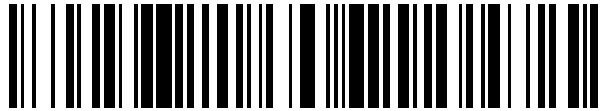


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 626**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C40B 40/06 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/6855 (2008.01)
C12Q 1/6853 (2008.01)
C12N 15/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2017 PCT/US2017/034329**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2017 WO17205540**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2017 E 17803528 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3464634**

54 Título: **Métodos de marcado molecular y bibliotecas de secuenciación**

30 Prioridad:

24.05.2016 US 201662340954 P

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

27.10.2021

73 Titular/es:

**THE TRANSLATIONAL GENOMICS RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
445 N. Fifth Street, Suite 600
Phoenix, Arizona 85004, US**

72 Inventor/es:

**MURTAZA, MUHAMMED y
DE LAS NIEVES PERDIGONES BORDERIAS,
MARIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 870 626 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

Métodos de marcado molecular y bibliotecas de secuenciación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de marcado molecular de ácidos nucleicos, por ejemplo, para preparar bibliotecas de secuenciación. La invención también se dirige a bibliotecas de secuenciación marcadas.

Antecedentes de la invención

10 El marcado o el código de barras molecular implica unir un marcador oligonucleótido único o degenerado a cada molécula molde en las etapas tempranas o primeras de la preparación de la biblioteca de secuenciación, de modo que se pueda distinguir cualquier señal de variante de abundancia baja del ruido introducido durante el procedimiento. El procedimiento se ha descrito recientemente como un enfoque viable para detectar y cuantificar variantes de abundancia baja en mezclas complejas de ácidos nucleicos. El objetivo general es mejorar la sensibilidad y precisión de la secuenciación de nueva generación para identificar, detectar y cuantificar moléculas de ácido nucleico de cualquier tipo dado (o que llevan una variante). La publicación internacional WO2009/091719, por ejemplo, describe composiciones, métodos y kits para detectar una o más especies de moléculas de ARN. De manera similar, la publicación internacional WO2014/071361 describe métodos de codificación de barras de ácidos nucleicos, tales como el ADN genómico. Sin embargo, los métodos existentes todavía son incapaces de marcar secuencias diana que son de abundancia baja. La mayoría de los métodos actuales tienen una eficacia limitada en la captura de moléculas y requieren una gran cantidad de moléculas de entrada para lograr una sensibilidad y precisión adecuadas. Estos obstáculos son particularmente problemáticos en la detección temprana del cáncer o en el seguimiento de pacientes con cánceres en etapa temprana. En un individuo normal, solo se encuentran entre 3000 y 5000 copias del genoma en un mililitro de plasma. Dentro de eso, las apariciones de una copia del genoma que contiene una mutación del cáncer pueden ser tan bajas como 1 en 10 000 copias del genoma de tipo natural. En combinación con los factores de distorsión de la PCR y la secuenciación, la detección temprana de una mutación que causa cáncer está tratando de encontrar la proverbial aguja en una granja de heno en lugar de un solo pajar. Por consiguiente, existe la necesidad de mejorar la identificación y detección de variantes de abundancia baja en el genoma.

Sumario de la invención

La invención se dirige a métodos para añadir marcadores oligonucleótidos a una secuencia de ácido nucleico y para producir una biblioteca de secuenciación y se dirige a una biblioteca de secuenciación que comprende secuencias de ácido nucleico marcadas con un oligonucleótido adaptador en el extremo 3'.

30 Los métodos para añadir marcadores oligonucleótidos a una secuencia de ácido nucleico en una muestra comprenden ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico, en donde el oligonucleótido adaptador comprende un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle, un grupo hidroxilo en el extremo 3', un fosfato en el extremo 5', una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico y una región aleatoria en el bucle que comprende el código de barras molecular.

35 Los métodos para producir una biblioteca de secuenciación comprenden ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico para producir una secuencia híbrida que comprende la secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador, en donde el oligonucleótido adaptador comprende: un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle, un grupo hidroxilo en el extremo 3', un fosfato en el extremo 5', una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico y una región aleatoria en el bucle que comprende el código de barras molecular; y amplificar la secuencia híbrida con un primer conjunto de cebadores. En algunas implementaciones, el primer conjunto de cebadores comprende un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra universal inverso, en donde el cebador de código de barras de muestra universal inverso comprende un código de barras de muestra. En estas implementaciones, la amplificación de la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia de código de barras. En otras implementaciones, el primer conjunto de cebadores comprende un cebador específico de diana y un cebador universal inverso. En estas implementaciones, amplificar la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia específica de diana, y los métodos comprenden además amplificar la secuencia específica de diana con un segundo conjunto de cebadores que comprenden un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra para producir una secuencia de código de barras. En algunos aspectos, los métodos comprenden además amplificar la secuencia específica de diana con un cebador específico de diana anidado y el cebador universal antes de la amplificación con el segundo conjunto de cebadores.

55 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender una etapa de preamplificación para aumentar el número de muestras. Por lo tanto, antes de la etapa de ligado, los métodos comprenden reasociar un primer cebador universal con la secuencia de ácido nucleico en la muestra, en donde el primer cebador universal es complementario a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y después amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico.

El ácido nucleico de la muestra se puede fraccionar. Los métodos pueden comprender limpiar después de cada etapa de amplificación con exonucleasa y fosfatasa alcalina.

En otros aspectos, la invención se refiere a un método para añadir marcadores oligonucleótidos a una secuencia de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método las etapas de: reasociar un primer cebador universal con la secuencia de ácido nucleico en la muestra, en donde el primer cebador universal es complementaria a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico; amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico; y ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico, en donde el oligonucleótido adaptador comprende: un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle; un grupo hidroxilo en el extremo 3'; un fosfato en el extremo 5'; una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular.

En otros aspectos más, la invención se refiere a un método para producir una biblioteca de secuenciación, comprendiendo el método las etapas de: reasociar un primer cebador universal con la secuencia de ácido nucleico en la muestra, en donde el primer cebador universal es complementario a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico; amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico; ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico para producir una secuencia híbrida que comprende la secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador, en donde el oligonucleótido adaptador comprende: un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle; un grupo hidroxilo en el extremo 3'; un fosfato en el extremo 5'; una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular; y amplificar la secuencia híbrida con un primer conjunto de cebadores.

En una realización, la invención se dirige a un método para producir una biblioteca de secuenciación, comprendiendo el método las etapas de: ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico para producir una secuencia híbrida que comprende una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador, en donde el oligonucleótido adaptador comprende: un apareamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle; un grupo hidroxilo en el extremo 3'; un fosfato en el extremo 5'; una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular; y amplificar la secuencia híbrida con un primer conjunto de cebadores.

En algunas realizaciones, el primer conjunto de cebadores comprende un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra universal inverso y el cebador de código de barras de muestra universal inverso comprende un código de barras de muestra; y la amplificación de la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia con código de barras.

En otras realizaciones, el primer conjunto de cebadores comprende un cebador específico de la diana y un cebador universal inverso y la amplificación de la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia específica de la diana; y el método comprende además amplificar la secuencia específica de la diana con un segundo conjunto de cebadores que comprenden un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra para producir una secuencia de código de barras.

En un aspecto, el cebador universal inverso comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, el cebador universal directo comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

En ciertos aspectos, el cebador de código de barras de muestra comprende una secuencia de adaptador 5', una región 3' complementaria al cebador universal inverso y una secuencia de índice de muestra entre la secuencia de adaptador 5' y la región 3' complementaria al cebador universal inverso.

En una realización, el cebador de código de barras de muestra comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

En otras realizaciones más, el método comprende además amplificar la secuencia específica de la diana con un cebador específico de la diana anidado y el cebador universal antes de la amplificación con el segundo conjunto de cebadores.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico en la muestra se fracciona. En una realización, el ácido nucleico en la muestra se fracciona en fragmentos entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 500 pb. En otra realización, el ácido nucleico de la muestra se fracciona en fragmentos entre aproximadamente 250 pb y aproximadamente 350 pb. En otra realización más, el ácido nucleico en la muestra se fracciona en fragmentos de aproximadamente 300 pb.

