragmento de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*. La Figura 3A muestra toda la región codificante de GFP de *A. victoria*. El fragmento a sintetizar se representa en letra de color y comprende la secuencia:

TACACACGAATAAAAAGATAACAAAGATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG
 AGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGCGATGTTAATGGGCAAAAATTCTCT
 GTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAAGCTTACCCTTAAATTT
 ATTTGCACTACTGGGAAGCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCAC (SEQ ID NO:

1).

El fragmento a sintetizar se subdivide en ocho N-meros, en donde cada N-mero comprende 21 nucleótidos. Los N-meros se representan en letras de diferentes colores en la Figura 3A. El resto de la secuencia de GFP de *A. victoria* también puede subdividirse en N-meros que comprenden 21 nucleótidos.

A efectos de explicar este ejemplo, a cada N-mero se le asigna un código identificador como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de N-meros y códigos identificadores

Código identificador	Secuencia	SEQ ID NO
1aA1	TACACACGAATAAAAAGATAAC	2
1aA2	ACTTTTCACTGGAGTTGTCCC	3
1aA3	CGATGTTAATGGGCAAAAATT	4
1aA4	AGGTGATGCAACATACGAAA	5
1bA1	AAAGATGAGTAAAGGAGAAGA	6
1bA2	AATTCTTGTGAATTAGATGG	7
1bA3	CTCTGTCAGTGGAGAGGGTGA	8
1bA4	ACTTACCCTTAAATTTATTTG	9

El método de síntesis sigue proporcionando una pluralidad de cebadores de anclaje unidos a soportes sólidos, como se muestra en la Figura 4. En este ejemplo, los soportes sólidos son perlas y los cebadores de anclaje comprenden la secuencia GATATCGAGTCTTAAG (SEQ ID NO: 91).

Los N-meros 1aA1, 1aA2, 1aA3 y 1aA4 se proveen a continuación de un grupo -PO₄ en 3' y 5'. Los N-meros 1aA1, 1aA2, 1aA3 y 1aA4 se ligan a continuación en el extremo 3' expuesto de los cebadores de anclaje como se muestra

en la Figura 4. Tras la ligación, se añade una polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', tal como polimerasa de Klenow, para retirar cualquiera de los cebadores de anclaje no ligados. A continuación, se añade fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) para retirar el grupo -PO₄ en 3' en cada uno de los fragmentos ligados. Esta etapa de síntesis da como resultado fragmentos de ácido nucleico que comprenden el cebador de anclaje y uno de los N-meros 1aA1, 1aA2, 1aA3 y 1aA4 unido a una perla sólida, como se muestra en el panel derecho de la Figura 4.

El método de síntesis sigue en la Figura 5. Los N-meros 1bA1, 1bA2, 1bA3 y 1bA4 se proveen a continuación de un grupo -PO₄ en 3' y 5'. El extremo 5' del N-mero 1bA1 se liga en el extremo 3' del N-mero 1aA1, el extremo 5' del N-mero 1bA2 se liga en el extremo 3' del N-mero 1aA2, el extremo 5' del N-mero 1bA3 se liga en el extremo 3' del N-mero 1aA3, el extremo 5' del N-mero 1bA4 se liga en el extremo 3' del N-mero 1aA4, como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 5. Tras la ligación, se añade una polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', tal como polimerasa de Klenow, para retirar cualquiera de los cebadores de anclaje no ligados. Para el fragmento 1aA1-1bA1 ligado y el fragmento 1aA3-1bA3 ligado, se añade a continuación fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) para retirar el grupo -PO₄ en 3' en cada uno de los fragmentos ligados. Esta etapa de síntesis da lugar a los siguientes fragmentos de ácido nucleico ligados a un cebador de anclaje que está unido a una perla sólida: un fragmento 1aA1-1bA1 (fragmento 1A1), un fragmento 1aA2-1bA2 (fragmento 1A2), un fragmento 1aA3-1bA3 (fragmento 1A3) y un fragmento 1aA4-1bA4 (fragmento 1A4). El cebador de anclaje-fragmento 1aA1-1bA1 y el cebador de anclaje-fragmento 1aA3-1bA3 no tienen un grupo -PO₄ en 3'. El cebador de anclaje-fragmento 1aA2-1bA2 y el cebador de anclaje-fragmento 1aA4-1bA4 tienen un grupo -PO₄ en 3'. Los productos de esta etapa de síntesis se muestran en el panel derecho de la Figura 5.

El método de síntesis sigue en la Figura 6. La muestra 1A2 y las muestras 1A4 van a ser muestras donantes en la siguiente ronda de síntesis. Por lo tanto, un oligonucleótido complementario inverso corto se mezcla con la muestra 1A2 y la muestra 1A4. El oligonucleótido complementario inverso corto comprende la secuencia CTATAGCTCAGAATTC (SEQ ID NO: 96) y es complementario al cebador de anclaje. El oligonucleótido complementario inverso corto se hibrida con el cebador de anclaje de forma que se forma un sitio de endonucleasa de restricción bicatenario. En este ejemplo, el sitio de endonucleasa de restricción es un sitio de endonucleasa de restricción MlyI. Después de la hibridación del oligonucleótido complementario inverso corto, la muestra 1A2 y la muestra 1A4 se incuban con la endonucleasa de restricción MlyI, que escinde en el sitio de restricción MlyI, dando como resultado la liberación del fragmento 1A2 y el fragmento 1A4.

El método de síntesis sigue en la Figura 7. El extremo 5' del fragmento 1A2 se liga en el extremo 3' del fragmento 1A1 que está unido al soporte sólido para formar un fragmento 1A1-1A2 y el extremo 5' del fragmento 1A4 se liga en el extremo 3' del fragmento 1A3 que está unido al soporte sólido para formar un fragmento 1A3-1A4. Tras la ligación, se añade una polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', tal como polimerasa de Klenow, para retirar cualquiera de los cebadores de anclaje no ligados. Para el fragmento 1A1-1A2 ligado, a continuación se añade fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIP) para retirar el grupo -PO₄ en 3' en el fragmento. A continuación, el fragmento 1A3-1A4 se incubaba con el oligonucleótido complementario inverso corto, que se hibrida con el cebador de anclaje para formar un sitio de endonucleasa de restricción bicatenario. En este ejemplo, el sitio es un sitio MlyI. Después de la hibridación del oligonucleótido complementario inverso corto, la muestra se incubaba con la endonucleasa de restricción MlyI, que escinde el sitio de restricción MlyI para liberar el fragmento 1A3-1A4, como se muestra en el panel inferior de la Figura 7.

El método de síntesis sigue en la Figura 8. El extremo 5' del fragmento 1A3-1A4 se liga al extremo 3' del fragmento 1A1-1A2 que está unido al soporte sólido para formar un fragmento 1A1-1A2-1A3-1A4. Tras la ligación, se añade una polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', tal como polimerasa de Klenow, para retirar cualquiera de los cebadores de anclaje no ligados. Para el fragmento 1A1-1A2-1A3-1A4, a continuación se incubaba con oligonucleótido complementario inverso corto, que se hibrida con el cebador de anclaje para formar un sitio de endonucleasa de restricción bicatenario. En este ejemplo, el sitio es un sitio MlyI. Después de la hibridación del oligonucleótido complementario inverso corto, la muestra se incubaba con la endonucleasa de restricción MlyI, que escinde el sitio de restricción MlyI para liberar el fragmento 1A1-1A2-1A3-1A4 (el fragmento que se iba a sintetizar), como se muestra en el panel inferior de la Figura 8.

Método de síntesis paralela por extensión en 3'

La presente divulgación proporciona un método de síntesis paralela por extensión en 3'. En un método de síntesis paralela por extensión en 3', se realiza una pluralidad de reacciones de síntesis geométrica por extensión en 3', como se ha descrito anteriormente, usando N-meros y/o cebadores de anclaje que comprenden un bloque reversible en el grupo -OH en 3'. La pluralidad de reacciones se puede realizar sobre un soporte sólido que comprende cámaras que están dispuestas en una rejilla bidimensional. En las diferentes etapas de la síntesis, se deja que ciertas reacciones avancen al retirar el bloque reversible en el grupo -OH en 3' en una cámara particular dentro de la rejilla, lo que permite así que el usuario controle qué N-mero se incorpora en cada etapa.

En un ejemplo no limitante, una rejilla bidimensional de reacciones puede empezar con la unión general de cebadores de anclaje bloqueado reversiblemente en 3'. Si se requiere la incorporación de un N-mero específico, tal como ACG, entonces se desbloquea la región de la rejilla bidimensional donde se requiere el N-mero con la

secuencia ACG, lo que permite que el N-mero de ACG se incorpore solo allí. Dicho proceso ocurre para los 64 3-meros posibles bloqueados adecuadamente en el extremo 3'. Cualquier combinación de secuencias posible se puede manifestar en cualquier ubicación específica en la rejilla.

5 En un ejemplo no limitante, el bloque reversible se puede retirar por exposición a la luz. Por lo tanto, una rejilla bidimensional de reacciones puede empezar con la unión general de cebadores de anclaje bloqueados reversiblemente en 3'. Si se requiere la incorporación de un N-mero específico, tal como ACG, entonces se expone a la luz la región de la rejilla bidimensional donde se requiere el N-mero con la secuencia ACG, retirando el bloque reversible en esa región, lo que permite que el N-mero de ACG se incorpore solo allí.

10

Método de síntesis geométrica por extensión en 5'

La presente divulgación proporciona un método de síntesis geométrica por extensión en 5'. Un método de síntesis geométrica por extensión en 5' es una síntesis geométrica como se describe en las Figuras 1 y 15, en donde los cebadores de anclaje están unidos al soporte sólido mediante sus extremos 3', dejando así sus extremos 5' expuestos para la ligación y extensión. En algunos aspectos del método de síntesis geométrica por extensión en 5', se proporciona una pluralidad de N-meros como se ha descrito anteriormente, en donde los N-meros comprenden un grupo -OH en el extremo 3' y el extremo 5'. También se proporcionan cebadores de anclaje que están unidos a un soporte sólido mediante su extremo 3'. Por lo tanto, los extremos 5' de los cebadores de anclaje, que comprenden un grupo -PO₄, se exponen para la ligación y extensión.

20

Un método de síntesis geométrica por extensión en 5' puede comprender las etapas:

- 1) ligar una especie de N-meros en el extremo 5' expuesto de los cebadores de anclaje;
- 25 2) opcionalmente, incubar los productos de ligación de la etapa (1) con una exonucleasa 5' a 3' específica, tal como exonucleasa lambda, para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos. La exonucleasa lambda no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo -OH en 5'.
- 30 3) opcionalmente, incubar las muestras de la etapa (2) con polinucleótido cinasa (PNK), para producir un grupo -PO₄ en cada extremo 5';
- 4) ligar un segundo N-mero al extremo 5' de un N-mero ligado en la etapa 1;
- 35 5) opcionalmente, incubar los productos de ligación de la etapa (4) con una exonucleasa 5' a 3' específica, tal como exonucleasa lambda, para retirar los cebadores de anclaje no ligados de los soportes sólidos;
- 6) designar un subconjunto de las muestras de la etapa (5) como muestras donantes y un subconjunto de muestras de la etapa (5) como muestras diana;
- 40 7) opcionalmente, incubar las muestras diana de la etapa (6) con polinucleótido cinasa (PNK), para producir un grupo -PO₄ en cada extremo 5';
- 8) liberar los N-meros ligados en las muestras donantes del cebador de anclaje al que están ligados, en donde la liberación preserva los grupos -OH tanto de 3' como de 5';
- 45 9) ligar los N-meros ligados liberados de la etapa (8) a las muestras diana de la etapa (7);
- 50 10) repetir las etapas 5-9 con los productos de ligación de la etapa (9).

50

En un método de síntesis geométrica por extensión en 5', la etapa (10) se puede repetir hasta que se haya sintetizado el fragmento de ácido nucleico deseado. A continuación, el fragmento de ácido nucleico deseado se puede liberar del cebador de anclaje al que está ligado.

55 En algunos aspectos del método de síntesis geométrica por extensión en 5' de la presente divulgación, se proporciona una pluralidad de N-meros como se ha descrito anteriormente, en donde los N-meros comprenden un grupo -OH en el extremo 3' y un -PO₄ en el extremo 5'. El grupo -PO₄ se pueden unir al grupo protector.

Método de síntesis paralela por extensión en 5'

60

La presente divulgación proporciona un método de síntesis paralela por extensión en 5'. En un método de síntesis paralela por extensión en 5', se realiza una pluralidad de reacciones de síntesis geométrica por extensión en 5', como se ha descrito anteriormente, usando N-meros y/o cebadores de anclaje que comprenden un bloque reversible en el grupo -PO₄ en 5'. La pluralidad de reacciones se puede realizar sobre un soporte sólido que comprende cámaras que están dispuestas en una rejilla bidimensional. En las diferentes etapas de la síntesis, se

65

deja que ciertas reacciones avancen al retirar el bloque reversible en el grupo -PO₄ en 5' en una cámara particular dentro de la rejilla, lo que permite así que el usuario controle qué N-mero se incorpora en cada etapa.

5 En un ejemplo no limitante, una rejilla bidimensional de reacciones puede empezar con la unión general de cebadores de anclaje bloqueado reversiblemente en 5'. Si se requiere la incorporación de un N-mero específico, tal como ACG, entonces se desbloquea la región de la rejilla bidimensional donde se requiere el N-mero con la secuencia ACG, lo que permite que el N-mero de ACG se incorpore solo allí. Dicho proceso ocurre para los 64 3-meros posibles bloqueados adecuadamente en el extremo 5'. Cualquier combinación de secuencias posible se puede manifestar en cualquier ubicación específica en la rejilla.

10 En un ejemplo no limitante, el bloque reversible se puede retirar por exposición a la luz. Por lo tanto, una rejilla bidimensional de reacciones puede empezar con la unión general de cebadores de anclaje bloqueados reversiblemente en 5'. Si se requiere la incorporación de un N-mero específico, tal como ACG, entonces se expone a la luz la región de la rejilla bidimensional donde se requiere el N-mero con la secuencia ACG, retirando el bloque reversible en esa región, lo que permite que el N-mero de ACG se incorpore solo allí.

Método geométrico de transposasa

20 La presente divulgación proporciona un método geométrico de transposasa. Un método geométrico de transposasa comprende el uso de un conjunto de plásmidos con repeticiones en los extremos izquierdo y derecho orientadas de forma inversa de un transposón de corte con precisión, tal como piggyBac, como se muestra en el panel inferior de la Figura 12. Cada plásmido en el conjunto lleva un N-mero diferente (por ejemplo, un 3-, 4- y 5-mero) que está flanqueado por repeticiones de los extremos izquierdo y derecho orientadas de forma inversa. Un N-mero flanqueado por repeticiones de los extremos izquierdo y derecho orientadas de forma inversa se denomina en el presente documento un N-mero transponible.

25 En un método geométrico de transposasa, cada N-mero transponible requerido se corta de su plásmido troncal por una endonucleasa de restricción (RE) apropiada o digestión similar junto con las repeticiones de los extremos izquierdo y derecho orientadas de forma inversa flanqueantes, como se muestra en el panel superior de la de Figura 12. Entonces se proporciona una pluralidad de cebadores de anclaje unidos a un soporte sólido.

30 En algunos aspectos, un método geométrico de transposasa puede comprender:

- 35 1) ligar un N-mero transponible a cebador de anclaje unido a un soporte sólido;
- 2) opcionalmente, purificar la reacción de la etapa (1);
- 3) ligar un segundo N-mero transponible a un N-mero transponible ligado en la etapa (1);
- 40 4) opcionalmente, purificar la reacción de la etapa (3);
- 5) incubar los productos de etapa (4) con una transposasa para cortar la secuencia intercalada entre las dos secuencias de N-meros ligadas;
- 45 6) designar un subconjunto de las muestras de la etapa (5) como muestras donantes y un subconjunto de muestras de la etapa (5) como muestras diana;
- 7) liberar los N-meros en las muestras donantes del cebador de anclaje al que están ligados;
- 50 8) ligar los N-meros ligados liberados de la etapa (8) a las muestras diana de la etapa (7);
- 9) purificar la reacción de la etapa (8);
- 55 10) repetir las etapas 5-9 con los productos de etapa (9).

La Figura 13 muestra una visión general esquemática de un método geométrico de transposasa de la presente divulgación.

60 En un método geométrico de transposasa, la etapa (10) se puede repetir hasta que se haya sintetizado el fragmento de ácido nucleico deseado. A continuación, el fragmento de ácido nucleico deseado se puede liberar del cebador de anclaje al que está ligado.

Método de co-síntesis de 3', 5'

65 La presente divulgación proporciona un método de co-síntesis de 3', 5'. Un método de co-síntesis de 3', 5' comprende el uso de un conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos, como se ha descrito

anteriormente. En panel inferior de la Figura 10 muestra un conjunto de seis fragmentos de ácido nucleico superpuestos.

El panel superior de la Figura 11 muestra un conjunto de 16 fragmentos de ácido nucleico superpuestos. Un método de co-síntesis de 3', 5' puede comprender:

- 1) hibridar juntos el conjunto solapado de fragmentos de ácido nucleico;
- 2) realizar reacciones de extensión de polimerasa para extender el extremo 3' de cada uno de los fragmentos de ácido nucleico hibridados;
- 3) ligar juntos los fragmentos extendidos de la etapa (2).

La Figura 11 muestra una visión general esquemática de un método de co-síntesis de 3', 5'.

En un método de co-síntesis de 3', 5', el conjunto de fragmentos de ácido nucleico superpuestos se puede generar usando cualquier método de la presente divulgación, que incluye, pero no se limitan a, un método geométrico de transposasa de la presente divulgación, un método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación, un método de síntesis geométrica por extensión en 5' o cualquier combinación de las mismas.

Método de síntesis lineal modular en 5'

La presente divulgación también proporciona un método de síntesis lineal modular en 5'. La Figura 18 representa una visión general esquemática del método de síntesis lineal modular en 5' de la presente divulgación. En un método de síntesis lineal modular en 5', se une en primer lugar un cebador de anclaje a un soporte sólido, ya sea directa o indirectamente, mediante el extremo 3' del cebador de anclaje. Después de que se haya unido el cebador de anclaje, la siguiente etapa del método de síntesis modular en 5' es ligar el extremo 3' de un N-mero de la presente divulgación al extremo 5' del cebador de anclaje unido al soporte sólido. Esta etapa se muestra en el panel A de la Figura 18, donde un N-mero marcado "A" se liga en un cebador de anclaje denominado un "anclaje T7". Tras la primera etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 5' del N-mero ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 3' de un segundo N-mero al extremo 5' del primer N-mero ligado. Esta etapa se muestra en el panel B de la Figura 18, donde un N-mero marcado "B" se liga en el N-mero "A". Tras esta segunda etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 5' del N-mero recién ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 3' de un tercer N-mero al extremo 5' del segundo N-mero ligado. Esta etapa se muestra en el panel C de la Figura 18, donde un N-mero marcado "C" se liga en el N-mero "B". Tras esta tercera etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 5' del N-mero recién ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 3' de un cuarto N-mero al extremo 5' del tercer N-mero ligado. Esta etapa se muestra en el panel D de la Figura 18, donde un N-mero marcado "D" se liga en el N-mero "C".

En algunos aspectos, las etapas de ligación del método de síntesis lineal modular en 5' se pueden repetir tantas veces como sea necesario usando los N-meros apropiados para generar cualquier secuencia de nucleótidos de longitud completa.

Método de síntesis lineal modular en 3'

La presente divulgación también proporciona un método de síntesis lineal modular en 3'. En un método de síntesis lineal modular en 3', se une en primer lugar un cebador de anclaje a un soporte sólido, ya sea directa o indirectamente, mediante el extremo 5' del cebador de anclaje. Después de que se haya unido el cebador de anclaje, la siguiente etapa del método de síntesis modular en 3' es ligar el extremo 5' de un N-mero de la presente divulgación al extremo 3' del cebador de anclaje unido al soporte sólido. Tras la primera etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 3' del N-mero ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 5' de un segundo N-mero al extremo 3' del primer N-mero ligado. Tras esta segunda etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 3' del N-mero recién ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 5' de un tercer N-mero al extremo 3' del segundo N-mero ligado. Tras esta tercera etapa de ligación, se puede retirar cualquier grupo protector opcional en el extremo 3' del N-mero recién ligado antes de la siguiente etapa de ligación.