En algunos aspectos, el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre -20°C y 40°C. En una realización, el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre 0°C y 40°C. En otro aspecto, el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre 10°C y 30°C.

En algunas implementaciones, el método comprende además limpiar la secuencia amplificada con exonucleasa y fosfatasa alcalina después de cada etapa de amplificación.

En otras implementaciones, el oligonucleótido adaptador se liga al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico con una ADN ligasa.

- 5 En un aspecto, el oligonucleótido adaptador comprende además un segmento protuberante 3' y el segmento protuberante 3' comprende la región complementaria a la secuencia de ácido nucleico. En otro aspecto, la región complementaria a la secuencia de ácido nucleico es complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico.

10 En una realización, el emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle del oligonucleótido adaptador forma un tallo de al menos 6 pares de nucleótidos de longitud. En otra realización, el tallo comprende al menos 1 par mal emparejado.

En un aspecto, el emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle del oligonucleótido adaptador forma un bucle. En otra realización, el bucle del oligonucleótido adaptador comprende una región de unión al cebador para un segundo cebador universal.

15 La descripción también se refiere a una biblioteca de secuenciación que comprende una secuencia de ácido nucleico marcada con un oligonucleótido adaptador en el extremo 3' producido con los métodos descritos en el presente documento.

Las secuencias de ácido nucleico comprenden regiones de unión para un par de cebadores universales y la amplificación con el par de cebadores universales produce un amplicón que comprende una secuencia de interés para la biblioteca de secuenciación.

20 En la descripción que sigue se expondrán objetivos, ventajas y características novedosas adicionales o serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de los dibujos y la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 representa la estructura genérica de un oligonucleótido adaptador de ejemplo.

25 Las figs. 2A-C representan esquemas de los métodos de marcado molecular de ácidos nucleicos. La fig. 2B representa una variación que usa cebadores específicos de la diana en comparación con el esquema de la fig. 2A. La fig. 2C representa una variación en cómo se une el código de barras de muestra en comparación con el esquema de la fig. 2A.

La fig. 3 representa los resultados esperados del procedimiento de marcado de ácido nucleico mostrado en las figs. 2A-C.

30 La fig. 4 es un esquema de las etapas descritas en el Ejemplo A.

La fig.5 representa el resultado observado del protocolo del Ejemplo A.

Los títulos usados en las figuras no deben interpretarse como que limitan el alcance de las reivindicaciones.

Descripción detallada

35 En la siguiente descripción, y con fines explicativos, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de los diversos aspectos de la invención. Sin embargo, los expertos en las técnicas relevantes entenderán que la presente invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos. Hay que indicar que existen muchas configuraciones, dispositivos y tecnologías diferentes y alternativos a los que se pueden aplicar las invenciones descritas. El alcance completo de las invenciones no se limita a los ejemplos que se describen a continuación.

40 Las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una etapa" incluye la referencia a una o más de dichas etapas. A menos que se indique específicamente, se pretende que las palabras y frases en la memoria descriptiva y las reivindicaciones tengan su significado corriente, ordinario y habitual para los expertos en las técnicas aplicables.

45 El término "tallo-bucle" como se usa en el presente documento en relación con las estructuras de ácidos nucleicos se refiere a una estructura formada cuando dos regiones de la misma cadena de ácidos nucleicos se pueden emparejar para formar una doble hélice que termina en un bucle no emparejado. Las dos regiones son generalmente complementarias cuando se leen en direcciones opuestas. Esta estructura también se conoce como horquilla o bucle en horquilla.

50 Como se usa en el presente documento, el término "complementario" en referencia a secuencias de ácidos nucleicos se refiere a secuencias de bases de ácidos nucleicos que pueden formar una estructura de doble cadena por

emparejamiento de pares de bases. El grado de complementariedad entre las secuencias no tiene que ser de 100%, por ejemplo, el grado de complementariedad puede ser al menos 95%, al menos 90% o al menos 85%.

5 Como se usa en el presente documento, una "mella" en una cadena es una rotura en el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos en la cadena principal en una de las cadenas de un dúplex entre una cadena homsentido y una antisentido.

Como se usa en el presente documento, un "hueco" en una cadena es una rotura entre dos nucleótidos en la cadena sencilla.

10 La invención se refiere a métodos de marcado molecular de ácidos nucleicos, por ejemplo, para la preparación de bibliotecas de secuenciación, y bibliotecas de secuenciación especialmente marcadas. Así pues, el método también se refiere a las bibliotecas de secuencias marcadas especiales. La biblioteca de secuenciación y los métodos son particularmente útiles para el análisis informático de secuencias diana que se encuentran en fracciones bajas en mezclas complejas de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN sin células en muestras biológicas, tales como plasma u orina. Otra mezcla compleja de secuencias de ácidos nucleicos puede ser una muestra forense degradada de entrada baja.

15 En el contexto de las aplicaciones del cáncer, la identificación, cuantificación y detección de mutaciones cancerosas en el plasma (con o sin conocimiento de mutaciones cancerosas específicas del paciente a priori) se puede usar para el cribado y la detección temprana del cáncer, el seguimiento de la respuesta al tratamiento y la evolución, estratificación molecular y evaluación de la evolución clonal y resistencia al tratamiento.

20 Aparte del cáncer, tal como en las enfermedades no malignas, esta invención permite la detección de cualquier variante genómica en la circulación o en el tejido. Además, permitirá la identificación, detección y cuantificación de variantes en cualquier mezcla compleja de muestras humanas o no humanas, tales como patógenos. Esta invención se puede aumentar de escala para la multiplexación de modo que sea posible la secuenciación de múltiples regiones genómicas usando este enfoque, que permite la identificación, detección y cuantificación simultáneas de múltiples mutaciones. También se puede personalizar fácilmente y se puede implementar ad hoc o desarrollar para centrarse en escenarios específicos (por ejemplo, diagnósticos de cáncer usando un panel de genes).

25 Los métodos de marcado de secuencias de ácidos nucleicos comprenden el ligado de un oligonucleótido adaptador. La secuencia de ácido nucleico en la muestra puede haber sido fraccionada, por ejemplo, en fragmentos de entre 100 y 500 pb, entre 100 y 300 pb, entre 250 y 350 pb, o aproximadamente 300 pb. Los métodos pueden comprender además una etapa de amplificación lineal, y la etapa de amplificación lineal puede tener lugar antes de la etapa de ligado. Para preparar una biblioteca de secuenciación, los métodos comprenden además etapas basadas en PCR (véanse las figs. 2A-C). Los métodos se basan en la etapa de amplificación lineal y/o las etapas basadas en PCR para aumentar la eficiencia de conversión de moléculas molde en una biblioteca lista para secuenciar.

1. Amplificación lineal.

35 La etapa de amplificación lineal comprende reasociar un cebador con las secuencias de ácido nucleico en la muestra y amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico. La etapa de amplificación lineal puede comprender al menos 5 ciclos, al menos 6 ciclos, al menos 7 ciclos, al menos 8 ciclos, al menos 9 ciclos, al menos 10 ciclos, al menos 11 ciclos, al menos 12 ciclos, al menos 13 ciclos, al menos 14 ciclos o al menos 15 ciclos. La etapa de amplificación lineal puede comprender no más de 15 ciclos o no más de 10 ciclos. Por ejemplo, la etapa de amplificación lineal comprende aproximadamente 10 ciclos de amplificación.

40 El cebador es complementario a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico (véase PCR1 de la fig. 2A y la fig. 4). Por ejemplo, la secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico es una región próxima a la región de interés en la secuencia de ácido nucleico.

2. Ligado con el oligonucleótido adaptador.

45 El código de barras molecular o marcador se introduce en las secuencias de ácido nucleico por ligado con un oligonucleótido adaptador. El nucleótido adaptador se liga al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico o al extremo 3' de la copia amplificada linealmente de la secuencia de ácido nucleico. En algunas implementaciones, la temperatura de ligado es entre -20°C y 40°C, entre 10°C y 40°C, o entre 10°C y 30°C.

50 El oligonucleótido adaptador puede comprender una estructura de horquilla. El oligonucleótido adaptador puede comprender una región de tallo constante, un marcador de molécula aleatoria, una secuencia para unir un cebador universal y una secuencia complementaria aleatoria. El marcador molecular aleatorio puede ser un oligonucleótido aleatorio. El marcador molecular aleatorio puede ser de al menos 6 nucleótidos de longitud, al menos 7 nucleótidos de longitud, al menos 8 nucleótidos de longitud, al menos 9 nucleótidos de longitud o al menos 10 nucleótidos de longitud, mientras que la secuencia complementaria aleatoria es de al menos 4 nucleótidos de longitud, al menos 5 nucleótidos de longitud, al menos 6 nucleótidos de longitud, al menos 7 nucleótidos de longitud o al menos 8 nucleótidos de longitud. El marcador molecular aleatorio no puede ser de más de 9 nucleótidos de longitud, no más de 10 nucleótidos de longitud, no más de 11 nucleótidos de longitud o no más de 12 nucleótidos de longitud, mientras

que la secuencia complementaria aleatoria no es de más de 6 nucleótidos de longitud, no más de 7 nucleótidos de longitud o no más de 8 nucleótidos de longitud. El marcador molecular aleatorio puede ser de 9 nucleótidos de longitud, mientras que la secuencia complementaria aleatoria es de 6 nucleótidos de longitud, como se muestra en la fig. 1.

5 El oligonucleótido adaptador puede comprender un fosfato en el extremo 5'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido adaptador comprende un extremo 5' de ADN y un extremo 3' de ARN.

Para reducir la dimerización del adaptador de horquilla consigo mismo durante el ligado, el extremo 3' del oligonucleótido adaptador se puede bloquear usando una modificación de oligonucleótido no extensible o escindible por polimerasa, por ejemplo, un espacio C3.

10 El extremo 3' del oligonucleótido adaptador puede comprender un segmento protuberante después de la secuencia complementaria aleatoria para mejorar la estabilidad. El segmento protuberante 3' puede comprender la región complementaria a la secuencia de ácido nucleico. Así pues, la hibridación entre el oligonucleótido adaptador y la secuencia de ácido nucleico se puede ligar por medios enzimáticos o químicos.

15 La región protuberante 3' puede comprender al menos 1 nucleótido, al menos 2 nucleótidos, al menos 3 nucleótidos, al menos 4 nucleótidos, al menos 5 nucleótidos, al menos 6 nucleótidos, al menos 7 nucleótidos, al menos 8 nucleótidos, al menos 9 nucleótidos, al menos 10 nucleótidos, al menos 11 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 35 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos que son complementarios a las secuencias que se encuentran en la secuencia de ácido nucleico cuando la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador se hibridan entre sí. De esta manera, la región protuberante 3' del oligonucleótido adaptador se considera como la región del oligonucleótido adaptador que se une a la región 3' de la secuencia de ácido nucleico.

20 La región protuberante 3' puede comprender al menos 1 nucleótido, preferiblemente al menos 2 nucleótidos, preferiblemente al menos 3 nucleótidos, preferiblemente al menos 4 nucleótidos, y preferiblemente al menos 5 nucleótidos que están mal emparejados con 25 nucleótidos encontrados en la secuencia de ácido nucleico cuando la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador se hibridan entre sí.

25 La hibridación entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador puede formar una estructura que comprende una mella, en donde la mella puede estar ligada por medios enzimáticos o químicos. La hibridación entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador puede formar una estructura que comprende un hueco, en donde el hueco puede estar ligado por medios enzimáticos o químicos.

30 La hibridación entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador puede formar una estructura de tallo-bucle. La estructura de tallo es estable a temperaturas tan altas como 35°C, tan altas como 40°C, tan altas como 45°C, tan altas como 50°C, tan altas como 55°C, tan altas como 60°C, tan altas como 65°C, tan altas como 70°C, tan altas como 75°C, tan altas como 80°C, tan altas como 85°C, o más. Por consiguiente, el diseño del oligonucleótido adaptador debe tener cuidado de usar una secuencia que asegure que el tallo-bucle formado es termoestable.

35 El oligonucleótido adaptador es un oligonucleótido monocatenario que tiene una parte bicatenaria formada por dos segmentos autocomplementarios, que opcionalmente tiene un bucle en un extremo y una cadena sencilla protuberante corta en el otro. Por lo tanto, para los propósitos de la presente invención, una horquilla se define como una región de doble hélice formada por emparejamiento de bases de nucleótidos entre secuencias adyacentes, invertidas, al menos parcialmente complementarias en un ácido nucleico monocatenario, preferiblemente dentro del mismo ácido nucleico de una cadena. La estructura del tallo preferiblemente mantiene su estructura antes y en condiciones adecuadas para la hibridación entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador. De esta manera, la mella o hueco formado por la hibridación entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador se puede fijar mediante ligado. La molécula donadora se puede diseñar para que también retenga la estructura de tallo en condiciones en las que la mella o hueco se ligan por medios enzimáticos o químicos. En esta situación, se crea una molécula híbrida por el ligado entre la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador.

45 La estructura del tallo intramolecular preferiblemente mantiene la estructura del tallo en condiciones adecuadas para la hibridación entre la molécula donadora y aceptora. Por ejemplo, la estructura del tallo se diseña para mantener su estructura en condiciones en las que la molécula aceptora y donadora se hibridan.

50 La estructura del tallo intramolecular del oligonucleótido adaptador puede tener una estabilidad reducida donde se despliega la estructura del tallo. De esta manera, la estructura del tallo se puede diseñar de modo que la estructura del tallo pueda liberarse de su emparejamiento de bases intramoleculares y se parece más a una molécula lineal. El oligonucleótido adaptador se puede diseñar donde la liberación de la estructura del tallo intramolecular se favorece termodinámicamente frente a la estructura de tallo intramolecular. Por ejemplo, después del ligado del oligonucleótido adaptador y la secuencia de ácido nucleico, algunas implementaciones comprenden amplificar el producto de ácido nucleico ligado. La estructura del tallo-bucle no afecta a la etapa de amplificación, porque la estructura del tallo intramolecular se puede deshacer elevando la temperatura o añadiendo un desnaturalizante químico. Una vez que se deshace la estructura del tallo intramolecular, se puede usar una sonda o cebador para secuenciar o amplificar al menos una parte de la secuencia presente en la molécula aceptora.

5 El tallo puede comprender al menos 3 pares de nucleótidos, al menos 4 pares de nucleótidos, al menos 5 pares de nucleótidos, al menos 6 pares de nucleótidos, al menos 7 pares de nucleótidos, al menos 8 pares de nucleótidos, al menos 9 pares de nucleótidos, al menos 10 pares de nucleótidos, al menos 11 pares de nucleótidos, al menos 12 pares de nucleótidos, al menos 13 pares de nucleótidos, al menos 14 pares de nucleótidos, al menos 15 pares de nucleótidos, al menos 20 pares de nucleótidos, al menos 25 pares de nucleótidos, al menos 30 pares de nucleótidos, al menos 35 pares de nucleótidos, al menos 40 pares de nucleótidos, al menos 45 pares de nucleótidos, al menos 50 pares de nucleótidos, al menos 55 pares de nucleótidos, al menos 60 pares de nucleótidos, al menos 65 pares de nucleótidos, al menos 70 pares de nucleótidos, al menos 75 pares de nucleótidos.