El método sigue con la ligación del extremo 5' de un cuarto N-mero al extremo 3' del tercer N-mero ligado.

En algunos aspectos, las etapas de ligación del método de síntesis lineal modular en 3' se pueden repetir tantas veces como sea necesario usando los N-meros apropiados para generar cualquier secuencia de nucleótidos de longitud completa.

Métodos generales

En todos los métodos de la presente divulgación, los N-meros y/o cebadores de anclaje pueden comprender un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 3' (ARN) de ribosa. Los N-meros y/o cebadores de anclaje que comprenden extremos 5' (ADN) de desoxirribosa y extremos 3' (ARN) de ribosa presentan elevadas eficiencias de ligación en comparación con la ligación de dos fragmentos a ambos extremos 5' y 3' (ADN) de desoxirribosa y a ambos extremos 5' y 3' (ARN) de ribosa.

En todos los métodos de la presente divulgación, tras cualquier reacción de ligación, cualquier N-mero ligado puede adenilarse en el extremo 5'. Los N-meros pueden adenilarse usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, tratar los N-meros con ARN ligasa Mth.

En todos los métodos de la presente divulgación, tras cualquier reacción de ligación, cualquier N-mero ligado puede fosforilarse en el extremo 5'. Los N-meros pueden fosforilarse usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, tratar los N-meros con T4 polinucleótido cinasa.

En todos los métodos de la presente divulgación, los N-meros no ligados y los cebadores de anclaje no unidos se pueden digerir y retirar usando una exonucleasa. En algunos aspectos de los métodos de extensión en 5' de la presente divulgación, se puede usar una exonucleasa 5' a 3' para digerir y retirar N-meros no anexados y los cebadores de anclaje no unidos. En algunos aspectos de los métodos de extensión en 3' de la presente divulgación, se puede usar una exonucleasa 3' a 5' para digerir y retirar N-meros no ligados.

En todos los métodos de la presente divulgación, antes de cualquier reacción de digestión con exonucleasa, los N-meros y/o los N-meros no unidos a digerir pueden ser desadenilados. La desadenilación se puede llevar a cabo usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, tratar los N-meros con desadenilasa en 5' de *S. cerevisiae*.

En todos los métodos de la presente divulgación, los grupos protectores ubicados en el extremo 5' o 3' de un N-mero se pueden retirar usando métodos conocidos en la técnica. Estos métodos pueden incluir, pero no se limitan a, etapas de lavado con ácido y base.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis geométrica por extensión en 5'

Lo siguiente es un ejemplo que usa el método de síntesis geométrica por extensión en 5' de la presente divulgación para generar una secuencia molde de un aptámero de ARN denominado "espinaca baby". Espinaca baby potencia la fluorescencia de la 3,5-difluoro-4-hidroxi-bencilidenoimidazolona (DFHBI), un compuesto que imita el núcleo fluorescente de proteínas fluorescentes, como proteínas verdes fluorescentes (GFP).

En primer lugar, se establecieron dos reacciones distintas en las que un cebador de anclaje biotinilado en 3' que comprende ADN monocatenario se unió a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina.

En la primera reacción, denominada en el presente documento la "reacción AB", el cebador de anclaje comprendía un grupo fosfato en 5' seguido por una secuencia promotora T7 (CTATAGTGAGTCGTATTA, SEQ ID NO: 10), seguido por una secuencia de ADN espaciador, seguido por un espaciador de tetraetilenglicol (TEG) unido covalentemente a un resto de biotina. Este cebador de anclaje, denominado en el presente documento el "cebador de anclaje AB" comprendía la secuencia CTATAGTGAGTCGTATTACCGTAGTGCTGCGTCGAGTGT (SEQ ID: 11).

En la segunda reacción, denominada en el presente documento la "reacción CD", el cebador de anclaje comprendía un grupo fosfato en 5' unido a un nucleótido de desoxiuracilo, seguido por una secuencia de ADN espaciador, seguido por un espaciador de tetraetilenglicol (TEG) unido covalentemente a un resto de biotina. Este cebador de anclaje, denominado en el presente documento el "cebador de anclaje CD", comprendía la secuencia dUCCATTGTGAGTCTTATTTCCGTAGTGCTGCGTCGAGTGT (SEQ ID NO: 12).

En la reacción AB y la reacción CD, cada cebador de anclaje biotinilado se unió a las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Mione Dynal, Invitrogen) incubando 500 pmoles del cebador de anclaje por cada 1 mg de perlas usado, de forma que la concentración de cebador de anclaje en la reacción fue 1 µM y la concentración de perlas fue 2 mg/ml. El tampón de incubación comprendía solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,01 % de Tween20. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agitaron con vórtex.

Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces con 0,7 ml de tampón de lavado que comprendía (HEPES 20 mM, 0,01 % de Tween20, pH 8,0). A continuación, las perlas se suspendieron en el tampón de lavado a una concentración de 10 mg/ml y se guardaron a 4 °C hasta uso posterior.

- 5 Para codificar el aptámero completo de espinaca baby, se diseñaron y generaron cuatro N-meros quiméricos modificados. Cada N-mero comprendía un grupo DMT-PO₄ en 5' unido a un desoxirribonucleótido inicial (dN) y un ribonucleótido (rN) en el extremo 3'. El grupo DMT-PO₄ proporciona un bloqueo a las ligaciones posteriores después de que un único oligonucleótido se ligue a la cadena en crecimiento.
- 10 En este ejemplo, la secuencia de espinaca baby se dividió en tres 12-meros (fragmentos A, B y C) y un 15-mero (fragmento D). Las secuencias de los fragmentos A-D se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de N-meros

Nombre de fragmento	Secuencia	SEQ ID NO
Fragmento A	CCGTCCTTCACrC	13
Fragmento B	GAACTACTGGArC	14
Fragmento C	CTCAACAGTAGrC	15
Fragmento D	GGAGCTCACACTCTrA	16

15 En la primera etapa de síntesis geométrica, el fragmento A se ligó en el extremo 5' del cebador de anclaje AB unido a las perlas magnéticas y el fragmento C se ligó sobre el extremo 5' del cebador de anclaje CD unido a las perlas magnéticas, como se muestra en panel A de la Figura 16. Para las reacciones de ligación, se incubaron 2,5 µM de cebador de anclaje/perlas con 0,5 µM del fragmento (A o C) respectivo en presencia de 1,5 unidades/µl de ARN ligasa T4 1 en un tampón que comprendía HEPES 20 mM pH 8,0, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 10 mM, 0,1 mg/ml de BSA y 0,01 % de Tween 20. Las reacciones de ligación se incubaron a 21 °C durante 30 minutos. Después de la reacción de ligación, las perlas se lavaron usando un separador magnético lavando tres veces con 0,7 ml de un tampón que comprendía HEPES 20 mM pH 8,0 y 0,01 % de Tween 20, seguido por un lavado con 0,7 ml de 0,01 % de Tween 20.

25 Tras la primera ligación, el grupo PO₄ en 5' de cada fragmento A y fragmento C ligados se desprotegeron mediante un lavado con ácido/base para permitir una segunda ronda de ligación. Para desproteger el grupo PO₄ en 5', las perlas se lavaron una vez con el tampón de ligación, a continuación una vez con 0,01 % de Tween 20, y a continuación finalmente una vez brevemente con tampón ácido de 3 % de ácido dicloroacético (DCA) en H₂O. Después de estos lavados, las perlas se incubaron a continuación en tampón ácido de 3 % de ácido dicloroacético (DCA) en H₂O durante 30 minutos con agitación constante. A continuación, las perlas entonces se lavaron con tampón básico que comprendía 1:9 de carbonato:bicarbonato (-pH 9,0) y 0,01 % de Tween 20 y a continuación se incubaron con el mismo tampón durante 10 minutos con agitación constante. Finalmente, las perlas se lavaron una vez con 0,01 % de Tween 20 y a continuación se lavaron dos veces con el tampón de ligación.

35 Después de la desprotección, se realizó una segunda ronda de ligación en donde el fragmento B se ligó al extremo 5' del fragmento A ligado (unido al cebador de anclaje AB y perlas) para formar un fragmento AB ligado y el fragmento D se ligó al extremo 5' del fragmento C ligado (conectado al cebador de anclaje CD y perlas) para formar un fragmento CD ligado, como se muestra en el panel B de Figura 16. Las condiciones de la reacción de ligación fueron las mismas que para la primera ligación descrita anteriormente.

40 Tras la ligación, el grupo PO₄ en 5' sobre el fragmento AB ligado se desprotegió usando el mismo lavado con ácido/base descrito anteriormente, como se muestra en el panel C de la Figura 16. Además, las perlas CD, ahora unidas al cebador de anclaje CD ligado al fragmento CD, se trataron con uracil-N-deglicosilasa (UNG) para retirar la base de uracilo, dejando un nucleótido abásico. A continuación, las perlas se trataron con Endo IV o APE-1, que son endonucleasas capaces de cortar en un sitio abásico monocatenario, liberando así el fragmento CD del cebador de anclaje y perlas, como se muestra en el panel C de la Figura 16.

45 El fragmento CD no conectado se ligó entonces sobre extremo 5' del fragmento AB (unido al cebador de anclaje AB y perlas) usando las condiciones de ligación descritas anteriormente para generar la secuencia molde completa para espinaca baby, como se muestra en el panel D de la Figura 16.

50 El molde de espinaca baby se amplificó a continuación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un cebador complementario a la secuencia promotora T7 en el cebador de anclaje AB y un cebador complementario a una porción de fragmento D, como se muestra en el panel D de la Figura 16.

La Figura 17 muestra el análisis en gel de poliacrilamida de la síntesis geométrica por extensión en 5' de la secuencia molde de espinaca baby descrita anteriormente. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 3.

5 Tabla 3. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	PCR de control positivo, construcción de espinaca baby de longitud completa
3	Cebadores de anclaje AB (perlas AB)
4	Perlas AB después de la ligación del fragmento A sobre el cebador de anclaje (1.ª ligación)
5	Perlas AB después de la ligación del fragmento B sobre el fragmento A (2.ª ligación)
6	Cebadores de anclaje CD (perlas CD)
7	Perlas CD después de la ligación del fragmento C sobre el cebador de anclaje y fragmento D sobre el fragmento C (1.ª y 2.ª ligaciones)
8	Muestra de carril 7 después del tratamiento con UDG y escisión con Endo IV
9	Muestra de carril 8 después de la ligación de fragmento CD liberado sobre el fragmento AB (3.ª ligación)
10	Amplificación por PCR del carril 9
11	Muestra de carril 7 después del tratamiento con UDG y escisión con APE-1
12	Muestra de carril 11 después de la ligación del fragmento CD liberado sobre el fragmento AB (3.ª ligación)
13	Amplificación por PCR del carril 12

Ejemplo 2: Síntesis lineal modular en 5'

10 Lo siguiente es un ejemplo que usa el método de síntesis lineal modular en 5' de la presente divulgación para generar secuencia molde de un aptámero de ARN denominado "espinaca baby". Espinaca baby potencia la fluorescencia de DFHBI. En este ejemplo, las reacciones de ligación y de desprotección se realizan en las mismas condiciones que se describen en el Ejemplo 1 de la presente memoria descriptiva.

15 En primer lugar, se unieron un cebador de anclaje biotinilado que comprendía una secuencia promotora T7 y un grupo PO₄ en 5' grupo a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, usando el método de unión de cebadores de anclaje descrito en el Ejemplo 1.

20 Para este ejemplo, se usaron los cuatro mismos fragmentos de espinaca baby (fragmentos A-D) como se describe en el Ejemplo 1 como N-meros en la reacción de síntesis lineal modular. En una primera reacción de ligación, el fragmento A se ligó al extremo 5' del cebador de anclaje unido a las perlas magnéticas, como se muestra en el panel A de la Figura 18. A continuación, se desprotegió el grupo PO₄ en 5' del fragmento A ligado.

25 Tras la desprotección, se realizó una segunda reacción de ligación en donde el fragmento B se ligó al extremo 5' del fragmento A ligado (enlazado al cebador de anclaje y perlas) para formar un fragmento AB ligado, como se muestra en el panel B de la Figura 18. A continuación, se desprotegió el grupo PO₄ en 5' del fragmento AB ligado.

30 Tras la desprotección, se realizó una tercera reacción de ligación en donde el fragmento C se ligó al extremo 5' del fragmento AB ligado (enlazado al cebador de anclaje y perlas) para formar un fragmento ABC ligado, como se muestra en el panel C de la Figura 18. A continuación, se desprotegió el grupo PO₄ en 5' del fragmento ABC ligado.

35 Tras la desprotección, se realizó una cuarta reacción de ligación en donde el fragmento D se ligó al extremo 5' del fragmento ABC ligado (enlazado al cebador de anclaje y perlas) para formar un fragmento ABCD ligado, como se muestra en el panel D de la Figura 18. El fragmento ABCD ligado corresponde a la secuencia molde de espinaca baby de longitud completa. A continuación, se desprotegió el grupo PO₄ en 5' del fragmento ABCD ligado.

40 Tras la desprotección, se realizó una quinta reacción de ligación en donde un oligonucleótido adaptador en 5' se ligó al extremo 5' del fragmento ABCD ligado, como se muestra en el panel E de la Figura 18. El oligonucleótido adaptador en 5' comprendía un grupo DMT-PO₄ en 5'.

Tras la quinta reacción de ligación, el fragmento ABCD ligado se amplificó por PCR usando un cebador complementario a la secuencia promotora T7 ubicada en el cebador de anclaje y un cebador complementario al

oligonucleótido adaptador en 5', como se muestra en el panel F de la Figura 18. El cebador complementario al oligonucleótido adaptador en 5' también comprendía un resto TEG y de biotina en 5'. La reacción de PCR se purificó usando perlas de estreptavidina.

5 Tras la purificación por PCR, el molde de espinaca baby de longitud completa amplificado se usó para sintetizar el aptámero de ARN de espinaca baby usando ARN polimerasa I. El aptámero sintetizado y un aptámero de control (sintetizado a partir de un oligonucleótido de ADN sintetizado usando los presentes métodos en la técnica) se incubaron a continuación con DFHBI 20 μ M. Como se muestra en la Figura 19, tanto el aptámero sintetizado como el aptámero de control potenciaron la fluorescencia de DFHBI, mostrando que los métodos de la presente divulgación se pueden usar para sintetizar eficazmente moléculas de polinucleótidos que se pueden usar en una variedad de aplicaciones diferentes.

10 La Figura 20 muestra un análisis en gel de poliacrilamida del método de síntesis lineal modular en 5' de la secuencia molde de espinaca baby descrita anteriormente. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 4.

15 Tabla 4. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Construcción de espinaca baby de control de longitud completa
4	Perlas después de la ligación del fragmento A al cebador de anclaje (1.ª ligación)
5	Perlas después de la ligación del fragmento B al fragmento A (2.ª ligación)
6	Perlas después de la ligación del fragmento C al fragmento AB (3.ª ligación)
7	Perlas después de la ligación del fragmento D al fragmento ABC (4.ª ligación)
8	Perlas después de la ligación del oligonucleótido adaptador en 5' al fragmento ABCD (5ª ligación)
9	Amplificación por PCR del carril 8
10	Depuración de biotina del carril 9
11	Transcripción del carril 10 para crear el aptámero de ARN de espinaca baby

20 **Ejemplo 3: Síntesis lineal modular en 5' con adenilación en 5'**

Lo siguiente es un ejemplo que usa el método de síntesis lineal modular en 5' de la presente divulgación en combinación con adenilación en 5' para generar una secuencia molde de un aptámero de ARN denominado "espinaca baby".

25 En primer lugar, se unieron un cebador de anclaje biotinilado que comprendía un grupo PO₄ en 5', una secuencia espaciadora de ADN y un espaciador TEG enlazado covalentemente a un resto de biotina a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, usando el método de unión de cebadores de anclaje descrito en el Ejemplo 1. Este cebador de anclaje comprendía la secuencia CTATAGTGAGTCGTATTACCGTAGTGCTGCGTCGAGTGT (SEQ ID: 11).

30 Para codificar el aptámero completo de espinaca baby, se diseñaron y generaron cuatro N-meros quiméricos modificados. Cada N-mero comprendía un grupo PO₄ en 5' unido a un desoxirribonucleótido inicial (dN) y un ribonucleótido (rN) en el extremo 3'.

35 En este ejemplo, la secuencia de espinaca baby se dividió en tres 12-meros (fragmentos A, B y C) y un 15-mero (fragmento D). Las secuencias de los fragmentos A-D se muestran en la Tabla 2.

40 La reacción de síntesis lineal modular en 5' usando estos fragmentos se realizó como se describe en el Ejemplo 2, con la excepción de que después de cada etapa de ligación, no se realizó etapa desprotección. En su lugar, antes de la primera etapa de ligación y después de cada etapa de ligación a partir de aquí, la muestra se trató con ARN ligasa Mth, que adenila el extremo 5' de los fragmentos ligados unidos a las perlas mediante su grupo PO₄ en 5'. A continuación, el extremo 5' adenilado se cebó para la siguiente ligación.

45 La Figura 21 muestra el análisis en gel de poliacrilamida del método de síntesis lineal modular con adenilación en 5' de la secuencia molde de espinaca baby descrita anteriormente. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Después de la 4.ª etapa de ligación (fragmento ABCD unido a perlas)

Este ejemplo muestra que los métodos de la presente divulgación se pueden controlar por adenilación en 5' de los extremos 5' en crecimiento.

5

Ejemplo 4: Síntesis lineal modular en 5' con fosforilación en 5'

Lo siguiente es un ejemplo que usa el método de síntesis lineal modular en 5' de la presente divulgación en combinación con fosforilación en 5' para generar una secuencia molde de un aptámero de ARN denominado "espinaca baby".

10

En primer lugar, se unieron un cebador de anclaje biotilado que comprendía un grupo PO₄ en 5', una secuencia espaciadora de ADN y un espaciador TEG enlazado covalentemente a un resto de biotina a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, usando el método de unión de cebadores de anclaje descrito en el Ejemplo 1. Este cebador de anclaje comprendía la secuencia TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGATGTTTTTTTTTTT (SEQ ID: 17).

15

Para codificar el aptámero completo de espinaca baby, se diseñaron y generaron cuatro N-meros quiméricos modificados. Cada N-mero comprendía un desoxirribonucleótido inicial (dN) en 5' y un ribonucleótido (rN) en el extremo 3'.

20

En este ejemplo, la secuencia de espinaca baby se dividió en tres 12-meros (fragmentos A, B y C) y un 15-mero (fragmento D). Las secuencias de los fragmentos A-D se muestran en la Tabla 2.

La reacción de síntesis lineal modular en 5' usando estos fragmentos se realizó como se describe en el Ejemplo 2, con la excepción de que después de cada etapa de ligación, no se realizó etapa desprotección. En su lugar, después de cada etapa de ligación, la muestra se trató con polinucleótido cinasa T4 para fosforilar el extremo 5' en crecimiento, facilitando así la siguiente etapa de ligación.

25

La Figura 22 muestra el análisis en gel de poliacrilamida del método de síntesis lineal modular en 5' con fosforilación en 5' de la secuencia molde de espinaca baby descrita anteriormente. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 6.

30

Tabla 6. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Después de 1.ª etapa de ligación (fragmento A unido a perlas)
4	Después de 2.ª etapa de ligación (fragmento AB unido a perlas)
5	Después de 3.ª etapa de ligación (fragmento ABC unido a perlas)
6	Después de 4.ª etapa de ligación (fragmento ABCD unido a perlas)

35

Este ejemplo muestra que los métodos de la presente divulgación se pueden controlar por fosforilación en 5' de los extremos 5' en crecimiento.

Ejemplo 5: Síntesis geométrica por extensión en 3'

40

Lo siguiente es un ejemplo que usa el método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación para generar un oligonucleótido sintético.

En primer lugar, se unió un cebador de anclaje biotilado que comprendía un grupo de resto de biotina en 5' unido a un espaciador TEG, seguido por secuencia espaciadora de ADN, seguido por un ribonucleótido terminal en 3' (rN) a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, usando el método de unión de cebadores de anclaje en el Ejemplo 1. Este cebador de anclaje comprendía la secuencia TTTTTTTTTTGTAGTGCTGCGTGCTCTTCrA (SEQ ID: 18).

45

Para las reacciones de ligación posteriores, se usó un fragmento de oligonucleótido, denominado en el presente documento "sustrato A". El sustrato A comprendía un grupo PO₄ en 5', seguido por una secuencia de ribonucleótidos, seguido por un grupo PO₄ en 3'. La secuencia de ribonucleótidos del sustrato A comprendía la secuencia: rGrGrUrGrArArGrGrArCrGrG (SEQ ID NO: 19).

En una primera reacción de ligación, el sustrato A se unió sobre el extremo 3' del cebador de anclaje ligado en las perlas magnéticas usando las condiciones de reacción de ligación descritas en el Ejemplo 1. En una segunda reacción de ligación posterior, otro sustrato A se ligó al extremo 3' del sustrato A ligado a los cebadores de anclaje, creando un "fragmento AA". Después de esta reacción de ligación, las perlas magnéticas se dividieron en dos conjuntos: conjunto 1 y conjunto 2.

El conjunto 1 se incubó con un oligonucleótido de ADN monocatenario denominado en el presente documento un oligonucleótido complementario inverso corto, que comprende la secuencia de nucleótidos: GAAGAGCACGCAGCACTAC (SEQ ID NO: 20). El oligonucleótido complementario inverso corto comprende una secuencia de forma que el oligonucleótido complementario inverso corto se hibrida con el cebador de anclaje para crear una molécula de ADN bicatenario que es escindible por la endonucleasa de corte Nt.BspQI. Después de la incubación e hibridación del oligonucleótido complementario inverso corto, la muestra del conjunto 1 se trató con Nt.BspQI, liberando así los fragmentos A ligados y los fragmentos AA ligados.

El conjunto 2 se incubó con fosfatasa alcalina de camarón (rSAP) para retirar los grupos PO₄ en 3' para preparar la ligación posterior.

Los fragmentos A ligados y AA ligados liberados se incubaron a continuación con el conjunto 2 tratado con rSAP y la reacción de ligación se realizó para ligar los fragmentos liberados con los fragmentos AA unidos a los cebadores de anclaje. El resultado es la síntesis de fragmentos AAAA completos, así como varios productos de menor peso molecular.

La Figura 23 muestra el análisis en gel de poliacrilamida del método de síntesis geométrica por extensión en 3' descrito anteriormente. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Después de 1.ª etapa de ligación (fragmento A unido a perlas)
4	Después de 2.ª etapa de ligación (fragmento AA unido a perlas)
5	Después de la incubación con oligonucleótido complementario inverso corto y Nt.BspQI (liberado)
6	Después de 3.ª etapa de ligación

Este ejemplo demuestra que el método de síntesis geométrica por extensión en 3' de la presente divulgación se puede usar para sintetizar oligonucleótidos

Ejemplo 6: Ligación de N-meros quiméricos y retirada de contaminantes no ligados

Lo siguiente es un ejemplo que demuestra que una variedad de N-meros que comprenden quimeras ARN-ADN, así como N-meros que comprenden solo ARN, se pueden ligar a un cebador de anclaje de ADN fosforilado en 5', que se ha unido a perlas magnéticas en el extremo 3' del cebador de anclaje.

En primer lugar, se unió un cebador de anclaje biotinilado que comprendía un grupo PO₄ en 5', seguido por una secuencia espaciadora de ADN, seguido por un espaciador TEG unido a un resto de biotina a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina, usando el método de unión de cebadores de anclaje en el Ejemplo 1. Este cebador de anclaje comprendía la secuencia TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGATGTTTTTTTTTTT (SEQ ID: 17).

En este experimento, se probó un conjunto de seis N-meros diferentes. Las secuencias de los N-meros se muestran en la Tabla 8. Quimera 1, quimera 2 y quimera 3 comprendieron una combinación de desoxinucleótidos (sin prefijo) y ribonucleótidos (rC, rG, rA o rU).

Tabla 8. Secuencias de N-meros

N-mero	Secuencia	SEQ ID NO
Quimera 1	CCrG	-
Quimera 2	TCrC	-
Quimera 3	CCGTCCTTCACrC	21
ARN 12-mero	rGrArGrUrGrUrGrArGrCrUrC	22
ARN 6-mero	rCrArGrCrUrU	-
ARN 3-mero	rCrUrG	-

Se realizó una reacción de ligación separada para cada uno de los seis N-meros diferentes usando las de condiciones de reacción de ligación descritas en el Ejemplo 1 para ligar el extremo 3' de cada N-mero a el extremo 5' expuesto del cebador de anclaje unido a las perlas magnéticas. La Figura 24 muestra el análisis en gel de poliacrilamida de estas reacciones de ligación. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 9. La Figura 24 muestra que todos los N-meros probados se pueden ligar a los cebadores de anclaje unidos a las perlas magnéticas.

Tabla 9. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Cebador de anclaje + ligasa
4	Reacción de ligación a la quimera 1
5	Reacción de ligación a la quimera 2
6	Reacción de ligación a la quimera 3
7	Reacción de ligación al 12-mero de ARN
8	Reacción de ligación al 6-mero de ARN
9	Reacción de ligación al 3-mero de ARN

Para productos más limpios, podría ser ventajoso retirar los ácidos nucleicos no ligados después de cada reacción de ligación. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando exonucleasas 5' a 3' (en el caso de extensión en 5') o exonucleasas 3' a 5' (durante la extensión en 3'). Para este fin, XRN-1, una exonucleasa de *S. cerevisiae* que depende de la presencia de un grupo PO₄ en 5', se probó para determinar si la enzima podría retirar los ácidos nucleicos no ligados en las reacciones descritas anteriormente. XRN-1 es capaz de digerir tanto ARN como ADN y es capaz de digerir ácidos nucleicos monocatenarios.

Como el tratamiento con ligasa deja algunos extremos 5' adenilados, después de cada etapa de ligación, la muestra se trató con desadenilasa en 5' de *S. cerevisiae*, que retira la caperuza de adenilo y deja un monofosfato en los extremos 5', que los hace más susceptible a la digestión con XRN-1. Las muestras de los carriles 3-6 de la Figura 24 se trataron en primer lugar con 5' desadenilasa de *S. cerevisiae*, luego con XRN-1, y el resultado se analizó usando análisis en gel de poliacrilamida como se muestra en la Figura 25. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 10. Estos resultados demuestran que la digestión con exonucleasa se puede usar para enriquecer eficazmente los productos de ligación deseados en los métodos de la presente divulgación.

Tabla 10. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	Cebador de anclaje
3	Cebador de anclaje + ligasa después de la digestión con XRN-1
4	Reacción de ligación a la quimera 1 después de la digestión con XRN-1
5	Reacción de ligación a la quimera 2 después de la digestión con XRN-1
6	Reacción de ligación a la quimera 3 después de la digestión con XRN-1

Ejemplo 7: Ligación de ADN a nucleótidos terminales de ARN

Lo siguiente es un ejemplo que demuestra que las ligaciones ADN a ARN tienen una mayor eficiencia que las ligaciones de ADN a ADN cuando se usa T4 ARN ligasa I. Más específicamente, la combinación más eficiente es un ribonucleótido en 3' y un desoxirribonucleótido en 5', independientemente de si el ribonucleótido en 3' es parte de una molécula quimérica (una combinación de ADN y ARN) o una molécula de ARN.

En un primer conjunto de experimentos, se usaron cuatro N-meros diferentes para probar la eficiencia de ligación. La secuencia de los N-meros se muestran en la Tabla 11. El N-mero donante de PO₄ en 5' comprendía además un grupo PO₄ en 5' y un conector TEG en 3' unido a un resto de biotina. El N-mero de quimera adicional comprendía un resto de biotina en 5' unido a una desoxirribonucleótido inicial (T) y un 3' ribonucleótido terminal (rG).

Tabla 11. Secuencias de N-meros

N-mero	Secuencia	SEQ ID NO
N-mero donante de PO ₄ en 5'	TACACGACGCTCTCTGAAGACACTCGATCCCTACACGACGCCGT CCGTTCTACCTCTTT	23
N-mero de ADN	GACACATGAAAGCTTGAATTCACGGCATATGAGTCCATGG	24
N-mero de quimera	TTTTTTTTTCTCCGATCTGAGTCCAGCrG	25
N-mero de ARN	rGrUrUrCrArGrArGrUrUrCrUrArCrArGrUrCrCrGrArCrGrArUrC	26

En una reacción de ligación, el N-mero donante de PO₄ en 5' se ligó al N-mero de ADN. En una segunda reacción de ligación, el N-mero donante de PO₄ en 5' se ligó al N-mero de quimera. En una tercera reacción de ligación, el N-mero donante de PO₄ en 5' se ligó al N-mero de ARN. Los resultados de estas reacciones se analizaron usando análisis en gel de poliacrilamida como se muestra en la Figura 26. El contenido de cada carril del gel se describe en la Tabla 12.

Tabla 12. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	N-mero donante de PO ₄ en 5'
3	N-mero de ADN, N-mero de quimera y N-mero de ARN (sin ligación)
4	Ligación de N-mero donante de PO ₄ en 5' + N-mero de ADN
5	Ligación de N-mero donante de PO ₄ en 5' + N-mero de quimera
6	Ligación de N-mero donante de PO ₄ en 5' + N-mero de ARN

La Figura 26 muestra que donde existe un grupo OH en 3' en un ribonucleótido y un grupo PO₄ en 5' en un desoxinucleótido existe mucha mayor conversión en producto, que indica mayor eficiencia de ligación. Un ácido nucleico con ribonucleótido en 3', ya sea ARN puro o una quimera con un ribonucleótido terminal en 3', tiene mayor eficiencia de ligación.

En un segundo conjunto de experimentos, se usó un conjunto de 11 N-meros diferentes. Las secuencias de los 11 N-meros diferentes se muestran en la Tabla 13.

Los N-meros Fluor. Interna 5' PO₄ A, Fluor. Interna 5' PO₄ C, Fluor. Interna 5' PO₄ G y Fluor. Interna 5' PO₄ T comprendían un nucleótido interno marcado con fluoresceína (una timidina marcada con base; Fluor-T), un grupo PO₄ en 5' y un conector TEG en 3' unidos a un resto de biotina.

Los N-meros 5' Cy5 Desoxi C, 5' Cy5 Desoxi G y 5' Cy5 Desoxi T (denominados conjuntamente en el presente documento N-meros de 5' Cy5 Desoxi) comprendían a marca fluorescente 5' Cy5.

El N-mero 5' Cy5 Ribo A, El N-mero Cy5 Ribo C, El N-mero Cy5 Ribo G y El N-mero Cy5 Ribo T (denominados conjuntamente en el presente documento los N-meros 5' Cy5 Ribo) comprendían una marca fluorescente 5' Cy5 y un ribonucleótido en el extremo 3' (rA, rC, rG o rT).

Tabla 13. Secuencias de N-meros

N-mero	Secuencia	SEQ ID NO
N-mero Fluor. Interna 5' PO ₄ A	AAGTAGCGAACTACTGGACCCG-Fluor-T-CCTTCACC	27
N-mero Fluor. Interna 5' PO ₄ C	CAGTAGCGAACTACTGGACCCG-Fluor-T-CCTTCACC	28
N-mero Fluor. Interna 5' PO ₄ G	GAGTAGCGAACTACTGGACCCG-Fluor-T-CCTTCACC	29
N-mero Fluor. Interna 5' PO ₄ T	TAGTAGCGAACTACTGGACCCG-Fluor-T-CCTTCACC	30
N-mero 5' Cy5 Desoxi C	ACTAGTTACGGAGCTCAC	31
N-mero 5' Cy5 Desoxi G	TGAATGAAATGGTGAAGG	32
N-mero 5' Cy5 Desoxi T	CGCTTTAGGTTAAGACT	33
N-mero 5' Cy5 Ribo A	GGAGCTCACACTCTACTCArA	34
N-mero 5' Cy5 Ribo C	GGAGCTCACACTCTACTCArC	35
N-mero 5' Cy5 Ribo G	GGAGCTCACACTCTACTCArG	36
N-mero 5' Cy5 Ribo T	GGAGCTCACACTCTACTCArT	37

5 En primer lugar, se unieron los N-meros Fluor. Interna 5' PO₄ A, N-mero Fluor. Interna 5' PO₄ C, N-mero Fluor. Interna 5' PO₄ G y N-mero Fluor. Interna 5' PO₄ T para separar perlas magnéticas de estreptavidina usando el método de unión de perlas descrito en el Ejemplo 1. Esto dio 4 poblaciones de perlas diferentes.

10 La población de perlas unida a los N-meros Fluor. Interna 5' PO₄ C se incubó por separado con cada uno de los N-meros Cy5 Desoxi y los N-meros Cy5 Ribo y se realizaron reacciones de ligación posteriores. El rendimiento de ligación de cada reacción se monitorizó usando citometría de flujo. Como calibración, se determinaron en primer lugar niveles de fluorescencia relativa de Cy5 en un N-mero marcado frente a fluoresceína en otro N-mero a varias relaciones entre fluoresceína y Cy5.

15 La Figura 27 muestra que cuando la base del extremo 3' y la base del extremo 5' que están siendo ligadas son ambas ADN, el rendimiento de ligación (eficiencia) es significativamente inferior a cuando la base del extremo 3' es un ribonucleótido y las base en 5' es un desoxirribonucleótido.

20 Para probar el posible sesgo de secuencias (es decir, hay nucleótidos terminales preferidos que aumentan la eficiencia de ligación), cada una de las 4 poblaciones de perlas diferentes se incubó a continuación por separado con cada uno de los N-meros Cy5 Ribo y se realizó una reacción de ligación. Figura 28, hay poco o ningún sesgo entre los cuatro ribonucleótidos diferentes en términos de rendimiento de ligación (eficiencia), que indica de poco a ningún sesgo de en la ligación.

Ejemplo 8: Unión de cebadores de anclaje a un soporte sólido usando química de Click

25 Lo siguiente es un ejemplo que demuestra que oligonucleótidos, tales como los cebadores de anclaje, se puede unir a una perla usando química de click (véase, por ejemplo, Hao, J., Huang, L. L., Zhang, R., Wang, H. Z. & Xie, H. Y. A mild and reliable method to label enveloped virus with quantum dots by copper-free click chemistry. Anal Chem 84, 8364-8370, 2012) y usar en los métodos de síntesis de la presente divulgación.

En este ejemplo, se usó un cebador de anclaje que comprende un grupo PO₄ en 5', seguido por una secuencia espaciadora de ADN, seguido de un grupo dibencilciclooctino (DBCO) en 3'. La secuencia espaciadora de ADN comprendía la secuencia de nucleótidos:

5

CCATGGACTCATATGCCGTGAATTCAAGCTTTCATGTGTCTTCATAGTCCGTCGTG

TA (SEQ ID NO: 38).

El cebador de anclaje se unió en primer lugar mediante su extremo 3' a perlas magnéticas recubiertas de azida química de click. Después de la unión del cebador de anclaje, el extremo 3' de un N-mero de ARN (rArGrUrUrCrUrGrCrArGrUrCrUrGrCrArGrArArA, SEQ ID NO: 39) se ligó al extremo 5' expuesto del cebador de anclaje.

10

Para comparación, un cebador de anclaje que comprende un grupo PO₄ en 5', seguido de un ribonucleótido en el extremo 5' (rU), seguido de una secuencia espaciadora de ADN (CCATGGACTCATATGCCGTGAA, SEQ ID NO: X), seguido de un conector TEG unido a un resto de biotina, se unió a perlas recubiertas de estreptavidina y se ligó al mismo N-mero de ARN.

15

La Figura 29 muestra el análisis en gel de poliacrilamida de las dos reacciones de ligación descritas anteriormente. Contenidos de cada uno carril se describen en la Tabla 14.

20

Table 14. Descripciones de carriles

Carril n.º	Descripción
1	Marcador de 100 pb
2	N-mero de ARN
3	Cebador de anclaje biotinilado en perlas de estreptavidina
4	N-mero de ARN ligado a anclaje biotinilado en perlas
5	Cebador de anclaje de DBCO en perlas de azida
6	N-mero de ARN ligado a cebador de anclaje de DBCO en perlas

La Figura 29 muestra que tanto el cebador de anclaje unido por click como el cebador de anclaje unido por biotina son adecuados para la ligación del N-mero de ARN. Por lo tanto, tanto los cebadores de anclaje unidos por click como los cebadores de anclaje unidos por biotina se pueden usar en los métodos de la presente divulgación.

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Camena Bioscience Limited
 Fraser, Andrew G Stemple, Derek L Mankowska, Sylwia A

5

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA GEOMÉTRICA DE ÁCIDOS
 NUCLEICOS SIN MOLDE

<130> DNWR-003/001W0

10

<150> US 62/617,148
 <151> 2018-01-12

<160> 104

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 210
 <212> ADN
 <213> Aequorea victoria

20

<400> 1
 tacacacgaa taaaagataa caaagatgag taaaggagaa gaacttttca ctggagtgt 60
 25 cccaattcctt gttgaattag atggcgatgt taatgggcaa aaattctctg tcagtggaga 120
 ggggtgaaggat gatgcaacat acggaaaact tacccttaaa tttatttgca ctactgggaa 180
 30 gctacctggt ccatggccaa cacttgtcac 210

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> N-mero

40

<400> 2
 tacacacgaa taaaagataa c 21

45

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> N-mero

<400> 3
 acttttcact ggagtgtgcc c 21

55

<210> 4

ES 2 993 016 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> N-mero

<400> 4
 cgatgttaat gggcaaaaat t 21

10

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> N-mero

20 <400> 5
 aggtgatgca acatacggaa a 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> N-mero

30 <400> 6
 aaagatgagt aaaggagaag a 21

35 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> N-mero

<400> 7
 aattcttggt gaattagatg g 21

45 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> N-mero

55 <400> 8
 ctctgtcagt ggagagggtg a 21

ES 2 993 016 T3

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 10 <400> 9
 acttaccctt aaatttattt g 21

 <210> 10
 15 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia promotora T7

 <400> 10
 ctatagtgag tcgtatta 18

 25
 <210> 11
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador de anclaje

 <400> 11
 35 ctatagtgag tcgtattacc gtagtgctgc gtcgagtggt 39

 <210> 12
 <211> 41
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de anclaje
 45

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 50 <223> ribonucleótido

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(41)
 55 <223> desoxirribonucleótido

 <400> 12
 uccattgtga gtcttatttc cgtagtgctg cgtcagtggt c 41

<210> 13
 <211> 12
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 10

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(11)
 15 <223> desoxirribonucleótido

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 20 <223> ribonucleótido

 <400> 13
 ccgtccttca cc 12
 25

 <210> 14
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30

 <220>
 <223> N-mero

 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(11)
 <223> desoxirribonucleótido

 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> ribonucleótido

 45 <400> 14
 gaactactgg ac 12

 50 <210> 15
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> N-mero

 <220>

<221> característica_misc
 <222> (1)..(11)
 <223> desoxirribonucleótido

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> ribonucleótido

10 <400> 15
 ctcaacagta gc 12

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

20 <220>
 <223> N-mero

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(11)
 <223> desoxirribonucleótido

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> ribonucleótido

35 <400> 16
 ggagctcaca ctcta 15

40 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador de anclaje

50 <400> 17
 tggaattctc gggtgccaag gatgtttttt ttttt 35

55 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de anclaje

<220>

<221> característica_misc
 <222> (1)..(29)
 <223> desoxirribonucleótido

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (30)..(30)
 <223> ribonucleótido

10 <400> 18
 tttttttttt gtagtgctgc gtgctcttca 30

<210> 19
 15 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> N-mero

<400> 19
 ggugaaggac gg 12

25
 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido complementario inverso corto

<400> 20
 35 gaagagcacg cagcactac 19

<210> 21
 <211> 12
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> N-mero

45

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(11)
 50 <223> desoxirribonucleótido