10 La región del tallo puede comprender al menos 1 par mal emparejado, al menos 2 pares mal emparejado, al menos 3 pares mal emparejados, al menos 4 pares mal emparejados, al menos 5 pares mal emparejados, al menos 5 pares mal emparejados, al menos 6 pares mal emparejados, al menos 7 pares mal emparejados, al menos 8 pares mal emparejados, al menos 9 pares mal emparejados, al menos 10 pares mal emparejados, al menos 11 pares mal emparejados, al menos 12 pares mal emparejados, al menos 13 pares mal emparejados, al menos 14 pares mal emparejados, al menos 15 pares mal emparejados, al menos 20 pares mal emparejados, al menos 25 pares mal emparejados, al menos 30 pares mal emparejados, al menos 35 pares mal emparejados, al menos 40 pares mal emparejados, al menos 45 pares mal emparejados, o al menos 50 pares mal emparejados.

La cantidad de pares mal emparejados en el tallo debe ser suficiente para hacer que la estructura del tallo sea inestable a una temperatura alta de al menos 60°C, al menos 65°C, al menos 70°C, al menos 75°C, al menos 80°C, al menos 85°C, al menos 90°C, al menos 95°C, al menos 96°C, al menos 97°C, al menos 98°C, o al menos 99°C.

20 La estructura de bucle del oligonucleótido adaptador puede comprender cualquier número de nucleótidos. En una realización, la estructura del bucle comprende al menos 1 nucleótido, al menos 2 nucleótidos, al menos 3 nucleótidos, al menos 4 nucleótidos, al menos 5 nucleótidos, al menos 6 nucleótidos, al menos 7 nucleótidos, al menos 8 nucleótidos, al menos 9 nucleótidos, al menos 10 nucleótidos, al menos 11 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, 20 al menos 15 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos al menos 35 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos. Preferiblemente, el bucle comprende aproximadamente 2-30 nucleótidos.

El ligado y la hibridación se realizan usando ligado mediante ciclos de temperatura que varían en el intervalo de -20°C a 40°C, por ejemplo, de -20°C a 4°C, de -20°C a 0°C, de 20°C a 40°C, o de 22°C a 37°C.

3. Etapas basadas en PCR para generar una biblioteca de secuenciación.

30 Se usan cebadores universales y/o específicos de la diana para amplificar y enriquecer una secuencia de ácido nucleico de interés. Se usan múltiples rondas de PCR para lograr el enriquecimiento adecuado y la selección de la secuencia de ácido nucleico diana mientras se minimizan las lecturas no específicas fuera de la diana y los dímeros del adaptador. La ronda de PCR puede comprender al menos 15 ciclos, al menos 20 ciclos o al menos 25 ciclos. La etapa de amplificación lineal puede comprender no más de 35 ciclos o no más de 30 ciclos. Por ejemplo, la etapa de amplificación lineal comprende entre 20 y 30 ciclos de amplificación, tal como 30 ciclos. Se usan rondas adicionales de PCR para introducir índices específicos de la muestra para permitir un uso óptimo de la secuenciación secuencia abajo. Se puede usar una estrategia de PCR anidada para enriquecer las lecturas en la diana y reducir la amplificación no específica fuera de la diana y los dímeros del adaptador.

40 En los métodos para cribar una secuencia de interés en un genoma, los métodos comprenden además detectar la secuencia de interés en la biblioteca de secuenciación generada.

La descripción también se refiere a una biblioteca de secuenciación que comprende secuencias de ácido nucleico marcadas con un oligonucleótido adaptador y regiones que son sitios de unión para un par de cebadores universales.

45 Está bien establecido en la técnica que, cuando se realizan diferentes tipos de reacciones con ácidos nucleicos, por ejemplo, una PCR después de una reacción de ligado, a veces es necesario limpiar la muestra después de cada reacción antes de continuar a la siguiente. Como se muestra en la fig. 4, la adición de fosfatasa alcalina asegura una reacción de ligado más eficiente. La inactivación por calor también asegura el final completo de la reacción de ligado. Los métodos para limpiar un producto de PCR están bien establecidos en el campo, y un ejemplo es el uso de una combinación de exonucleasa y fosfatasa alcalina.

Ejemplos

50 Ejemplo A: Protocolo para generar una biblioteca de secuenciación con códigos de barras moleculares

1. Tomar muestra de ADN fraccionado D6 (2 muestras repetidas y 1 blanco para EXP266b y lo mismo para EXP266c). D6 en 10 ng/μl (fraccionado previamente usando sonicación a fragmentos de ~300 pb). El contenido de cada tubo de ensayo se refleja en la Tabla 1.

Tabla 1.

ES 2 870 626 T3

Tubo	Entrada	Volumen de muestra (µl)	Agua (µl)	Volumen antes de AP (µl)	AP + tampón*	Muestra
1	2	2	5	7.0	1 + 1	nº D6
2	2	2	5	7.0	1 + 1	nº D6
3	-	0	7	7.0	1 + 1	nº blanco

*Tampón FastAP y enzima añadidos para formar una mezcla maestra de 6.6 µl (3.3 y 3.3 cada uno).

2. Desnaturalizar el ADN por incubación a 37°C durante 10 minutos y después a 95°C durante 3 minutos. Inmediatamente después del final de la incubación a 95°C, incubar en un baño de agua helada. Mientras está en el baño de agua helada, añadir el oligo (0.5 µl de disolución madre 100 µM) y la mezcla maestra (11 µl de la receta descrita en la tabla 2) a cada tubo.

Tabla 2

Reactivos	20 µl de reacción	Por reacción	mm 3x (+10%)
2X tampón de ADN ligasa T7	1x	10	33
ADN ligasa T7	5U	1	3.3
		20	

3. Ligar ADNmc por incubación en 40 ciclos de 10°C durante un minuto y 30°C durante un minuto. Estos productos de ligado se pueden almacenar a 4°C hasta el siguiente etapa.

4. Añadir FastAP e incubar a 37°C durante 30 minutos. La cantidad de AP y tampón añadidos para cada tubo se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Tubo	Volumen antes de AP (µl)	AP + tampón*	Muestra
1	7.0	1 + 1	nº D6
2	7.0	1 + 1	nº D6
3	7.0	1 + 1	nº blanco

*Tampón FastAP y enzima añadidos para formar una mezcla maestra de 13.5 µl (6.7 y 6.7 cada uno).

5. Se usan perlas magnéticas para limpiar la reacción de ligado (relación 1.8 en volumen de perlas a ADN). La reacción total de la reacción de limpieza por tubo es de 25 µl. Las etapas específicas para limpiar con perlas magnéticas son las siguientes:

a. Preparar etanol al 85% reciente - 850 µl de etanol al 100% + 150 µl de agua (si es necesario) - se necesitará un total de 360 µl x 4 reacciones = 1440 ~ 2 ml o 2x preparaciones de 1 ml.

b. Añadir 45 µl de perlas magnéticas bien resuspendidas y mezclar bien con pipeta.

c. Incubar el ADN y las perlas durante 5 minutos a temperatura ambiente.

d. Poner las perlas + ADN en el dispositivo magnético y esperar hasta que se recojan todas las perlas y el líquido sobrenadante sea transparente.

e. Retirar el líquido sobrenadante con cuidado (no retirar las perlas).

f. Mientras está en el dispositivo magnético, lavar 2x con etanol al 85% añadiendo 180 µl de etanol al 85%, esperar 30 segundos y aspirar

g. Golpear el dispositivo magnético para recoger todo el etanol en el fondo de los tubos y retirar el etanol sobrante □ Dejar secar a t.a. durante no más de 5 minutos.

h. Añadir 20 µl de agua y mezclar bien con una pipeta.

i. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

j. Volver a poner los tubos en el dispositivo magnético durante unos minutos hasta que se recojan todas las perlas. Y transferir el producto limpio a un nuevo conjunto de tubos (o una nueva tira de tubos). Recuperar ~17.0 µl por reacción.

6. La primera PCR (denominada PCR1 en la fig. 4) se realiza usando los cebadores representados en la Tabla 4. La mezcla maestra para la reacción de PCR se prepara de acuerdo con la Tabla 5. La Tabla 6 describe las condiciones de los ciclos para la primera PCR.