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 55 <223> ribonucleótido

<400> 21
 ccgtccttca cc 12

ES 2 993 016 T3

5 <210> 22
 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 10
 <400> 22
 gagugugagc uc 12

 15 <210> 23
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> N-mero

 <400> 23
 25 tacacgacgc tctctgaaga cactcgatcc ctacacgacg ccgtccgttc tacctcttt 59

 <210> 24
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 35 <400> 24
 gacacatgaa agcttgaatt cacggcatat gagtccatgg 40

 <210> 25
 40 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> N-mero

 <220>
 <221> característica_misc
 50 <222> (1)..(29)
 <223> desoxirribonucleótido

 <220>
 <221> característica_misc
 55 <222> (30)..(30)
 <223> ribonucleótido

 <400> 25

tttttttttt cttccgatct gagtccagcg 30

 5 <210> 26
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> N-mero

 <400> 26
 guucagaguu cuacaguccg acgauc 26

 15 <210> 27
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> N-mero

 25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> base marcada con fluoresceína

 30 <400> 27
 aagtagcgaa ctactggacc cgtccttcac c 31

 35 <210> 28
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> N-mero

 <220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (23)..(23)
 <223> base marcada con fluoresceína

 <400> 28
 50 cagtagcgaa ctactggacc cgtccttcac c 31

 <210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

<220>
 <221> característica_misc
 5 <222> (23)..(23)
 <223> base marcada con fluoresceína

 <400> 29
 gagtagcgaa ctactggacc cgtccttcac c 31
 10

 <210> 30
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 20

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> base marcada con fluoresceína
 25
 <400> 30
 tagtagcgaa ctactggacc cgtccttcac c 31

 30 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> N-mero

 <400> 31
 actagttacg gagctcac 18
 40

 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 <400> 32
 tgaatgaaat ggtgaagg 18
 50

 <210> 33
 55 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> N-mero

 <400> 33
 5 cgctttaggt taagact 17

 <210> 34
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 15

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 20 <223> desoxirribonucleótido

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 25 <223> ribonucleótido

 <400> 34
 ggagctcaca ctctactcaa 20
 30
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> N-mero

 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> desoxirribonucleótido

 45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> ribonucleótido

 50 <400> 35
 ggagctcaca ctctactcac 20

 <210> 36
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 993 016 T3

<220>
 <223> N-mero

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> desoxirribonucleótido

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> ribonucleótido

15 <400> 36
 ggagctcaca ctctactcag 20

<210> 37
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> N-mero

<220>
 30 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> desoxirribonucleótido

<220>
 35 <221> característica_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> ribonucleótido

<400> 37
 40 ggagctcaca ctctactcat 20

<210> 38
 <211> 58
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de anclaje

50 <400> 38
 ccatggactc atatgccgtg aattcaagct ttcattgtgtc ttcattagtcc gtcgtgta 58

<210> 39
 55 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 993 016 T3

<220>
 <223> N-mero

 <400> 39
 5 aguucugcag ucugcagaaa 20

 <210> 40
 <211> 54
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de anclaje
 15
 <400> 40
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct cccttccttt ctctgagtct gtag 54

 20 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido complementario inverso corto

 <400> 41
 30 gggaaggaaa gagactcaga catc 24

 <210> 42
 <211> 52
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de anclaje
 40 <400> 42
 ctaagactc gatatccctg caggctctct ctctctctct ctctctctct ct 52

 <210> 43
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Oligonucleótido complementario inverso corto

 <400> 43
 gaattctgag ctataggac gtcc 24

 55
 <210> 44
 <211> 55
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de anclaje
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(54)
 10 <223> desoxirribonucleótido
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (55)..(55)
 15 <223> ribonucleótido
 <400> 44
 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctu 55
 20
 <210> 45
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador de anclaje
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> I
 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> n es a, c, g o t
 40 <400> 45
 anctctctct ctctctctcc tctctctctc tctctctctc tctctctct 47
 45 <210> 46
 <211> 922
 <212> ADN
 <213> Aequorea victoria
 <400> 46
 50 tacacacgaa taaaagataa caaagatgag taaaggagaa gaacttttca ctggagttgt 60
 cccaattctt gttgaattag atggcgatgt taatgggcaa aaattctctg tcagtggaga 120
 gggatgaagg gatgcaacat acggaaaact tacccttaaa tttatttgca ctactgggaa 180
 55 gctacctgtt ccatggccaa cacttgtcac tactttctct tatgggtgttc aatgcttttc 240
 aagataccca gatcatatga aacagcatga ctttttcaag agtgccatgc ccgaaggtta 300

ES 2 993 016 T3

	tgtacaggaa agaactatat ttacaaaaga tgacgggaac tacaagacac gtgctgaagt	360
	caagtttgaa ggtgataccc ttgttaatag aatcgagtta aaaggtattg attttaaaga	420
5	agatggaaac attcttggac acaaaatgga atacaactat aactcacata atgtatacat	480
	catggcagac aaaccaaaga atggaatcaa agttaacttc aaaattagac acaacattaa	540
10	agatggaaagc gttcaattag cagaccatta tcaacaaaat actccaattg gcgatggccc	600
	tgtcctttta ccagacaacc attacctgtc cacacaatct gccctttcca aagatcccaa	660
	cgaaaagaga gatcacatga tccttcttga gtttgaaca gctgctggga ttacacatgg	720
15	catggatgaa ctatacaaat aatgtccag acttccaatt gacactaaag tgtccgaaca	780
	attactaat tctcagggtt cctggttaaa ttcaggctga gactttattt atatattat	840
20	agattcatta aaattttatg aataatttat tgatgttatt aataggggct attttcttat	900
	taaataggct actggagtgt at	922
25	<210> 47 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> N-mero	
	<400> 47 tacacacgaa taaaagataa c	21
35		
	<210> 48 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> N-mero	
45	<400> 48 acttttact ggagttgtcc c	21
50	<210> 49 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> N-mero	
55	<400> 49 cgatgttaat gggcaaaaat t	21

ES 2 993 016 T3

5 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 10
 <400> 50
 aggtgatgca acatacggaa a 21

 15 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> N-mero

 <400> 51
 cactactggg aagctacctg t 21
 25

 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 35 <400> 52
 tactttctct tatggtgttc a 21

 40 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> N-mero

 <400> 53
 tcatatgaaa cagcatgact t 21

 50
 <210> 54
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> N-mero

ES 2 993 016 T3

<400> 54
aggttatgta caggaaagaa c 21

5 <210> 55
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> N-mero

<400> 55
gaactacaag acacgtgctg a 21

15

<210> 56
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> N-mero

25 <400> 56
ccttgtaaat agaatcgagt t 21

<210> 57
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> N-mero

<400> 57
agatggaaac attccttgac a 21

40

<210> 58
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> N-mero

<400> 58
50 ctcacataat gtatacatca t 21

<210> 59
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 993 016 T3

<223> N-mero
 <400> 59
 aatcaaagtt aacttcaaaa t 21
 5
 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N-mero
 15 <400> 60
 aagcgttcaa ttagcagacc a 21
 <210> 61
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> N-mero
 <400> 61
 tggcgatggc cctgtccttt t 21
 30
 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> N-mero
 <400> 62
 40 cacacaatct gccctttcca a 21
 <210> 63
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> N-mero
 50
 <400> 63
 tcacatgatc cttcttgagt t 21
 <210> 64
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 993 016 T3

<220>
 <223> N-mero
 5 <400> 64
 acatggcatg gatgaactat a 21

 <210> 65
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> N-mero

 <400> 65
 aattgacact aaagtgtccg a 21

 20
 <210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> N-mero

 <400> 66
 30 ttcctgggta aattcaggct g 21

 <210> 67
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 40
 <400> 67
 agattcatta aaattttatg a 21

 45 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> N-mero

 <400> 68
 taggggctat tttcttatta a 21
 55

 <210> 69
 <211> 21

ES 2 993 016 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> N-mero

 <400> 69
 aaagatgagt aaaggagaag a 21

 10
 <210> 70
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> N-mero

 <400> 70
 20 aattcttggt gaattagatg g 21

 <210> 71
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 30
 <400> 71
 ctctgtcagt ggagagggtg a 21

 35 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> N-mero

 <400> 72
 45 acttaccctt aaatttattt g 21

 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 <400> 73
 55 tccatggcca acacttgta c 21

ES 2 993 016 T3

<210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> N-mero

 <400> 74
 10 atgcttttca agataccag a 21

 <210> 75
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 20
 <400> 75
 tttcaagagt gccatgcccg a 21

 25 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> N-mero

 <400> 76
 35 tatattttac aaagatgacg g 21

 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 45 <400> 77
 agtcaagttt gaagtgata c 21

 <210> 78
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> N-mero

 <400> 78
 aaaaggtatt gattttaag a 21

ES 2 993 016 T3

5 <210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero
 10
 <400> 79
 caaaatggaa tacaactata a 21

 15 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> N-mero

 <400> 80
 ggcagacaaa ccaaagaatg g 21
 25

 <210> 81
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> N-mero

 35 <400> 81
 tagacacaac attaaagatg g 21

 40 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> N-mero

 <400> 82
 ttatcaacaa aatactccaa t 21

 50
 <210> 83
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> N-mero

ES 2 993 016 T3

<400> 83
accagacaac cattacctgt c 21

5 <210> 84
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> N-mero

<400> 84
agatcccaac gaaaagagag a 21

15

<210> 85
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> N-mero

25 <400> 85
tgtaacagct gctgggatta c 21

<210> 86
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> N-mero

<400> 86
caaataaatg tccagacttc c 21

40

<210> 87
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> N-mero

<400> 87
50 acaattacta aattctcagg g 21

<210> 88
<211> 21
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 993 016 T3

	<223> N-mero	
	<400> 88	
5	agactttatt tatatatatta t	21
	<210> 89	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N-mero	
15	<400> 89	
	ataatttatt gatgttatta a	21
	<210> 90	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> N-mero	
	<400> 90	
	ataggctact ggagtgat	19
30	<210> 91	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de anclaje	
	<400> 91	
40	gatatcgagt cttaag	16
	<210> 92	
	<211> 37	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Producto de ligación	
50	<400> 92	
	gatatcgagt cttaagtaca cacgaataaa agataac	37
	<210> 93	
55	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 993 016 T3

<220>
 <223> Producto de ligación

5 <400> 93
 gatatcgagt cttaagactt ttcactggag ttgtccc 37

10 <210> 94
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Producto de ligación

<400> 94
 gatatcgagt cttaagcgat gttaatgggc aaaaatt 37

20 <210> 95
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Producto de ligación

30 <400> 95
 gatatcgagt cttaagaggt gatgcaacat acggaaa 37

35 <210> 96
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido complementario inverso corto

<400> 96
 ctatagctca gaattc 16

45 <210> 97
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Producto de ligación liberado

<400> 97
 acttttctact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat gg 42

55 <210> 98
 <211> 41

ES 2 993 016 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Producto de ligación liberado	
	<400> 98	
	aggatgatgca acatacggaa aacttacct taaatttatt t	41
10	<210> 99	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Producto de ligación	
	<400> 99	
20	gatatcgagt ctttaagtaca cacgaataaa agataacaaa gatgagtaaa ggagaagaac	60
	ttttcactgg agttgtccca attcttgttg aattagatgg	100
25	<210> 100	
	<211> 99	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Producto de ligación	
	<400> 100	
35	gatatcgagt ctttaagcgat gttaatgggc aaaaattctc tgtcagtgga gagggatgaag	60
	gtgatgcaac atacggaaaa cttaccctta aatttattt	99
40	<210> 101	
	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Producto de ligación liberado	
	<400> 101	
	cgatgttaat gggcaaaaat tctctgtcag tggagagggt gaaggatg caacatacgg	60
50	aaaacttacc cttaaattta ttt	83
	<210> 102	
	<211> 153	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 993 016 T3

<223> Producto de ligación

<400> 102
 gatatcgagt ctttaagtaca cacgaataaa agataacaaa gatgagtaaa ggagaagaac 60
 5 ttttctactgg agttgtccca attcttggtg aattagatgg cgatgttaat gggcaaaaat 120
 tctctgtcag tggagagggt gaaggtgatg caa 153

10 <210> 103
 <211> 167
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Producto de ligación liberado

<400> 103
 20 tacacacgaa taaaagataa caaagatgag taaaggagaa gaacttttca ctggagtgt 60
 cccaattctt gttgaattag atggcgatgt taatgggcaa aaattctctg tcagtggaga 120
 gggatgaaggat gatgcaacat acggaaaact tacccttaaa tttattt 167
 25

<210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia espaciadora de ADN

35 <400> 104
 ccatggactc atatgccgtg aa 22

40

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- 5 a) poner en contacto al menos una primera pluralidad de soportes sólidos y al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 3' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una primera pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una primera pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato, en donde los cebadores de anclaje en la primera pluralidad de cebadores de anclaje comprenden al menos un desoxiuridina en el extremo 5';
- 10 b) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una primera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un primer cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, en donde la primera pluralidad de N-meros comprenden un grupo PO₄ en el extremo 5', en donde el grupo PO₄ está unido operativamente a un grupo protector;
- 15 c) retirar el grupo protector del menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido;
- d) poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una segunda pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo donante, en donde la segunda pluralidad de N-meros comprenden un grupo PO₄ en el extremo 5', en donde el grupo PO₄ está unido operativamente a un grupo protector;
- 20 e) poner en contacto al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos y al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje, en condiciones que permiten la unión de un extremo 3' de al menos un cebador de anclaje de la al menos una segunda pluralidad de cebadores de anclaje a al menos un soporte sólido de la al menos una segunda pluralidad de soportes sólidos para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato;
- 25 f) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato y al menos una tercera pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un segundo cebador de anclaje-sustrato para producir al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, en donde el tercer pluralidad de N-meros comprenden un grupo PO₄ en el extremo 5', en donde el grupo PO₄ está unido operativamente a un grupo protector;
- 30 g) retirar el grupo protector del menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido;
- h) poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros a un extremo 5' del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido para producir al menos un primer complejo diana, en donde la cuarta pluralidad de N-meros comprenden un grupo PO₄ en el extremo 5', en donde el grupo PO₄ está unido operativamente a un grupo protector
- 35 ;
- i) liberar al menos una composición que comprende el al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros y el al menos un N-mero de la al menos una segunda pluralidad de N-meros del al menos un primer complejo donante para producir al menos un complejo intermedio liberado poniendo en contacto el al menos un primer complejo donante con una combinación de uracil ADN glicosilasa y al menos uno de ADN glucosilato-liasa endonucleasa VIII, Endo IV y APE-1; y
- 40 j) retirar el grupo protector del al menos un primer complejo diana;
- 45 k) poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado en condiciones que anexan un extremo 3' del al menos un complejo intermedio liberado a un extremo 5' del al menos un complejo diana para producir al menos un primer complejo diana extendido, en donde los cebadores de anclaje de la primera y segunda pluralidades de cebadores de anclaje comprenden un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa, y
- 50 en donde los N-meros de la primera, segunda, tercera y cuarta pluralidades de N-meros son N-meros quiméricos que comprenden un extremo 5' (ADN) de desoxirribosa y un extremo 3' (ARN) de ribosa.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la anexión:

- 55 a) comprende ligación enzimática en condiciones que permiten actividad ligasa, preferentemente en donde la ligación enzimática comprende actividad ARN ligasa T4; o
- b) comprende ligación que no es enzimática.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además:

- 60 a) después de la producción del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar al menos un cebador de anclaje no unido; o
- b) después de la producción del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato, retirar los cebadores de anclaje no unidos.

4. El método de la reivindicación 3, en donde retirar el al menos un cebador de anclaje no unido comprende actividad exonucleasa, preferentemente en donde la actividad exonucleasa comprende una exonucleasa 5' a 3'

específica, preferentemente en donde la exonucleasa 5' a 3' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden un grupo -OH en 5'.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:

- 5 a) después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado;
 b) después de producir el al menos un primer complejo donante, retirar al menos un N-mero no anexado;
 c) después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido, retirar al menos un N-mero no anexado;
 10 d) después de producir el al menos un primer complejo diana, retirar al menos un N-mero no anexado; o
 e) después de producir el al menos un primer complejo diana extendido, retirar al menos un N-mero no anexado.

6. El método de la reivindicación 5, en donde retirar el al menos un N-mero no anexado comprende actividad exonucleasa, preferentemente en donde la exonucleasa comprende una exonucleasa 5' a 3' específica, preferentemente en donde la exonucleasa 5' a 3' no puede digerir moléculas del ácido nucleico que comprenden a 5' grupo -OH.

7. El método de la reivindicación 4 o reivindicación 6, en donde la exonucleasa 5' a 3' comprende una exonucleasa lambda, una exonucleasa XRN-1 o una combinación de las mismas.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la al menos una primera pluralidad de N-meros, la al menos una segunda pluralidad de N-meros, la al menos una tercera pluralidad de N-meros, la al menos una cuarta pluralidad de N-meros o cualquier combinación de las mismas comprende(n) al menos un N-mero que comprende un grupo OH en el extremo 3' y el extremo 5' del N-mero.

9. El método de la reivindicación 8, que comprende además,

- a) después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes poner en contacto el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido con al menos una segunda pluralidad de N-meros, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una primera pluralidad de N-meros;
 b) después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes poner en contacto el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y al menos una cuarta pluralidad de N-meros, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una tercera pluralidad de N-meros; o
 35 c) antes de poner en contacto el al menos un primer complejo diana y el al menos un complejo intermedio liberado, anexar un grupo PO₄ al extremo 5' del al menos un N-mero de la al menos una cuarta pluralidad de N-meros, preferentemente en donde anexar un grupo PO₄ comprende:
 i) fosforilación enzimática, preferentemente en donde fosforilación enzimática comprende actividad T4 polinucleótido cinasa; o
 40 ii) fosforilación no enzimática.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el grupo protector comprende fosfato de 4,4'-dimetoxitritilo.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además:

- a) después de producir el al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo donante, adenilar el extremo 5' del al menos un primer complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido;
 b) después de producir el al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido y antes de producir el al menos un primer complejo diana, adenilar el extremo 5' del al menos un segundo complejo de cebador de anclaje-sustrato extendido;
 c) antes de producir el al menos un primer complejo diana extendido, adenilar el extremo 5' del al menos un primer complejo diana, preferentemente en donde adenilar comprende:
 55 a) actividad enzimática, preferentemente en donde la actividad enzimática comprende actividad ARN ligasa Mth; o
 b) actividad no enzimática.