Tabla 4

MB_BRAF_v600_F Cebador directo específico de la diana	5'- <u>CGC TCT TCC GAT CTC TGA TCC AGA CAA CTG TTC</u> AAA CTG A -3' (SEQ ID NO:1) Subrayado: segmento protuberante 5' universal para introducir adaptador No subrayado: cebador específico de la diana En BLAT, el cebador se alinea perfectamente con otra región en el cromosoma X además de BRAF en el chr 7.
Inverso-universal-1 Cebador universal inverso	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAC-3' (SEQ ID NO: 2)
Ligado de Oligo nº 2 adaptador de horquilla	/5Phos/TGC TCT TTG (N1:25252525)(N1)(N1) (N1)(N1)(N1) (N1)(N1)(N1) GTC AGA TCG GAA GAG CA(N1) (N1)(N1)(N1) (N1)(N1)C TGC CCA TAG AG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 3) longitud extra prevista: 9 + 8 = 17 pb

Tabla 5

MM nº 1	Unidades	Conc. inicial	Conc. final	Vol (µl) por reacción
Sonda Kapa Fast	X	2	1	5.0
Mezcla maestra				
MB_BRAF_v600_F	µM	10	0.6	0.6
Inverso-universal-1	µM	10	0.6	0.6
Agua	µM			0.13
Producto de ligado	ng			3.7

5 Tabla 6

Temp (°C)	Tiempo del ciclo	nº de ciclos
95	2 min	1
95	15 s	10
60	20 s	
72	15 s	
4	mantenimiento	

7. La limpieza con ExoSAP se lleva a cabo usando 10 µl de producción de PCR y 4 µl de ExoSAP-IT para 1 repetición de cada uno de los anteriores. La incubación con ExoSAP se configuró según las instrucciones del fabricante, que es incubación a 37°C durante 30 minutos seguida de incubación a 85°C durante 15 minutos.

10 8. La segunda reacción de PCR (denominada PCR2 en la fig. 4) se realiza usando los cebadores representados en la Tabla 7. El contenido de cada reacción de PCR se describe en la Tabla 8. La Tabla 9 describe las condiciones de los ciclos para la primera PCR.

Tabla 7

F_universal □ (Las secuencias universales se basaban en el protocolo de secuenciación dirigida RAINDANCE™ debido a la facilidad de acceso - el protocolo no se basa en estas secuencias y las puede cambiar sin consecuencias)	5'- <u>CGC TCT TCC GAT CTC TGA TCC AGA CAA CTG TTC</u> AAA CTG A -3' (SEQ ID NO: 1)
R-Código de barras Cebador de código de barras de muestra (basado en la estructura y protocolo)	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CGTGATGTGACT</u> <u>GGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTGAC</u> -3' (SEQ ID NO: 4) Subrayado: igual que Inverso-universal-1

ES 2 870 626 T3

RAINANCE™, pero se puede cambiar a secuencias estándar de ILLUMINA®).	<p>Negrita y cursiva: índice de muestra introducido [como ejemplo, cambiado para cada muestra]</p> <p>Normal: secuencia de adaptador adicional (compatible con PE7 para secuenciación ILLUMINA®)</p>
---	--

Tabla 8

MM nº 1	Vol (µl) por reacción	Total µl
Kapa	12.5	12.5
F-universal	1.25	1.25
R-Código de barras	1.25	1.25
Producto PCR1	10	10

Tabla 9

Temp (°C)	Tiempo del ciclo	nº de ciclos
95	2 min	1
95	15 s	30
60	20 s	
72	15 s	
4	mantenimiento	

- 5
9. Se realiza otra limpieza con ExoSAP. Esta vez se usan 25 µl de producción de PCR y 10 µl de ExoSAP-IT por reacción. La incubación con ExoSAP se configuró según las instrucciones del fabricante, que es incubación a 37°C durante 30 minutos seguida de incubación a 85°C durante 15 minutos. Los productos de la limpieza se pueden almacenar a 4°C hasta que se realice la siguiente etapa.
- 10
10. Se usan perlas magnéticas para limpiar los productos de la PCR (relación 1.2 en volumen de perlas a ADN). El procedimiento específico es el mismo que el descrito en la etapa 5 pero con la cantidad de perlas ajustada. La etapa de elución se ajusta a 16 µl, en el caso de aproximadamente 13 µl por reacción.
11. La cuantificación de la biblioteca Kappa usando qPCR se realiza de acuerdo con el protocolo del fabricante.
12. El control de calidad de la biblioteca se realiza usando el bioanalizador.
- 15
13. La biblioteca se secuencía usando MiSeq. Todas las muestras se ponen a 4 nM. El conjunto contiene 4 nM de cada muestra incluida para MiSeq con un volumen de 10 µl por muestra. Para la muestra del blanco, se puso 1 µl en el conjunto.

Ejemplo B: Tabla de resumen

Tabla 10

		265b	265c
Ligado	Fosfatasa alcalina	✓	✓
	Desnaturalización	✓	✓
	Ligado	✓	✓
	Fosfatasa alcalina	✓	✓
	Limpieza con perlas magnéticas (1.8x)	✓	✓
	Inactivación con calor (85°C, 15 min)	✓	✓
PCR1 (10 ciclos)	Reasociación a 60°C; cebador de BRAF	Reasociación a 60°C; cebador de BRAF	
Exosap (exonucleasa + fosfatasa alcalina)	✓	✓	
PCR2 (30 ciclos)	✓	✓	
Exosap	✓	✓	
Limpieza con perlas magnéticas (1.2x)	✓	✓	
Cuantificación de biblioteca kappa	✓	✓	
Bioanalizador	✓	✓	
MiSeq	✓	✓	

20

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Translational Genomics Research Institute
 <120> Métodos de marcado molecular y bibliotecas de secuenciación
 <130> 91482.216

10 <150> 62/340,954
 <151> 24-05-2016
 <160> 4
 <170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 1
 cgctcttccg atctctgatc cagacaactg ttcaactga 40

30 <210> 2
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 2
 gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctgac 37

40 <210> 3
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Adaptador de horquilla

45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(18)
 <223> n es cualquier nucleótido

50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (36)..(41)
 <223> n es cualquier nucleótido

55 <400> 3
 tgctctttgn nnnnnnnngt cagatcggaa gagcannnnn nctgcccata gag 53

60 <210> 4
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> cebador de código de barras

ES 2 870 626 T3

<400> 4

caagcagaag acggcatacg agatcgtgat gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg 60

atctgac 67

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para añadir marcadores oligonucleótidos a una secuencia de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 reasociar un primer cebador universal con la secuencia de ácido nucleico en la muestra, en donde el primer cebador universal es complementario a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico;
- amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico; y
- ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico, en donde el oligonucleótido adaptador comprende:
 - un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle;
 - 10 un grupo hidroxilo en el extremo 3';
 - un fosfato en el extremo 5';
 - una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y
 - una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular.

2. Un método para producir una biblioteca de secuenciación, comprendiendo el método las etapas de:

- 15 reasociar un primer cebador universal con la secuencia de ácido nucleico en la muestra, en donde el primer cebador universal es complementario a una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico;
- amplificar linealmente la secuencia de ácido nucleico;
- ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico para producir una secuencia híbrida que comprende la secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador, en donde el oligonucleótido adaptador comprende:
 - 20 un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle;
 - un grupo hidroxilo en el extremo 3';
 - un fosfato en el extremo 5';
 - una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y
 - 25 una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular; y
 - amplificar la secuencia híbrida con un primer conjunto de cebadores.

3. Un método para producir una biblioteca de secuenciación, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 ligar un oligonucleótido adaptador al extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico para producir una secuencia híbrida que comprende una secuencia de interés en la secuencia de ácido nucleico y el oligonucleótido adaptador, en donde el oligonucleótido adaptador comprende:
 - un emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle;
 - un grupo hidroxilo en el extremo 3';
 - un fosfato en el extremo 5';
 - una región aleatoria complementaria a la secuencia de ácido nucleico; y
 - 35 una región aleatoria en el bucle que comprende un código de barras molecular; y
 - amplificar la secuencia híbrida con un primer conjunto de cebadores.

4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde el primer conjunto de cebadores comprende un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra universal inverso y el cebador de código de barras de muestra universal inverso comprende un código de barras de muestra; y

- 40 en donde la amplificación de la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia de código de barras.

5. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde el primer conjunto de cebadores comprende un cebador específico de la diana y un cebador universal inverso y la amplificación de la secuencia híbrida con el primer conjunto de cebadores produce una secuencia específica de la diana; y
- 5 en donde el método comprende además amplificar la secuencia específica de la diana con un segundo conjunto de cebadores que comprende un cebador universal directo y un cebador de código de barras de muestra para producir una secuencia de código de barras.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el cebador universal inverso comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.
- 10 7. El método de la reivindicación 5, en donde el cebador universal directo comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
8. El método de la reivindicación 5, en donde el cebador de código de barras de muestra comprende una secuencia de adaptador 5', una región 3' complementaria al cebador universal inverso y una secuencia de índice de muestra entre la secuencia de adaptador 5' y la región 3' complementaria al cebador universal inverso.
- 15 9. El método de la reivindicación 8, en donde el cebador de código de barras de muestra comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.
10. El método de la reivindicación 5, que comprende además amplificar la secuencia específica de la diana con un cebador específico de la diana anidado y el cebador universal antes de la amplificación con el segundo conjunto de cebadores.
11. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico de la muestra se fracciona.
- 20 12. El método de la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico de la muestra se fracciona en fragmentos entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 500 pb.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico de la muestra se fracciona en fragmentos entre aproximadamente 250 pb y aproximadamente 350 pb.
- 25 14. El método de la reivindicación 13, en donde el ácido nucleico de la muestra se fracciona en fragmentos de aproximadamente 300 pb.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre -20°C y 40°C.
16. El método de la reivindicación 15, en donde el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre 0°C y 40°C.
- 30 17. El método de la reivindicación 16, en donde el ligado del oligonucleótido adaptador al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico tiene lugar entre 10°C y 30°C.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende limpiar la secuencia amplificada con exonucleasa y fosfatasa alcalina después de cada etapa de amplificación.
- 35 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el oligonucleótido adaptador se liga al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico con una ADN ligasa.
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el oligonucleótido adaptador comprende además un segmento protuberante 3' y el segmento protuberante 3' comprende la región complementaria a la secuencia de ácido nucleico.
- 40 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región complementaria a la secuencia de ácido nucleico es complementaria al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle del oligonucleótido adaptador forma un tallo de al menos 6 pares de nucleótidos de longitud.
23. El método de la reivindicación 22, en donde el tallo comprende al menos 1 par mal emparejado.
- 45 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el emparejamiento de bases de nucleótidos intramoleculares de tallo-bucle del oligonucleótido adaptador forma un bucle.
25. El método de la reivindicación 24, en donde el bucle del oligonucleótido adaptador comprende una región de unión al cebador para un segundo cebador universal.