12. Una molécula del ácido nucleico producida según el método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Síntesis geométrica

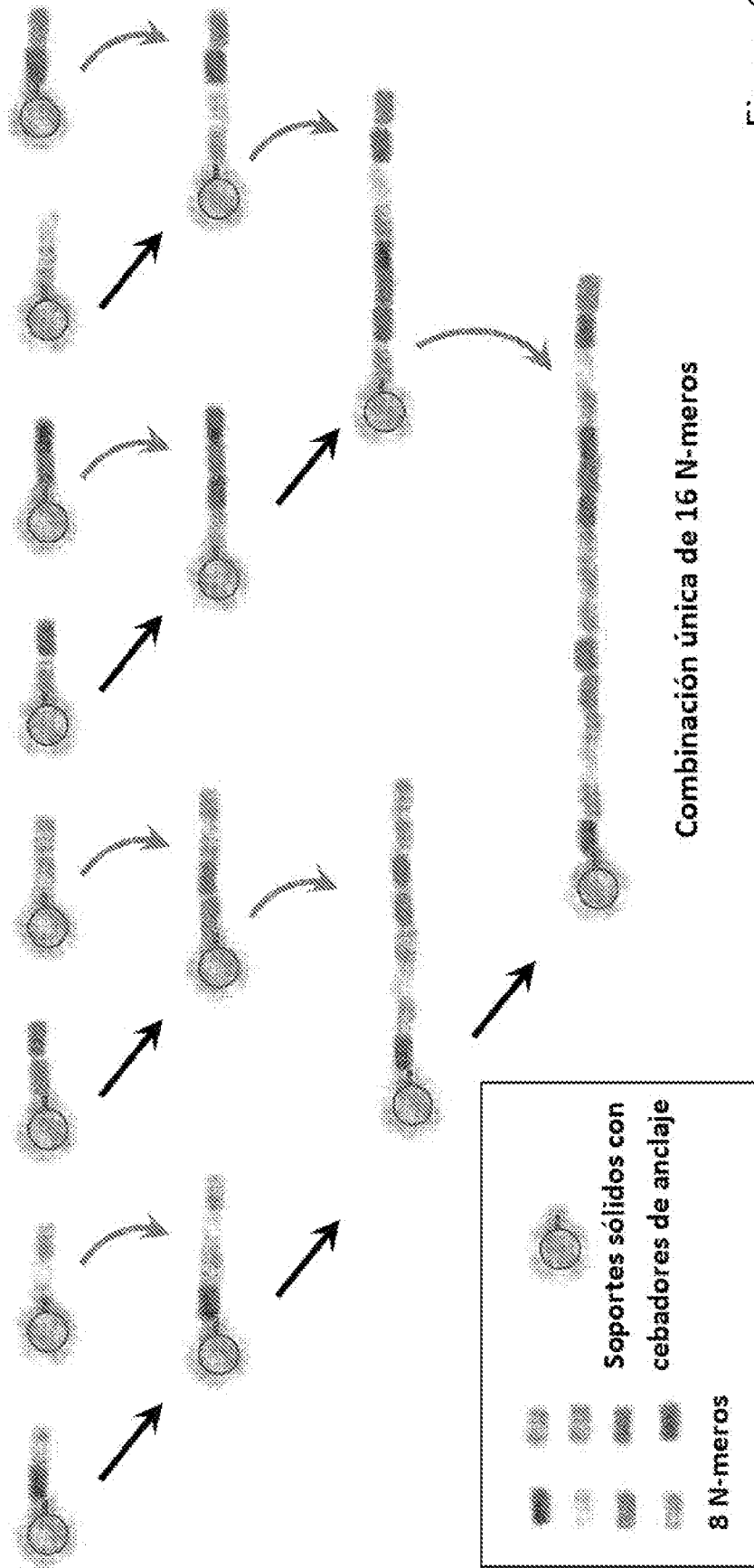


Figura 1

Demostración de síntesis de GFP, secuencia diana mostrada en color

A.

>L29345.1 ARNm de proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* cds completas
TACACAGCAATAAGAGATAACAGAGATGAGTAAAGGAGAGAGACTTTTCACTGGAGTTGTCGCCAATGCT
IGTGGAAATTAGATGGCGATGTTAATGGGCAAAATTCCTGTCACTGAGTGGAGAGCGGTGAGGTGATGDNAA
CATAGGAAACITACCCTTAAATTTATGGCACTACTGGGAAGCTAGCTGTTCCATGGDCAACAGCTTG
TCACTACTTCTCTATGGGTTCATGGCTTTTCAAGATACCAGATCAATATGAAACAGCAATGCACTTTT
CAAGAGTCCCATCCCGAAGGTTATCTACAGGAAGACTATATTTACAAAGATGACGGGAACTACA
AGACAGTCCCTGAGCTCAAGTTGCAAGGTGATACCCTTGTAAATAGATCGAGTTAAAGGTATGAT
TTAAGAGATGSAACATTTGGACACAAAATGGAAATACAACTATAACTGCAATGATGATATACATCA
TGGCAGACAACCCAAAGAAATGGAAATCAAGTTAAGTTAAGTTAGACACAAACATTAAGATGGGANGC
GTTCAATTAACAGACCAATTATCAACAAATACTCCAAATGGGCAATGGCCCTGTCTTTTACCCAGACAA
CAATTAAGCTGTGACACADATCTGCCCTTCCAAAGATCCACAGGAAGAGAGATCAATGATGCTTC
TTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTAACACATGGCAATGGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATG
CAATTAAGCTGAGTGGGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATGCAATG
CTTTATTAATTAATTAAGATTCATTAATAATTTATGAATATTTATGATGATTTATTAAGGGCTATTT
TCTTATTAATTAAGGCTACTGAGTGTAT

B.

	Conjunto de placas "a" (SEQ ID NO:47-63)	Conjunto de placas "b" (SEQ ID NO:69-98)
1aA1	TACACAGCAATAAGAGATAAC	1bA1 AAGATGAGTAAAGGAGAGACA
1aA2	ACTTTTCACTGGAGTTGTCGCC	1bA2 AATTCCTGTTGAAATTACATCG
1aA3	CSAATGTTAATGGGCAAAAT	1bA3 CTCTGTCACTGAGTGGAGCGGTGA
1aA4	AGGTGATGCACATACGGAAA	1bA4 ACTTACCCCTTAAATTTATTTG
1aA5	CACTACTGGGAGCTACCTGT	1bA5 TCCATGGCCDAADACTTGTCCAC
1aA6	TACTTCTCTTATGGTTC	1bA6 ATGCTTTTCAAGATACCACAGA
1aA7	TCATATGAAACAGCAATGACTT	1bA7 TTTCAAGAGTCCGATGSCCGGA
1aA8	AGSTTATGTACAGGAAAGAAC	1bA8 TATATTTTACAAAGATCAAGC
1aA9	GAACTTCAAGAGCAAGCTGCTGA	1bA9 AGTCAAGTTTCANGSTGATAC
1aA10	CCTTGTAAATAGAAATGAGACTT	1bA10 AAAAGCTATTTGATTTTAAAGA
1aA11	AGATGGAAACATTTCTGGACA	1bA11 CAAATGGGAAATGCAACTATAA
1aA12	CTCAATATGTATADATCAT	1bA12 GCGAGCAAAACCAAGAAATGG
1aB1	AATCAAGTTAAGTTCAAAAT	1bB1 TAGACACACATTTAAAGATGG
1aB2	AAGCTTCAATTACAGAGCA	1bB2 TTATCAACAATAACTCCGAT
1aB3	TGGCGATGGCCCTGTCTTT	1bB3 ACCAGACACCACTTACCTGTG
1aB4	CACACAAATGTCCTTTCCAA	1bB4 ACATCCCAACCAAAACAGACA
1aB5	TCACATGATCTTCTTGGAT	1bB5 TGTAAACAGCTGCTGGGATTC
1aB6	AGATGGCAATGGAATGAACTATA	1bB6 CAAATAAATGTCCAGACTCC
1aB7	AATTAACAGTAAAGCTGCCGA	1bB7 ACAATTAATAATTTCTCAGGG
1aB8	TTCCCTGGTTAAATTCAGSCTG	1bB8 ACACTTTATTAATATATTTAT
1aB9	AGATTCATTAATAATTTATGA	1bB9 ATAATTTATGATGTTATTA
1aB10	TAGGGCTATTTCTTATTA	1bB10 ATAGGCTACTGGAGCTGAT

Figura 3

SEQ ID NO: 46

Método de síntesis geométrica en 3': Primera ligación

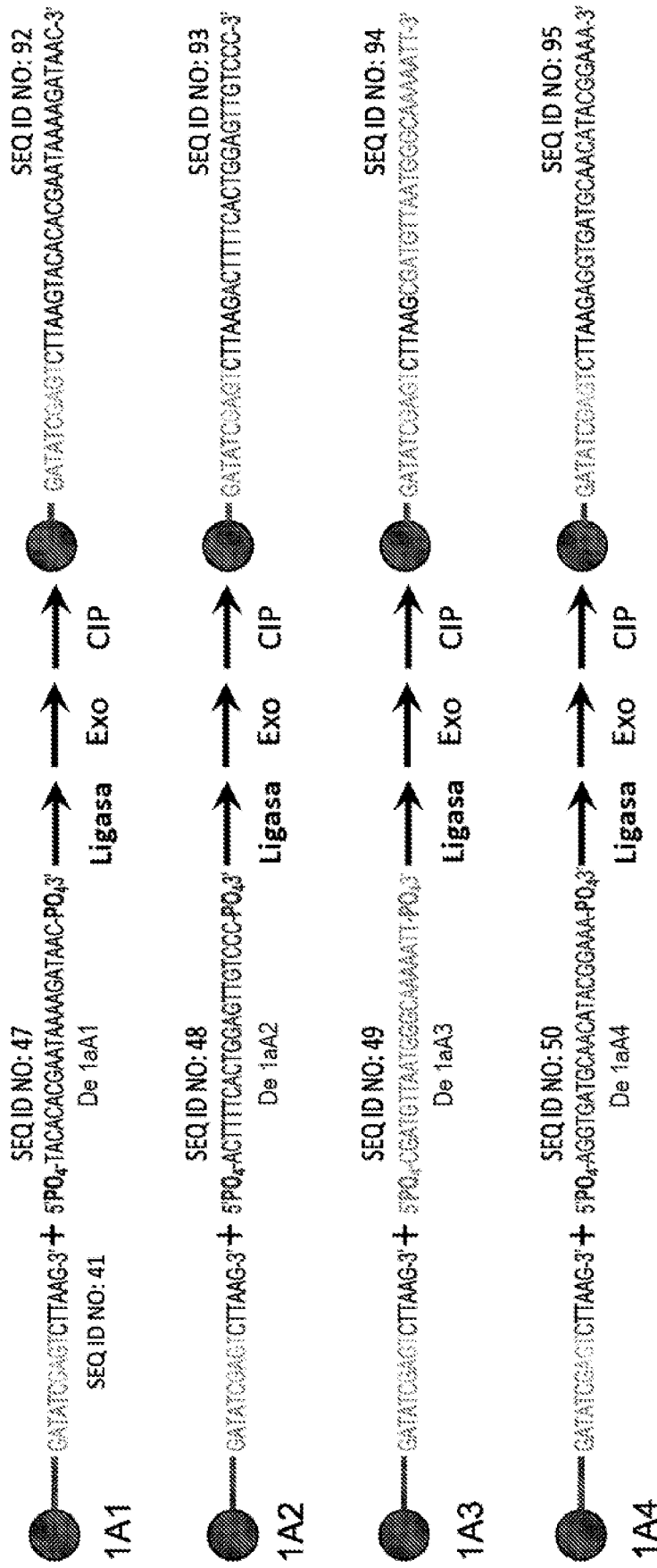


Figura 4

Método de síntesis geométrica en 3': Segunda ligación

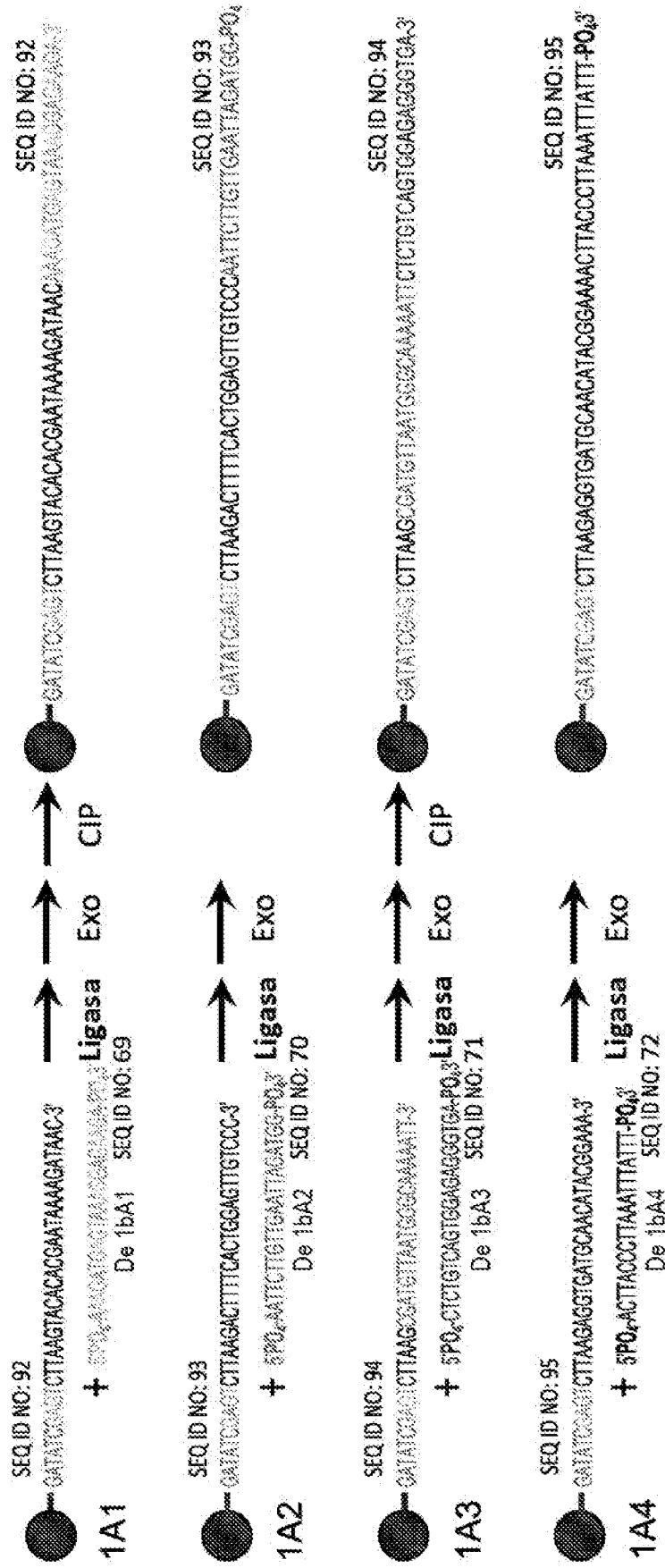


Figura 5

Método de síntesis geométrica en 3': 4.ª unión y liberación

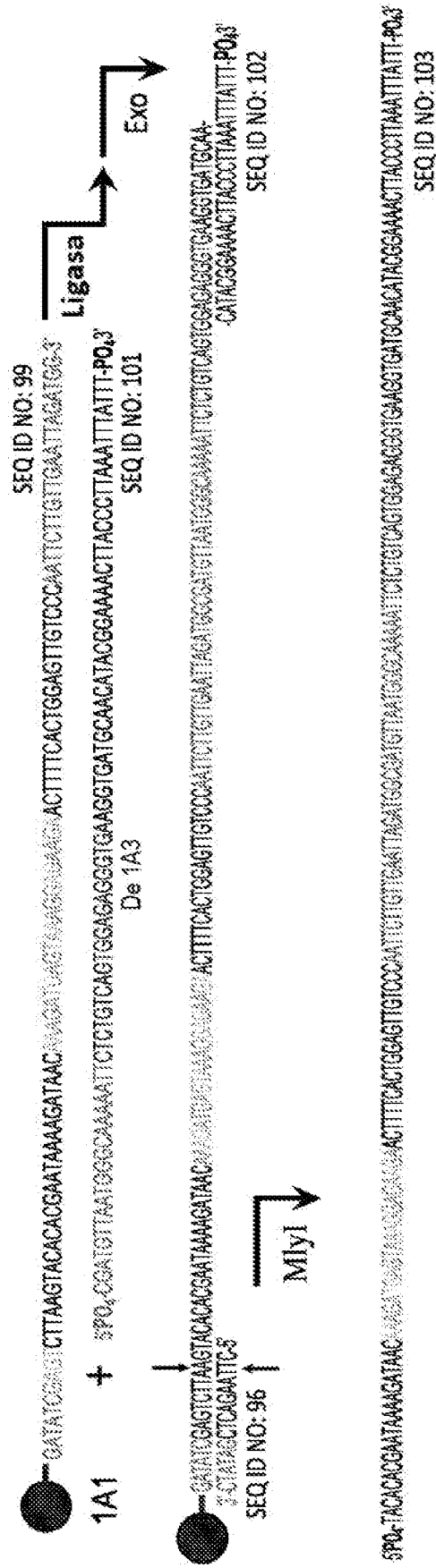


Figura 8

Disposición
de placas y
movimientos
de pipeteo

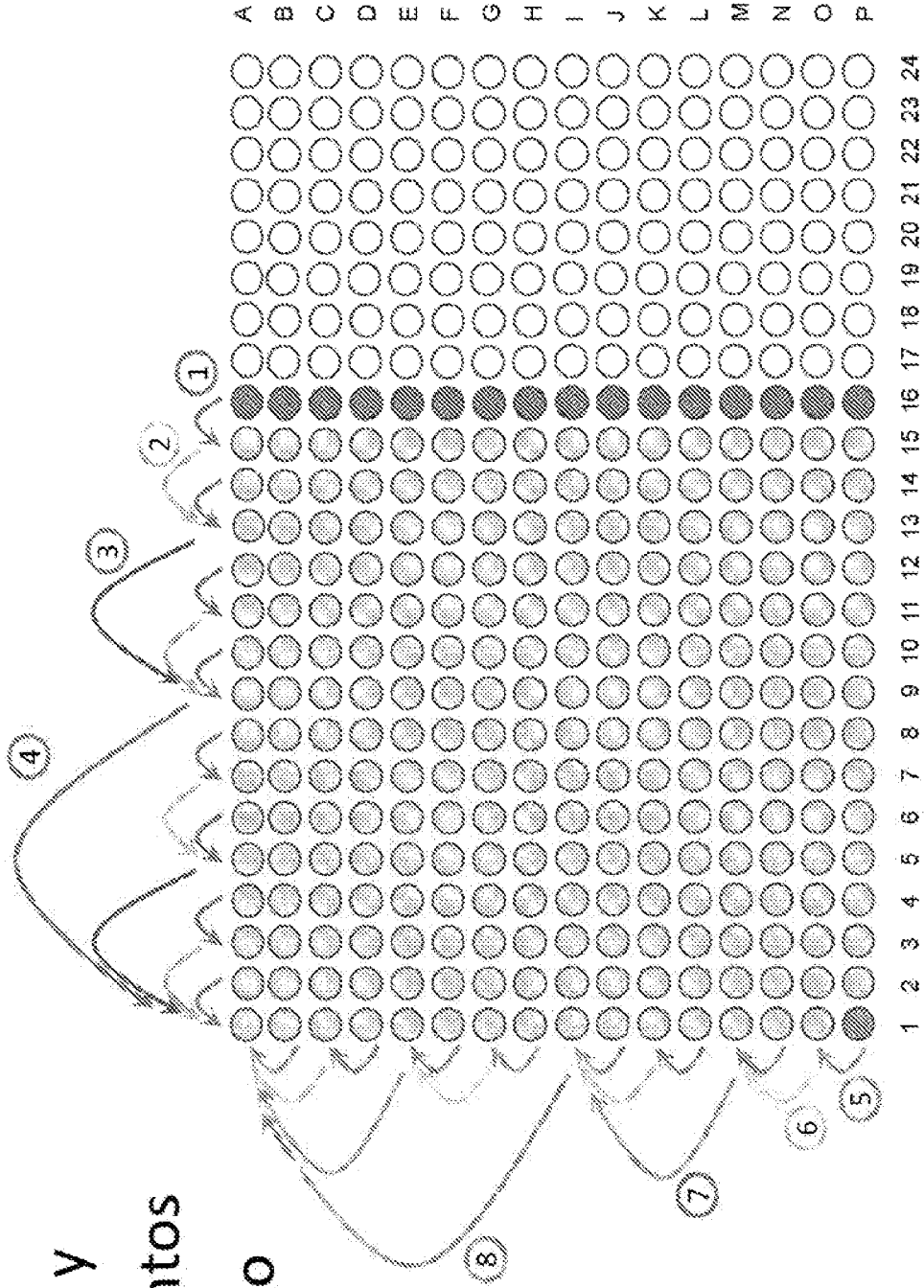
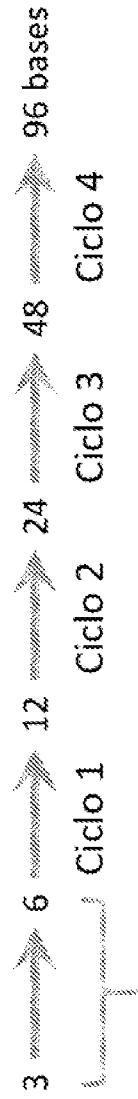
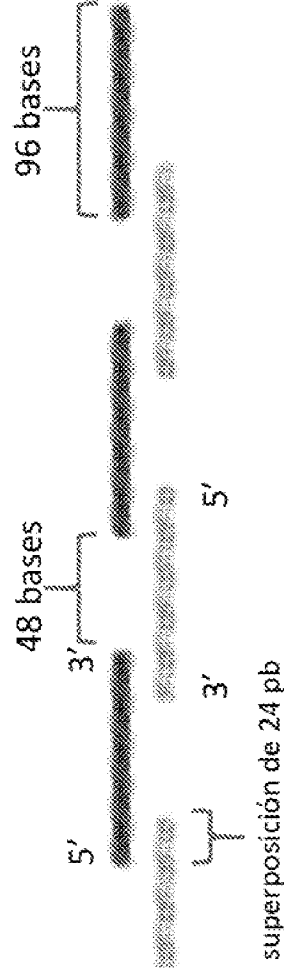