FIG. 1

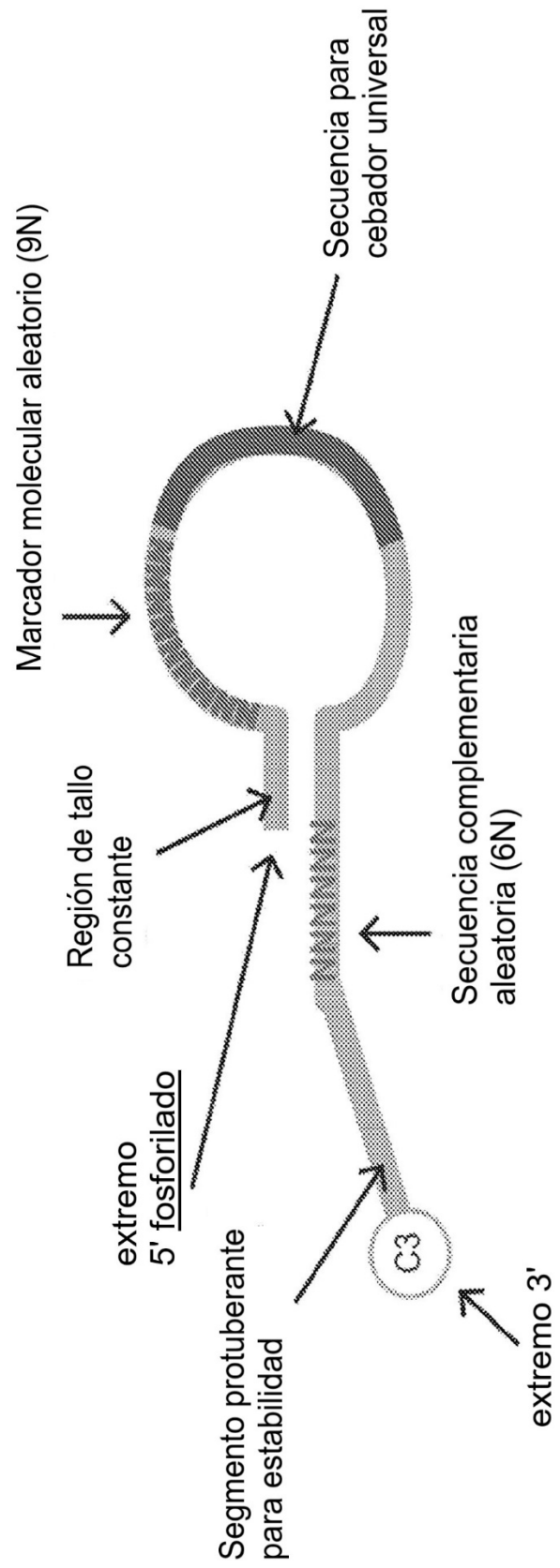


FIG. 2A

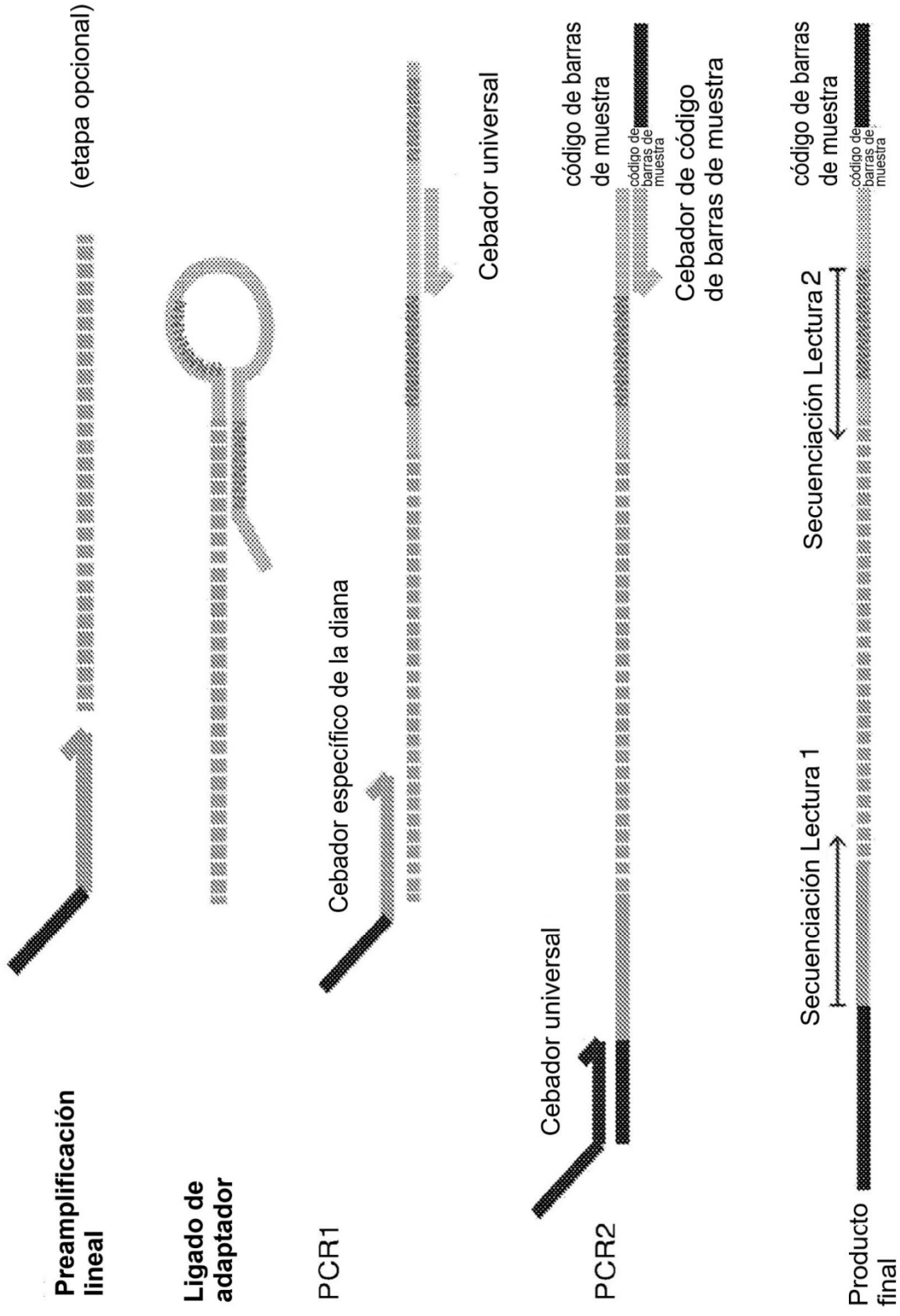


FIG. 2B

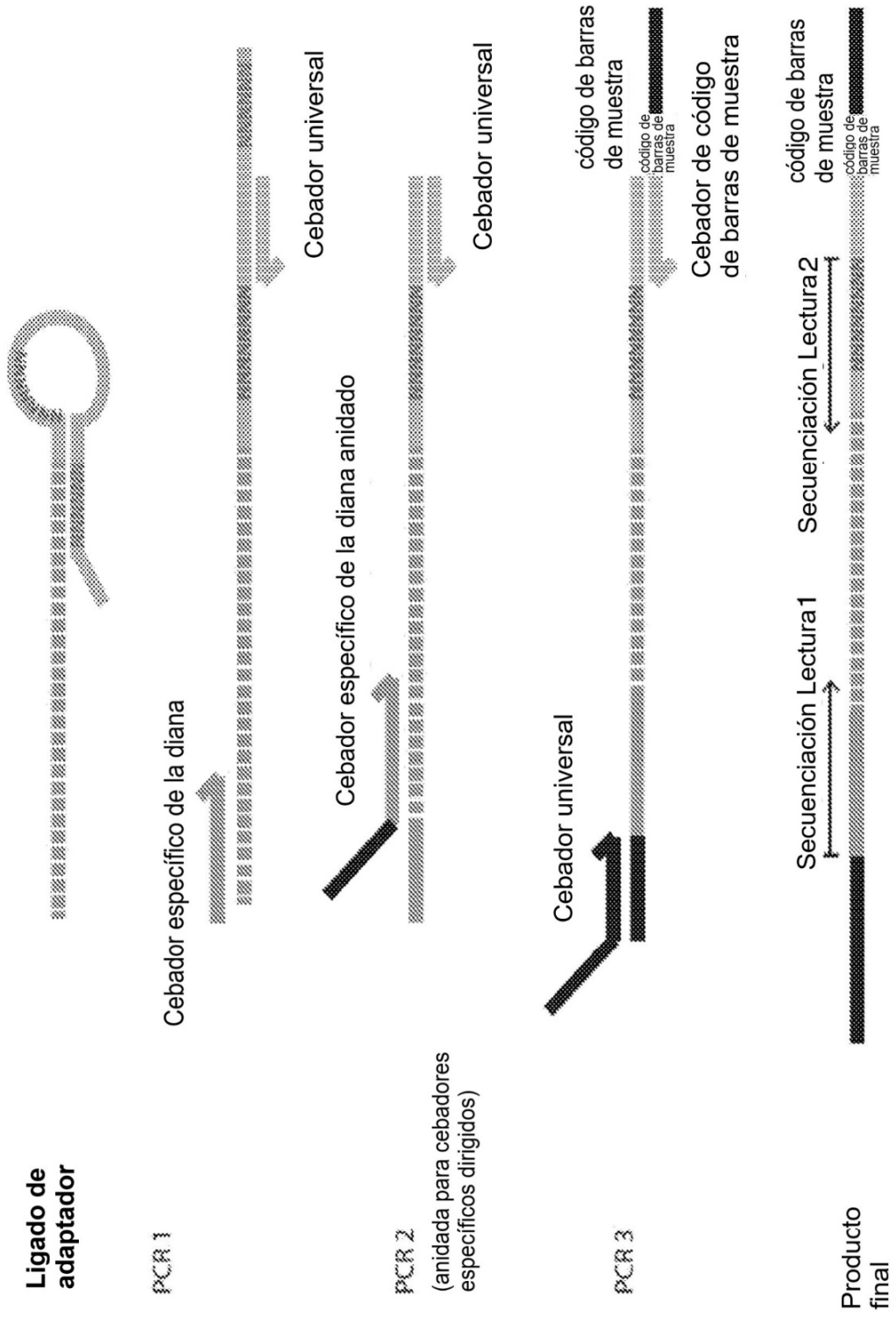


FIG. 2C

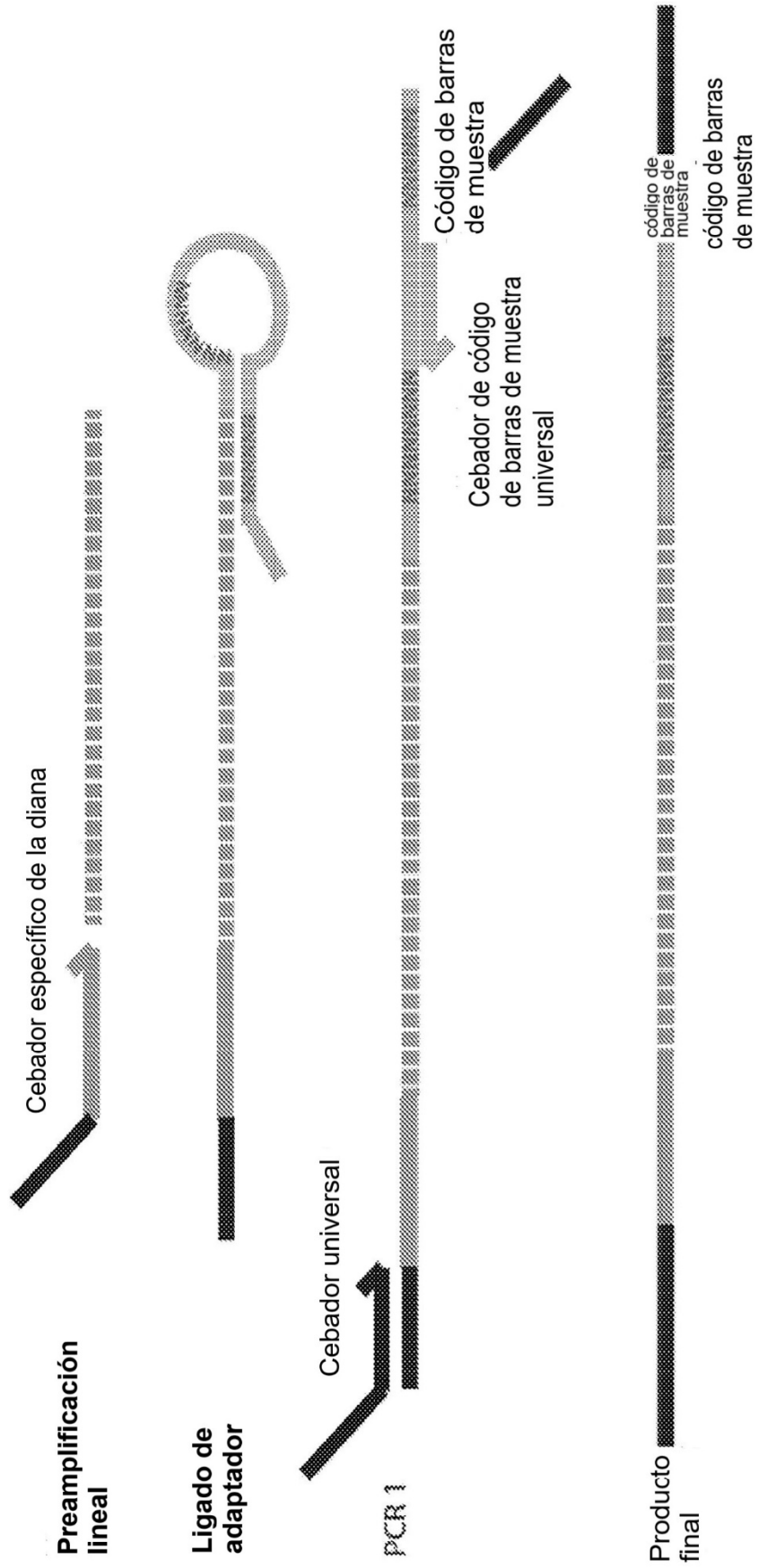


FIG. 3

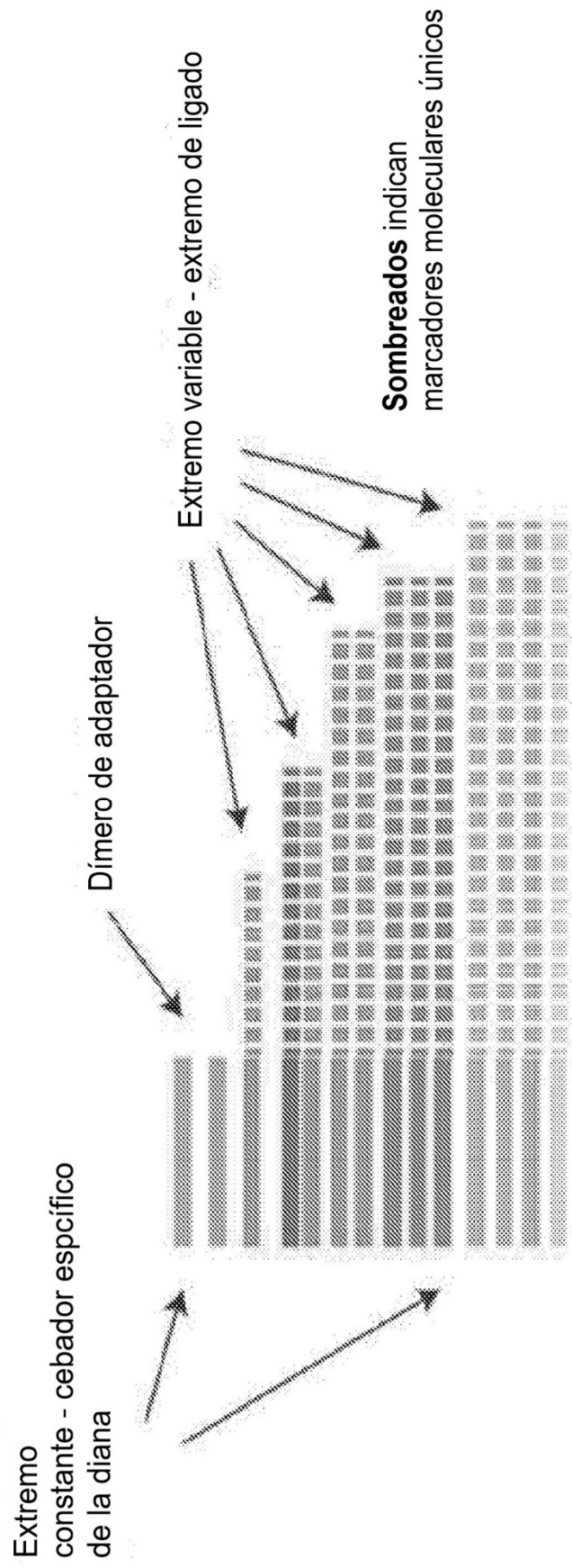


FIG. 4

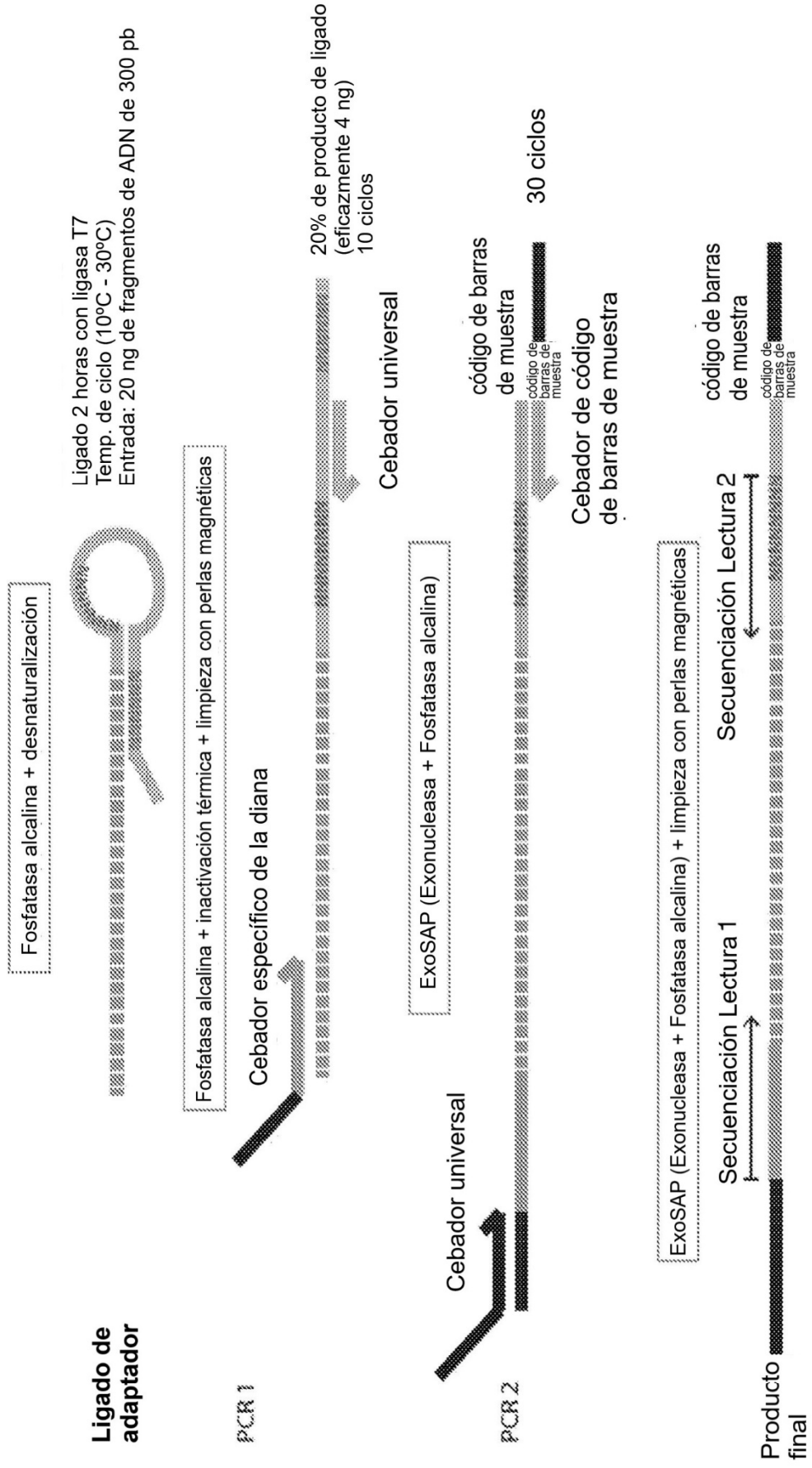


FIG. 5