Figura 9

Co-síntesis de 5', 3'

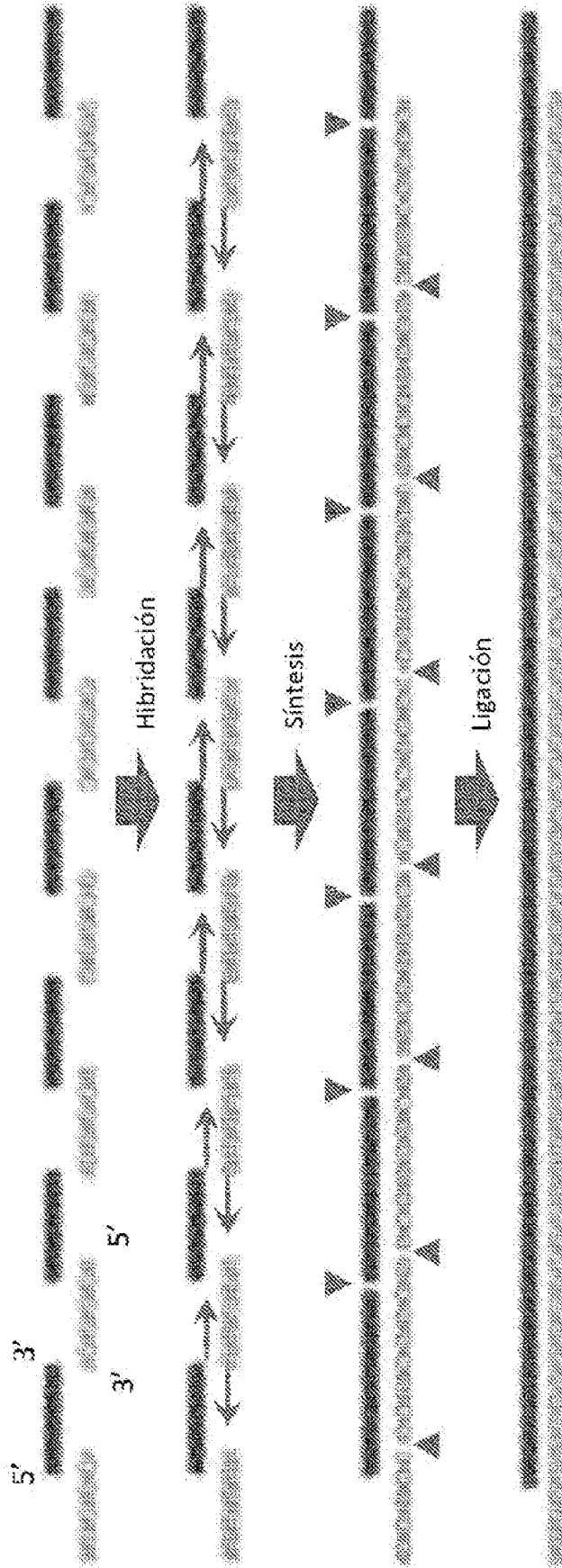


Dos rondas de ligación en el cebador de andaje



Seis fragmentos superpuestos, cada uno generado con 3-meros en 4 ciclos, con 24 pb de superposición cubre 456 bases de la secuencia obtenidas por primera vez.

Figura 10



- Co-síntesis de 5', 3', con dieciséis fragmentos superpuestos, generados a partir de 5-meros, con 24 pb de superposición cubre 2200 bases de secuencia obtenidas por primera vez
- Hibridación, síntesis de AN cebada a partir de los extremos 3' en superposiciones, seguido de ligación y genera un producto final



Figura 11

Síntesis geométrica con transposasa

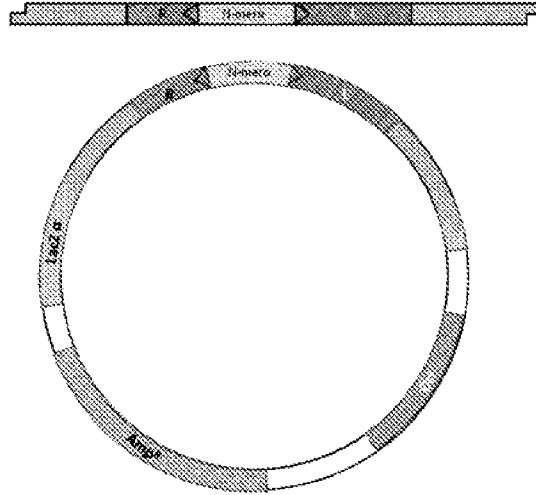


Figura 12

Síntesis geométrica con transposasa

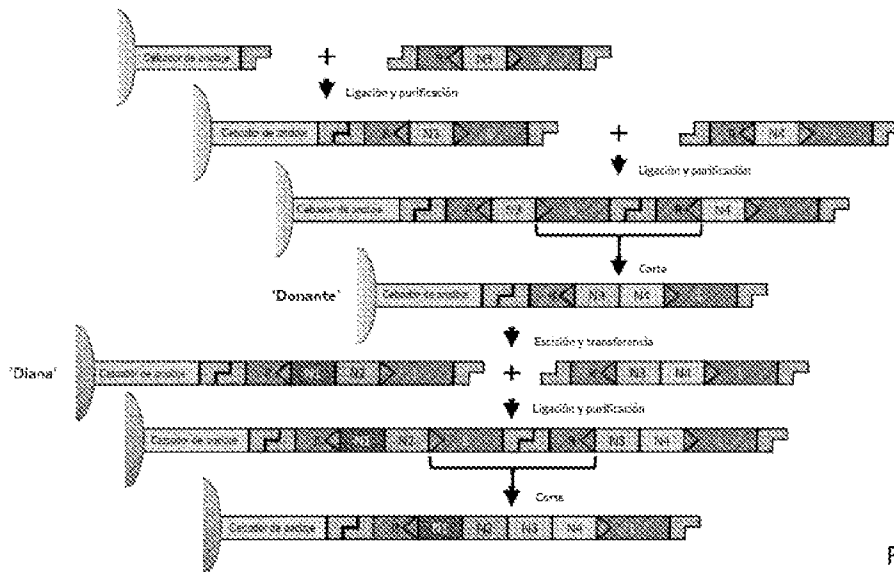


Figura 13

Amplificación por transferencia de superficie a superficie

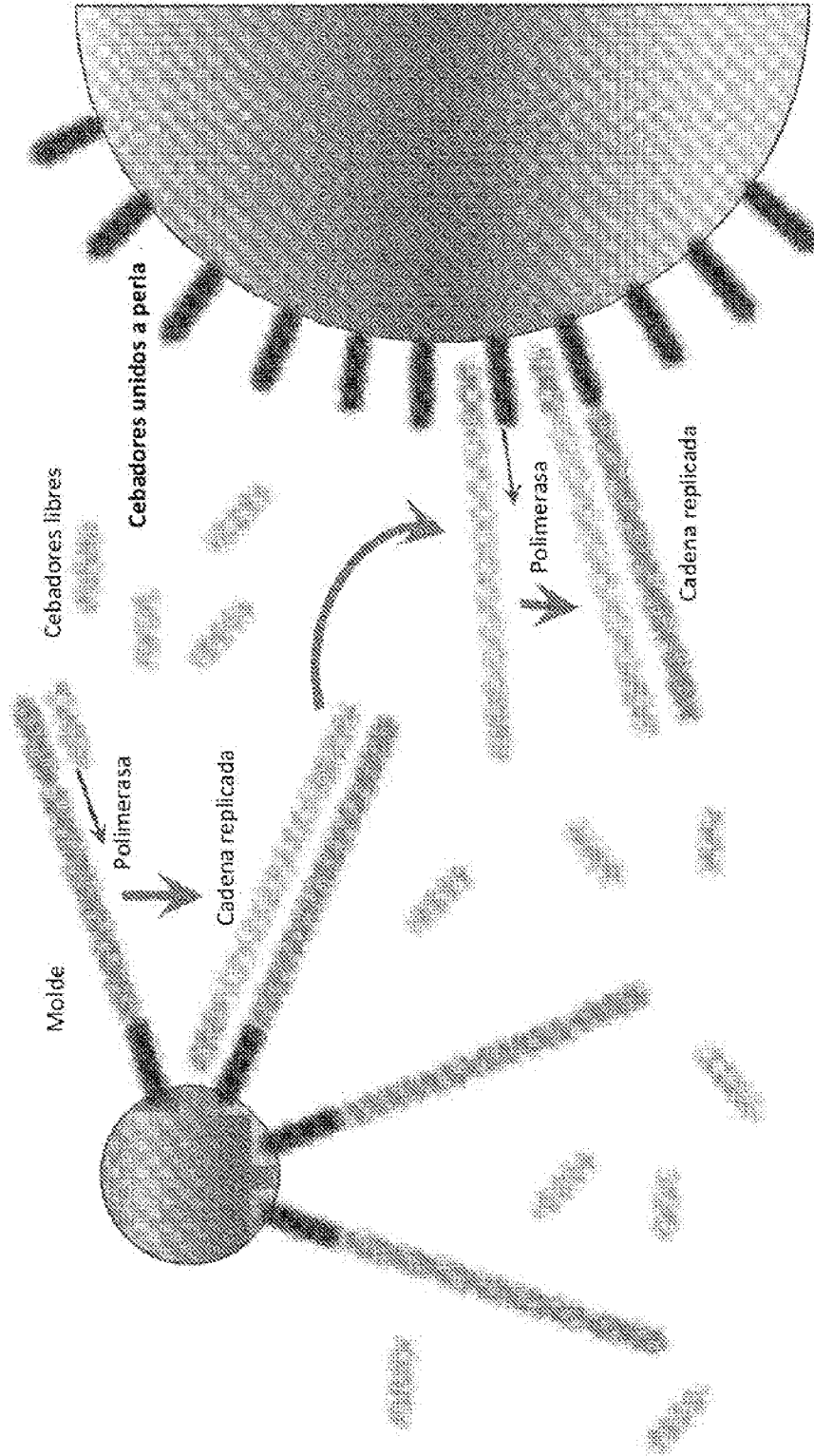
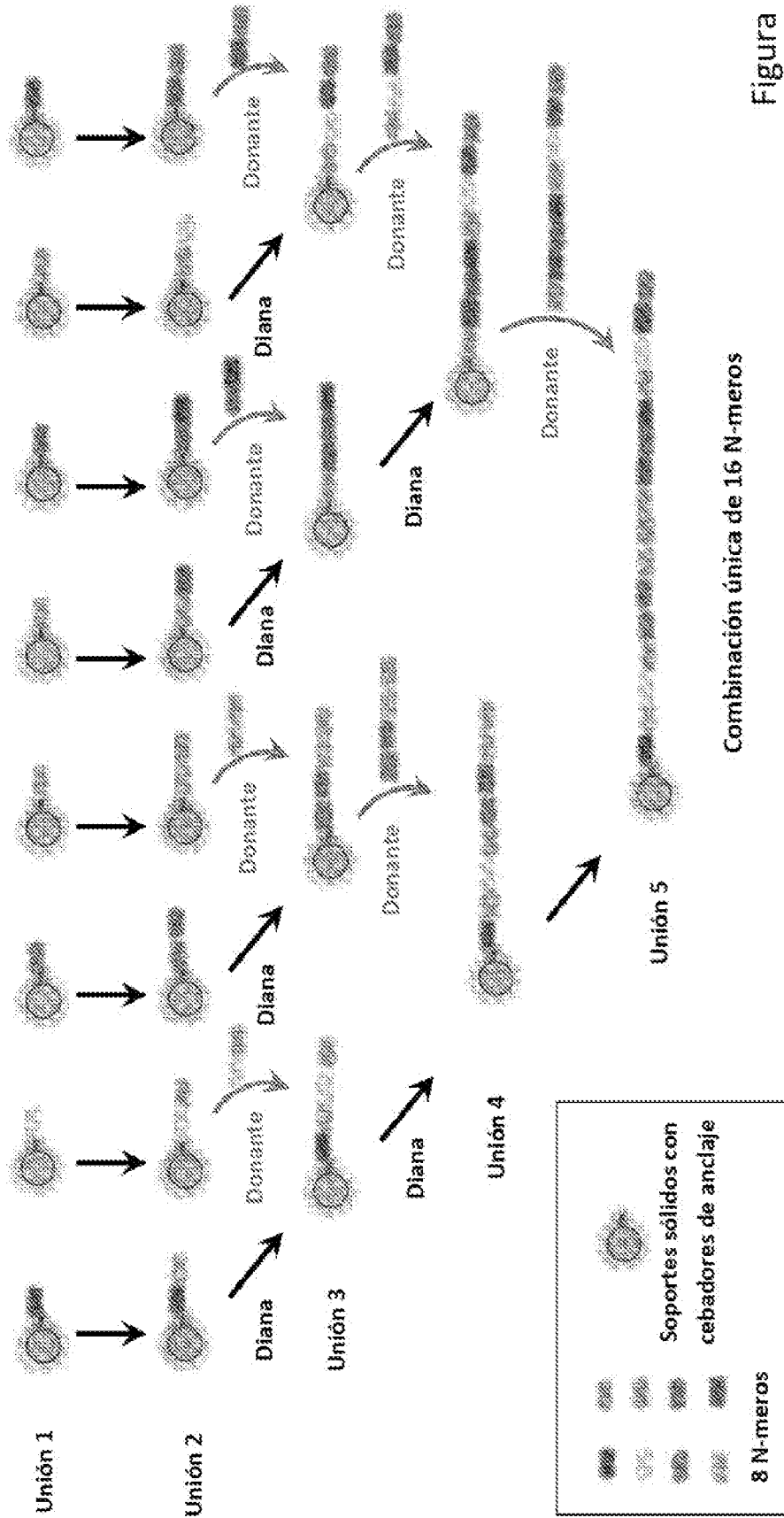


Figura 14

Síntesis geométrica



Combinación única de 16 N-meros

Figura 15

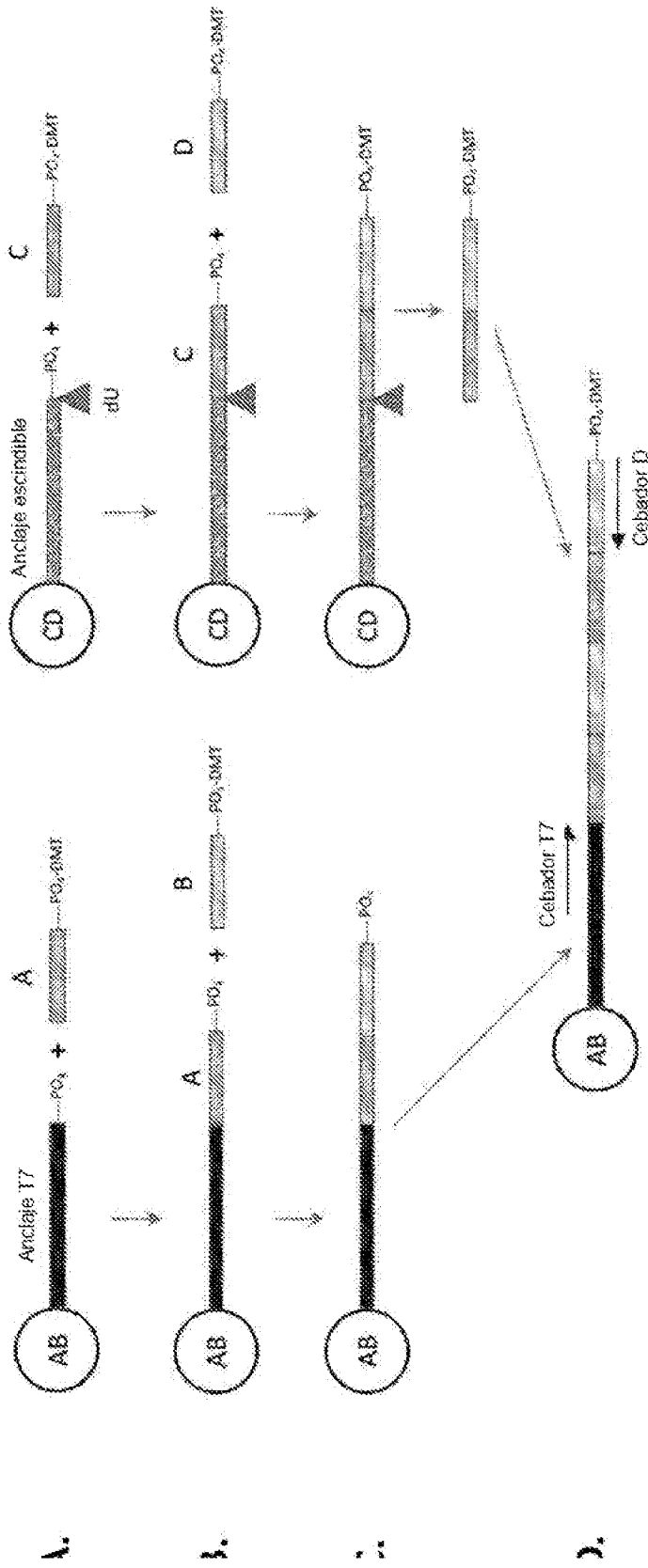


Figura 16

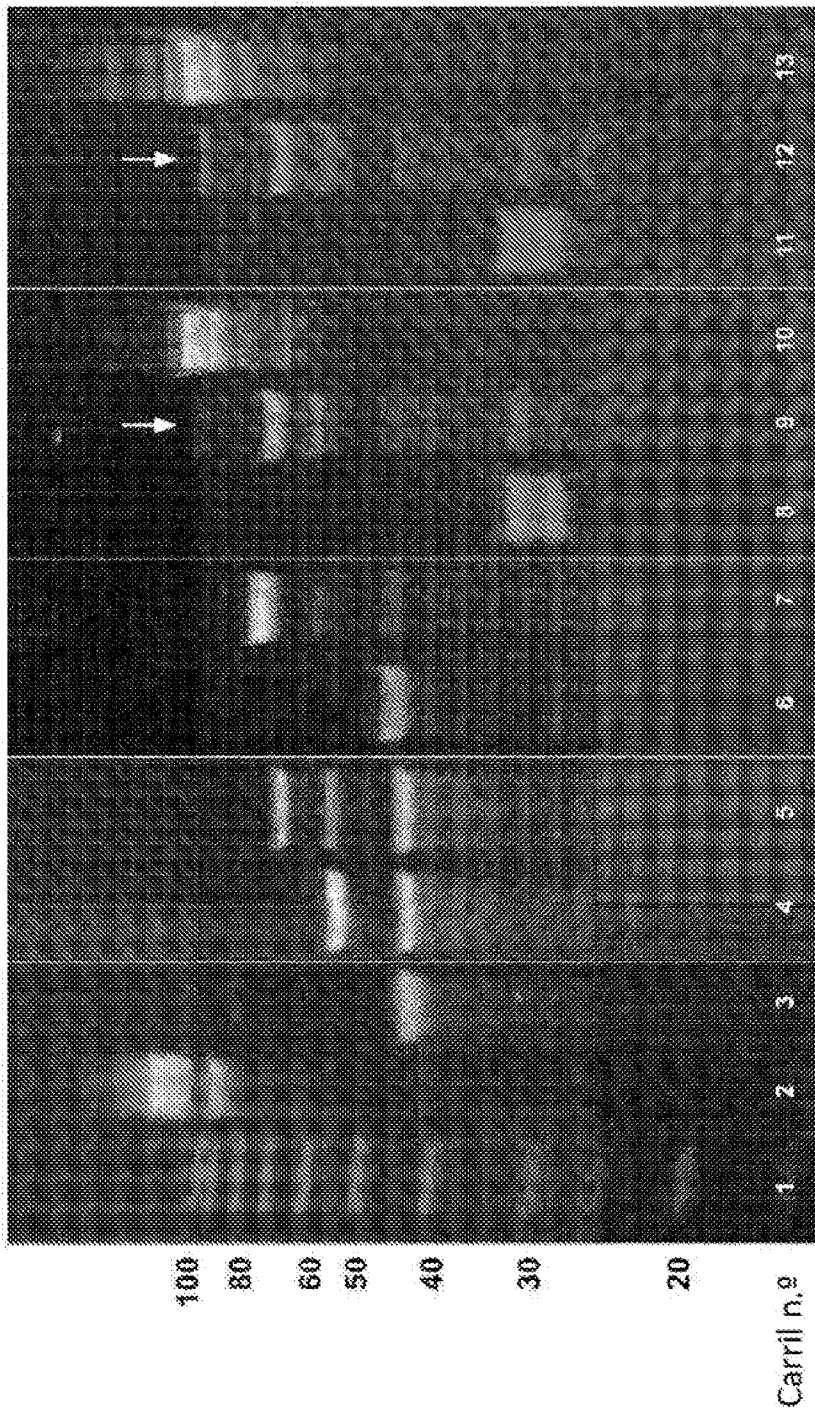


Figura 17

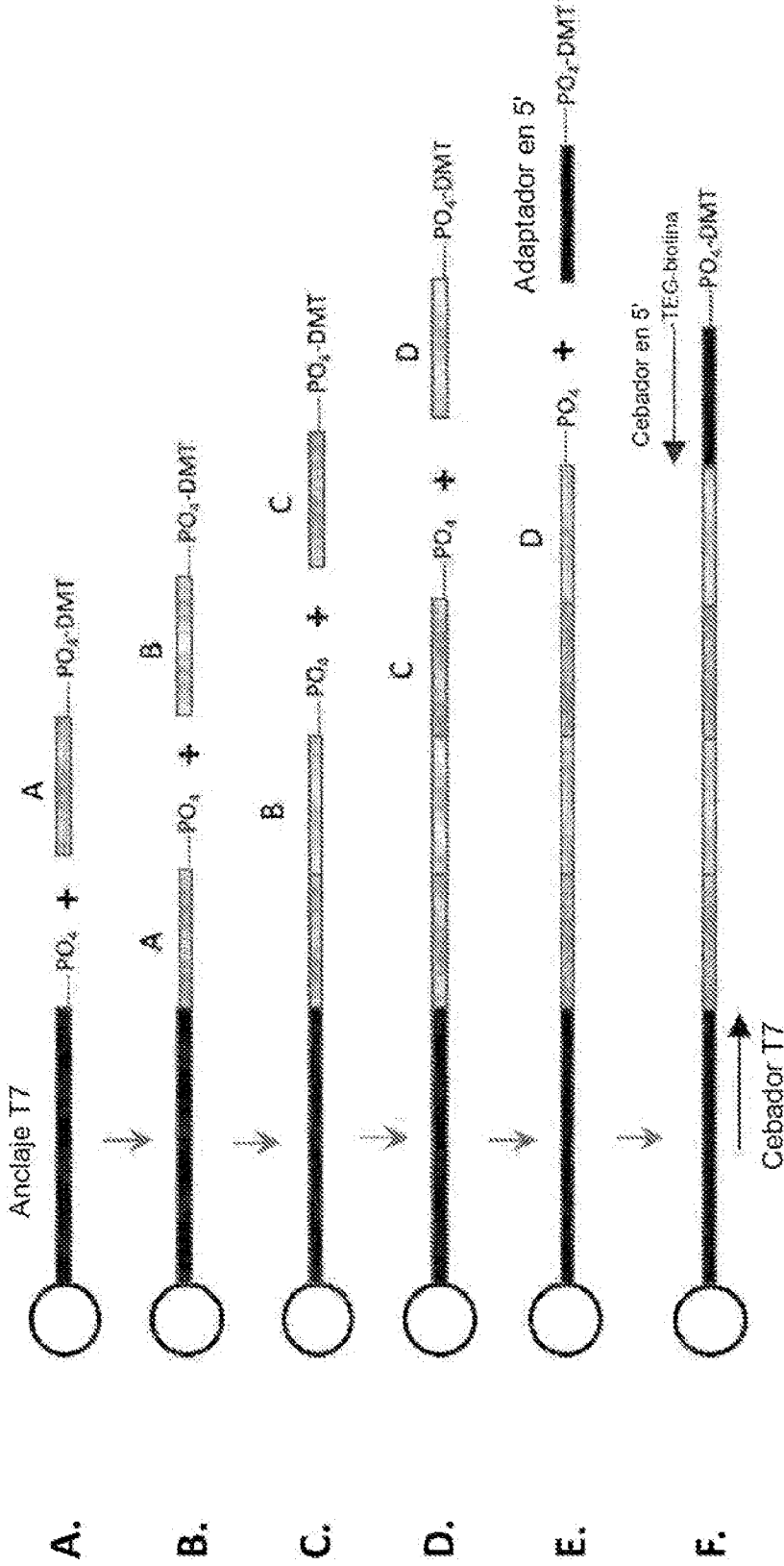


Figura 18

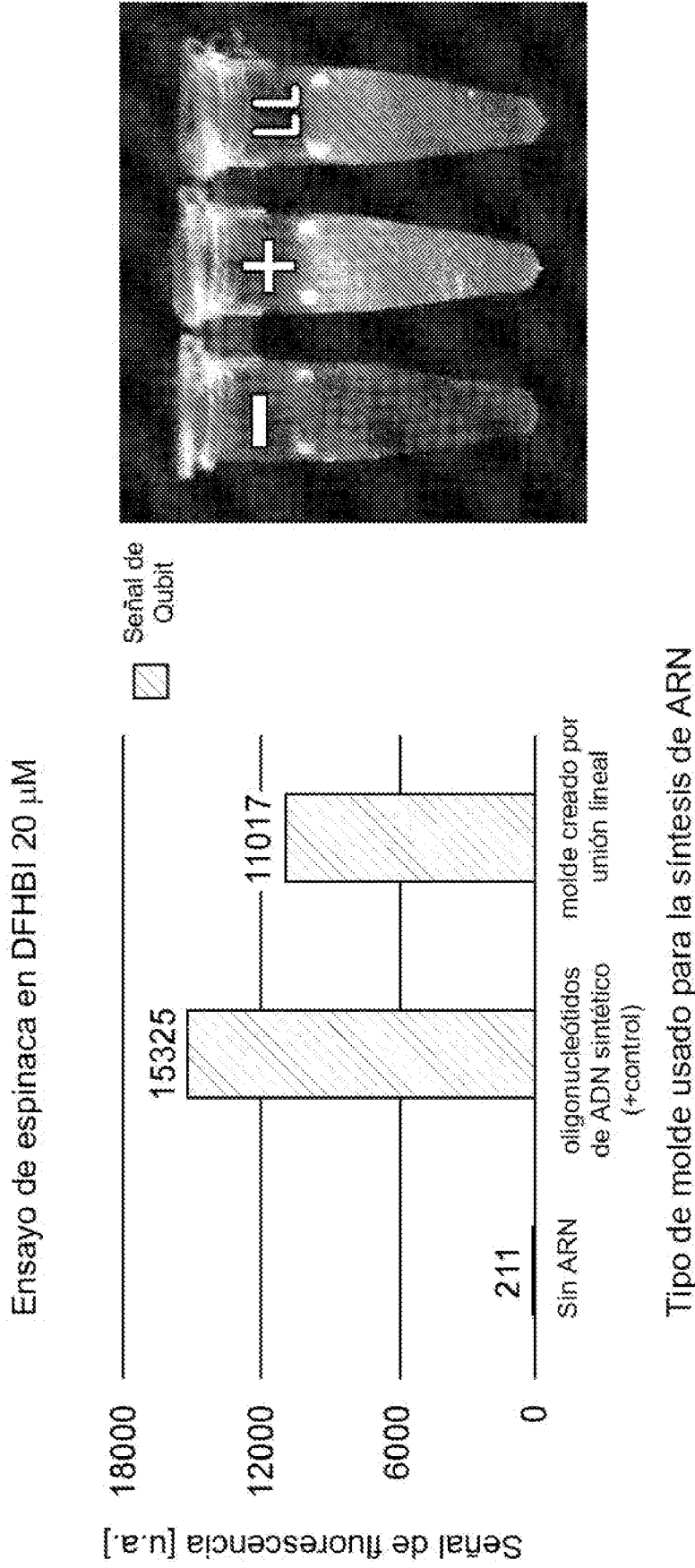


Figura 19

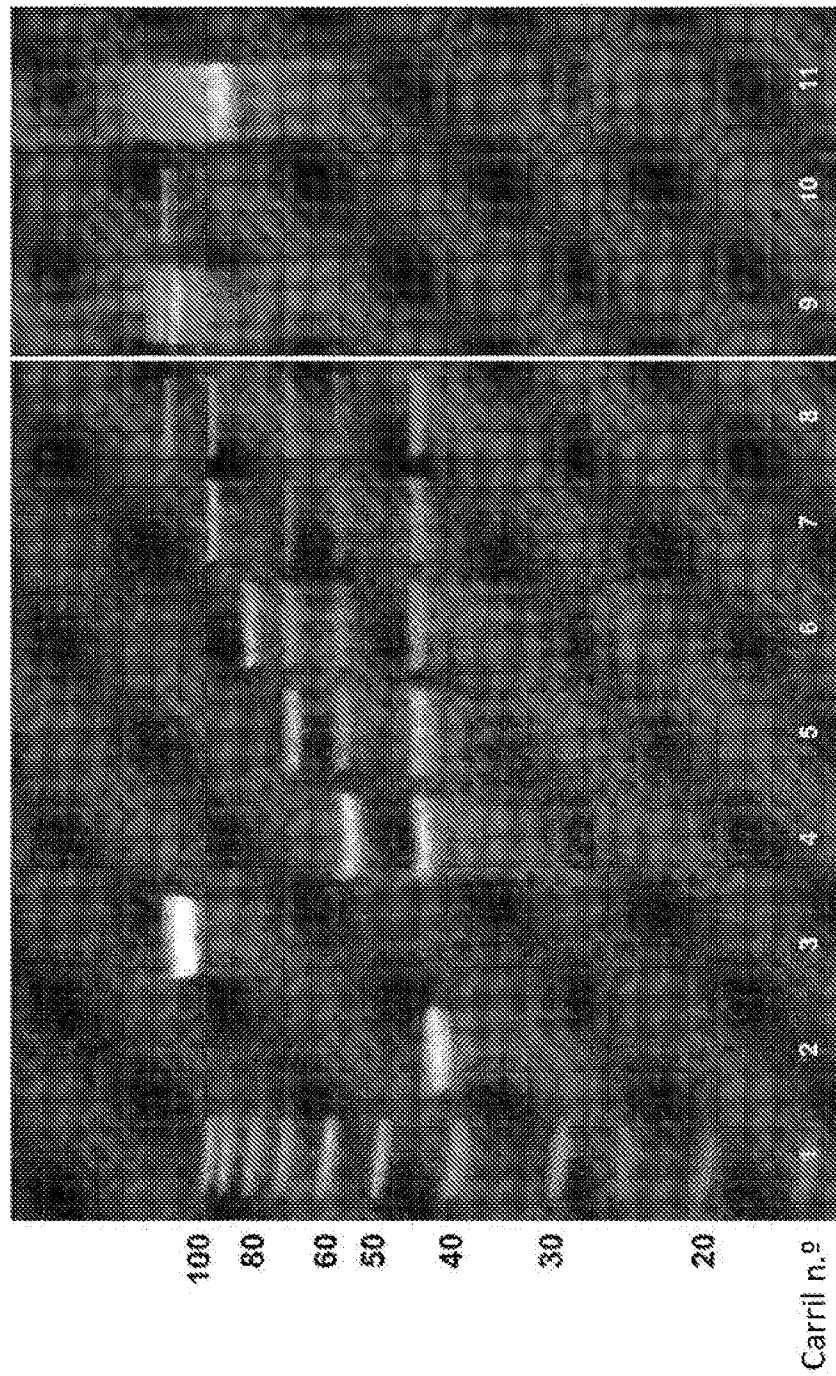
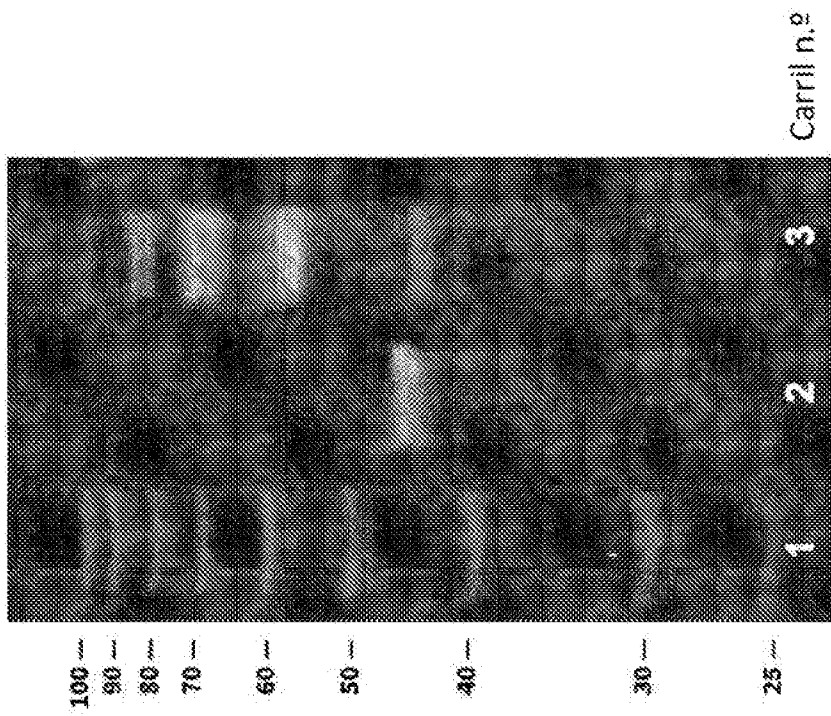
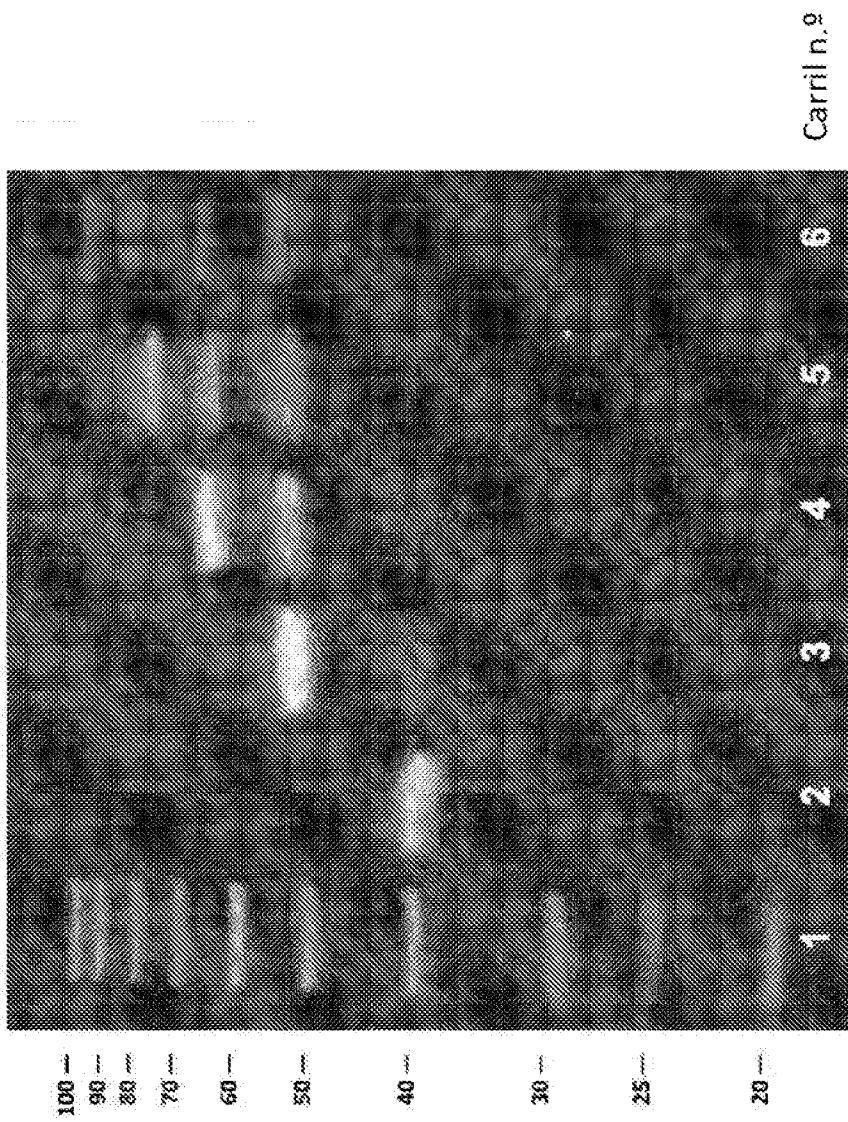


Figura 20



Con etapas de adenilación

Figura 21



Con etapas de fosforilación

Figura 22

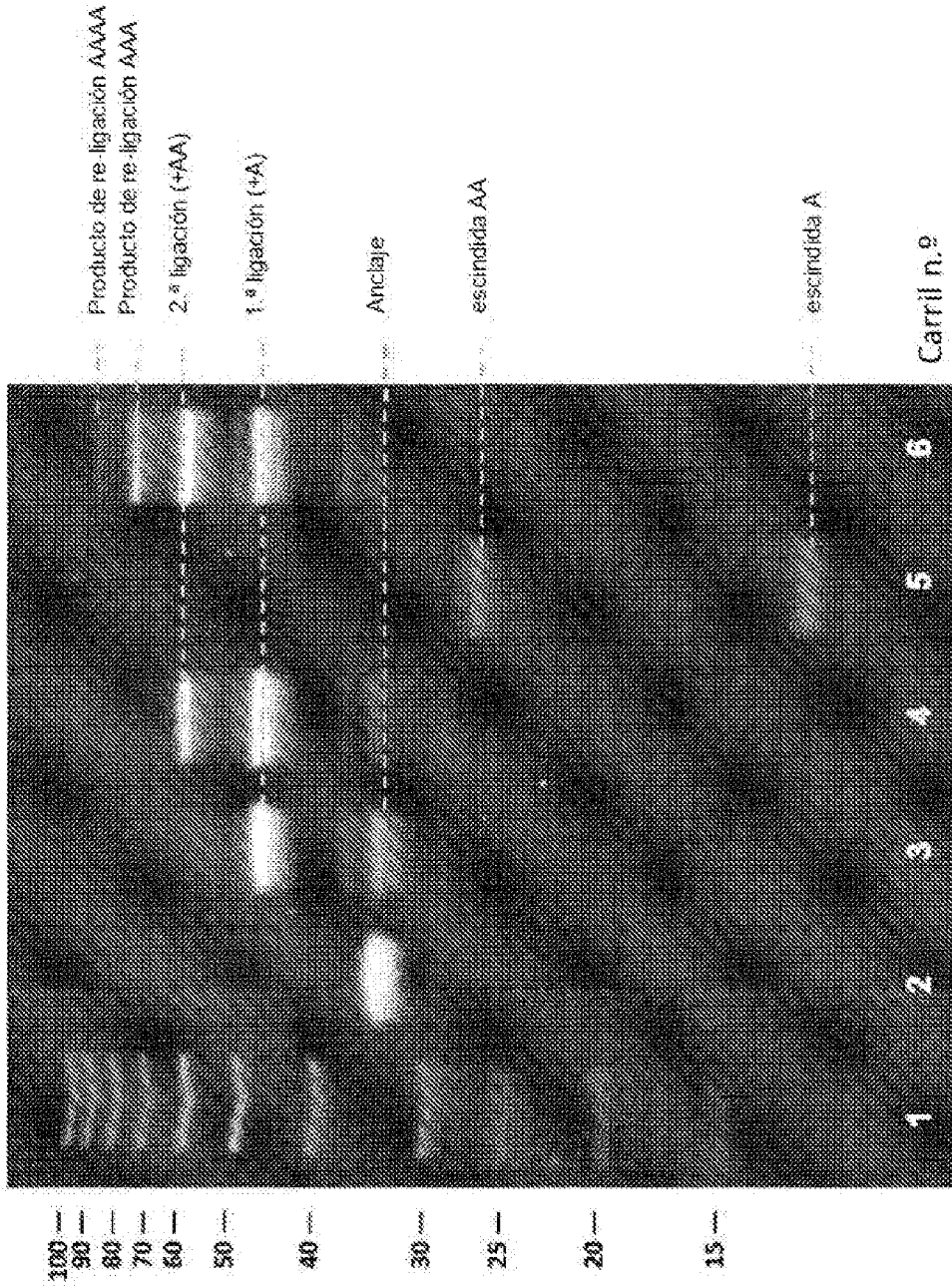


Figura 23

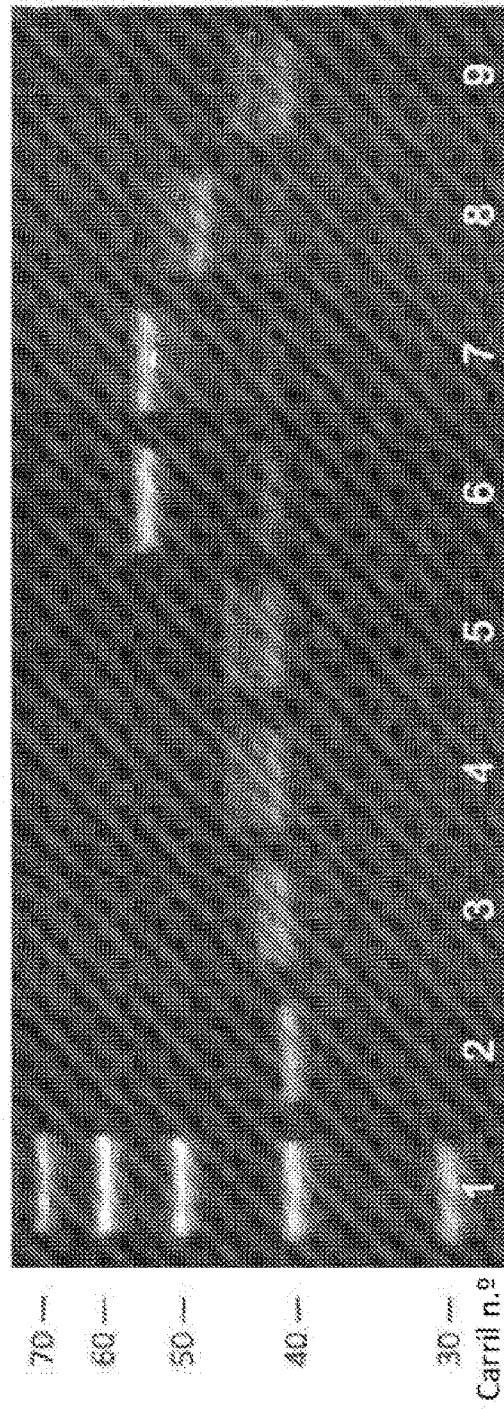


Figura 24

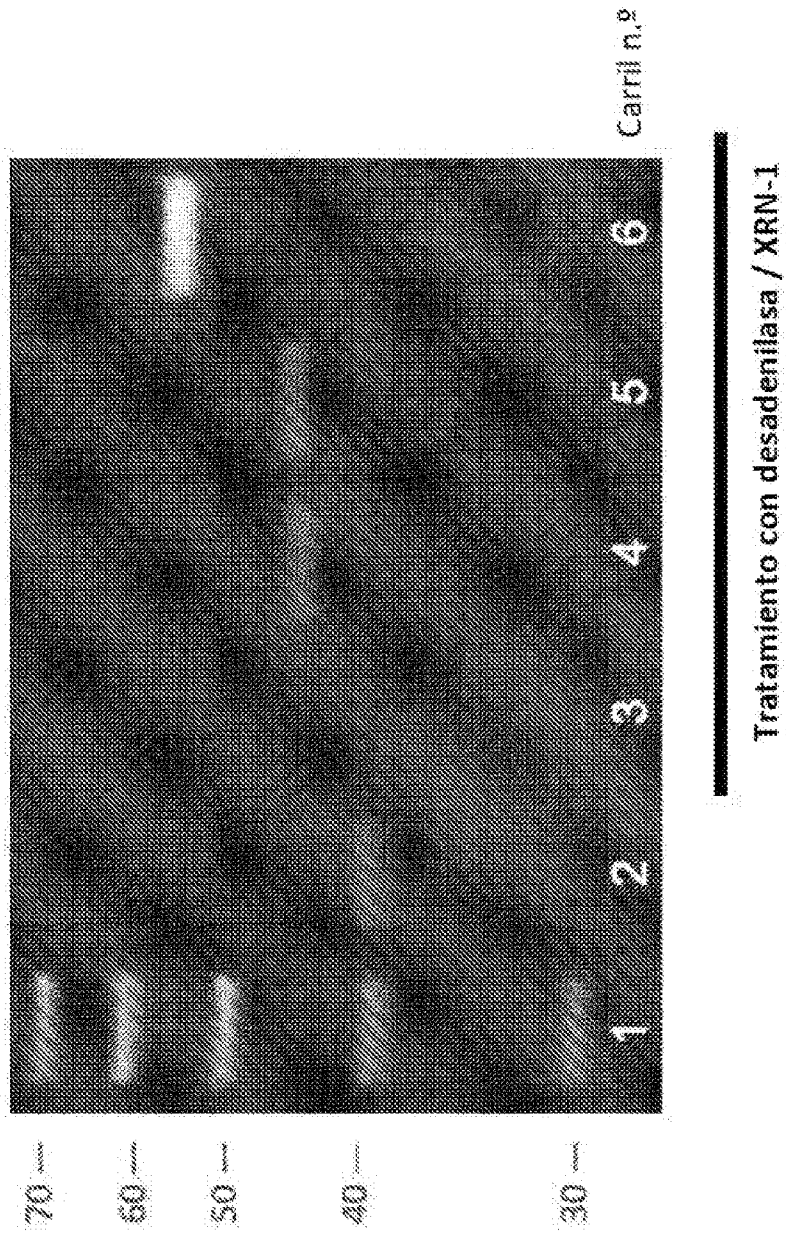


Figura 25

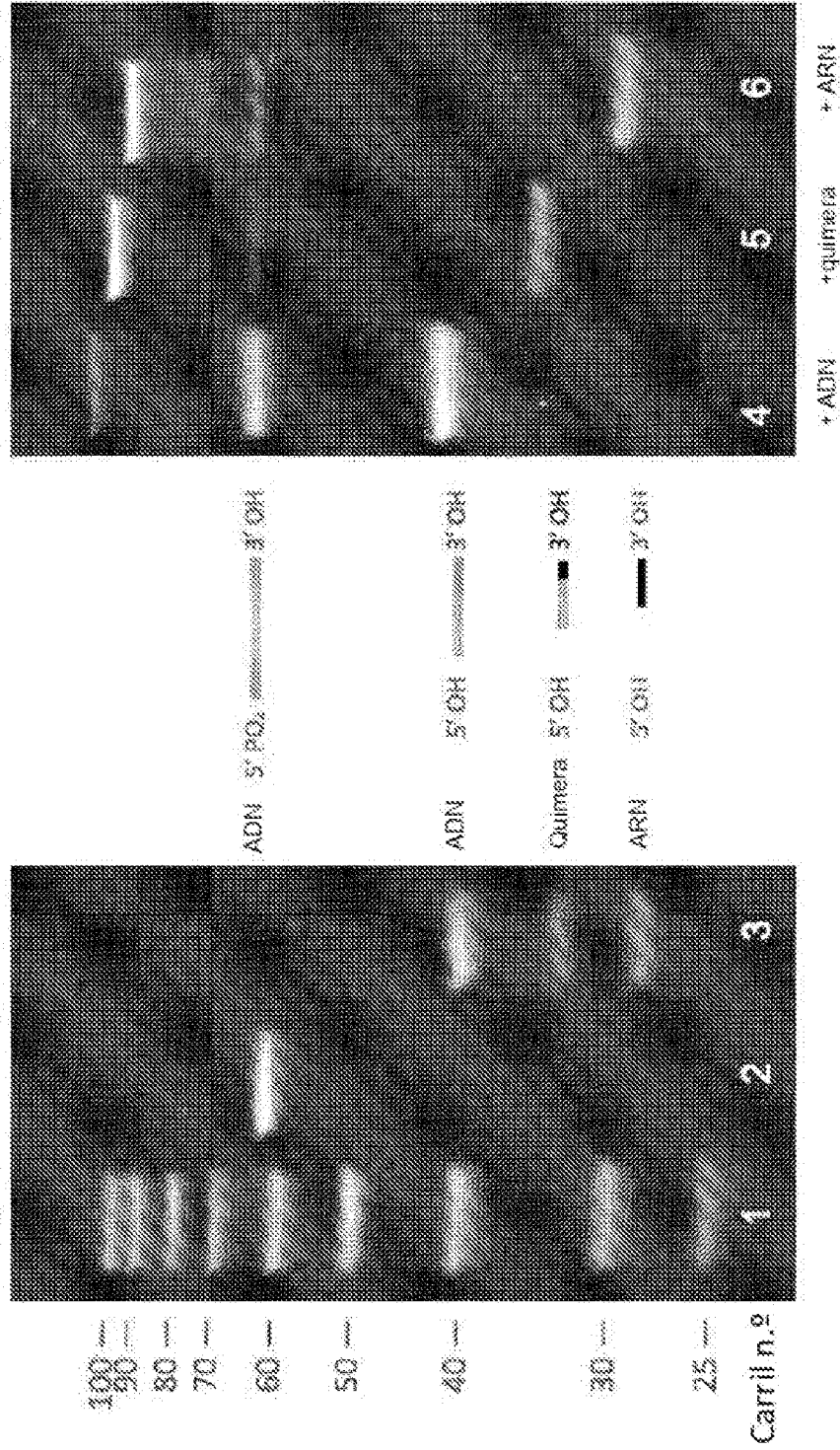


Figura 26

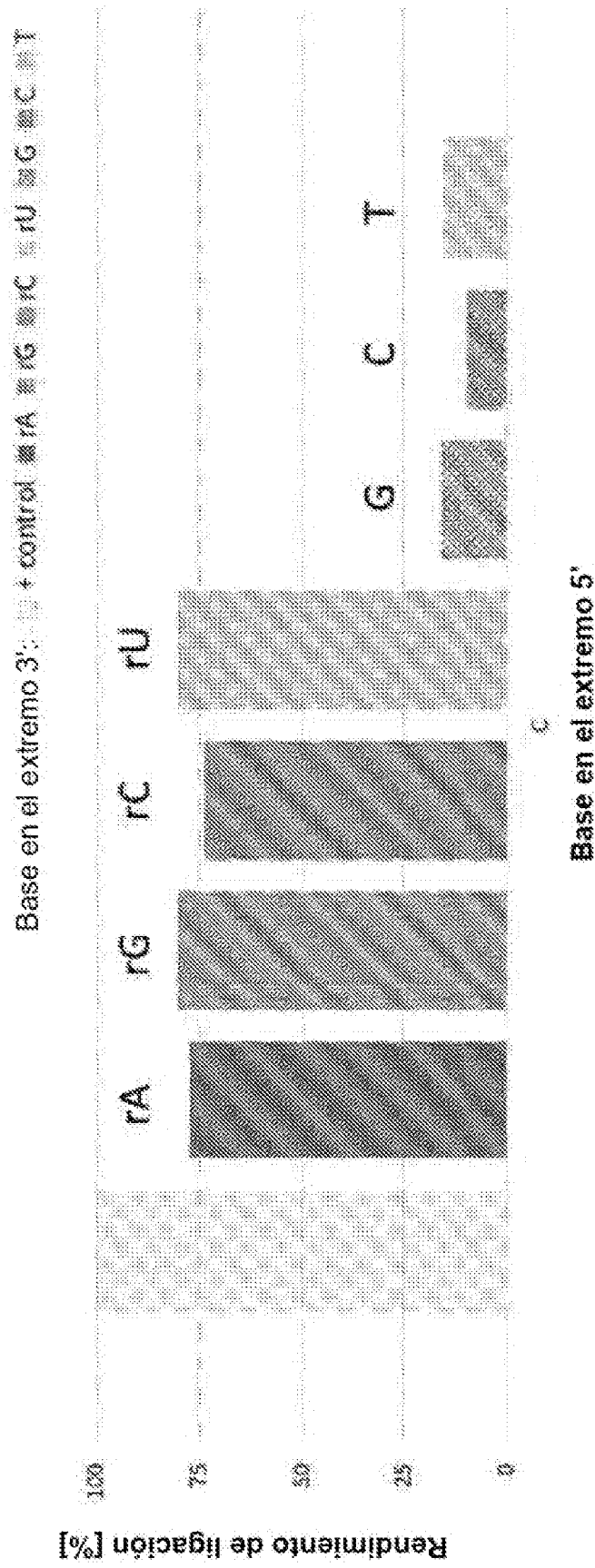


Figura 27

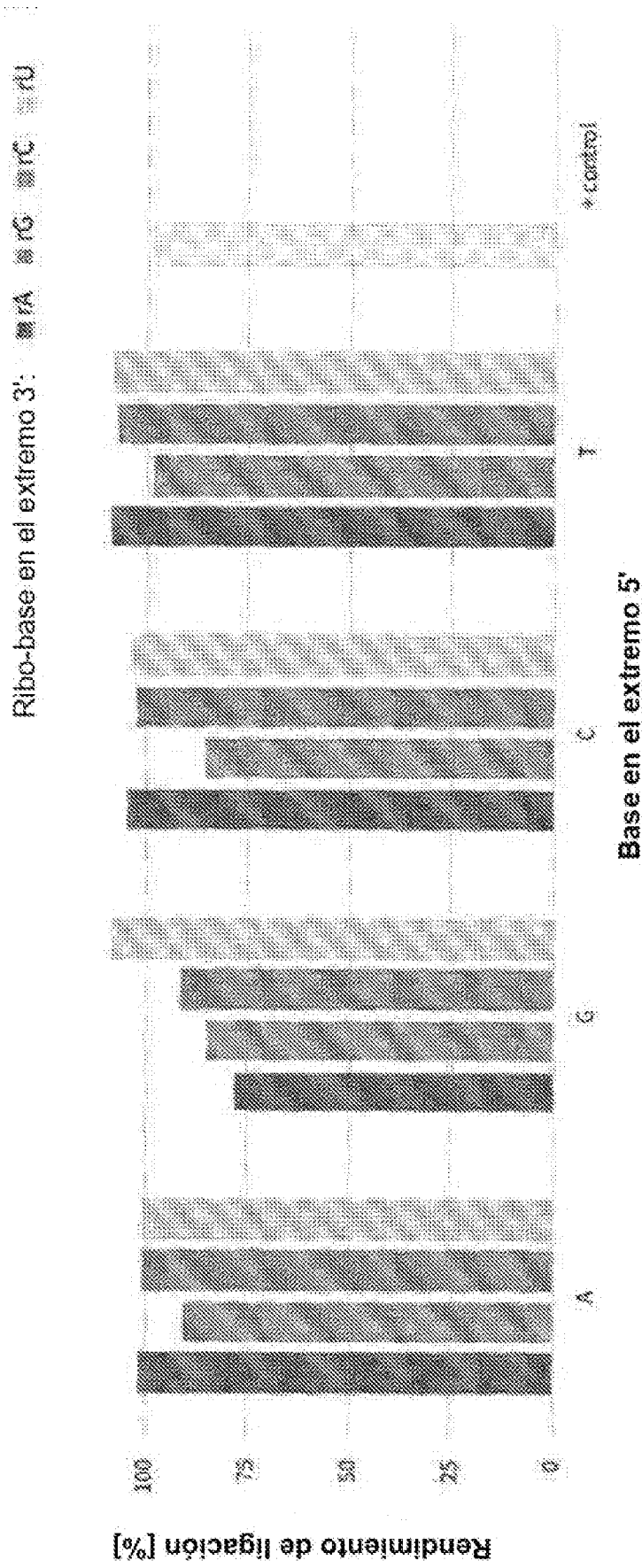


Figura 28

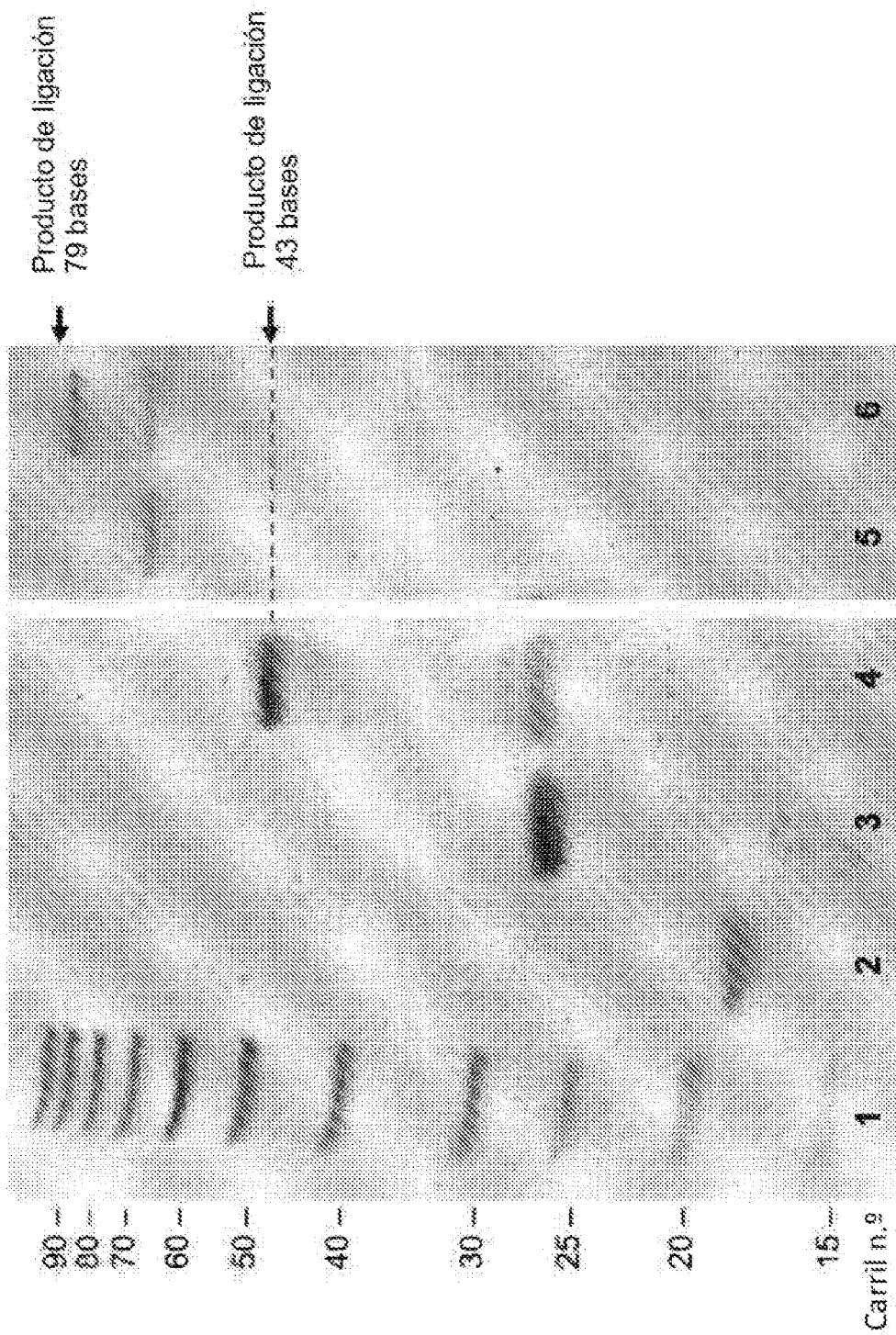


Figura 29