

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 341**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2021** **PCT/US2021/048064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2022** **WO22055729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2021** **E 21790611 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 4211269**

54 Título: **Composiciones y métodos para amplificar polinucleótidos**

30 Prioridad:

14.09.2020 US 202063077857 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2025

73 Titular/es:

ILLUMINA, INC. (50.00%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US y
ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (50.00%)

72 Inventor/es:

FISHER, JEFFREY y
BETLEY, JASON

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 3 007 341 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

Composiciones y métodos para amplificar polinucleótidos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Listado de secuencias

10 La solicitud inmediata contiene un listado de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia en ASCII, creada el 26 de agosto de 2021, se denomina IP-1997-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 2300 bites.

Antecedentes

15 La amplificación por agrupaciones es un enfoque para amplificar polinucleótidos, por ejemplo, para utilizar en la secuenciación genética. Los polinucleótidos diana son capturados por cebadores (p. ej., cebadores P5 y P7) acoplados a una superficie de sustrato en una celda de flujo, y forman “semillas” en ubicaciones aleatorias de la superficie. Los ciclos de amplificación se realizan para formar agrupaciones en la superficie alrededor de cada semilla. Las agrupaciones incluyen copias, y copias complementarias, de los polinucleótidos de semilla. En algunas circunstancias, el sustrato es estampado para definir regiones que limitan diferentes agrupaciones, tales como pocillos que pueden llenarse con agrupaciones respectivas. La patente WO2011/025477 A1 describe métodos para controlar la densidad de diferentes especies moleculares en la superficie de un soporte sólido. Una primera mezcla de diferentes especies moleculares se acopla a un soporte sólido en condiciones para acoplar cada especie a una densidad deseada, produciendo de este modo un soporte derivatizado que tiene moléculas de captura acopladas. El soporte derivatizado se trata con una segunda mezcla de diferentes especies moleculares, en donde diferentes especies moleculares en la segunda mezcla se aglutinan específicamente a las diferentes moléculas de captura acopladas al soporte sólido. Una o más de las moléculas de captura pueden modificarse de forma reversible de tal modo que las moléculas de captura tienen una actividad diferente antes y después de que la segunda mezcla de especies moleculares se acople. En realizaciones particulares, las diferentes especies moleculares son ácidos nucleicos que se modifican de forma reversible para tener una actividad diferente en una reacción de amplificación. La patente WO2015/189637 describe métodos para aumentar la precisión de la secuenciación. Por ejemplo, los métodos pueden utilizar la amplificación lineal para generar una población relativamente pequeña de moléculas molde que pueden amplificarse posteriormente en una población clonal más grande de moléculas de ADN para su secuenciación.

Resumen

35 Los ejemplos proporcionados en la presente memoria se refieren a amplificar polinucleótidos. Se describen composiciones y métodos para llevar a cabo tal amplificación.

40 En un primer aspecto, se proporciona una composición para amplificar un polinucleótido. La composición puede incluir un sustrato que incluye una primera región y una segunda región; una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato. Los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son más largos que los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. La composición también incluye una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato. Los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. La composición comprende además un fluido que comprende polinucleótidos diana, comprendiendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura.

55 En algunos ejemplos, el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana se hibrida a un primero de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana se hibrida a un primero de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el primero de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés) de más de aproximadamente 40 °C.

60 En algunos ejemplos, la composición incluye además un primer amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el primer amplicón un segundo adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

65 En algunos ejemplos, la composición incluye además un segundo amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, teniendo el segundo amplicón un primer

adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, la composición incluye además un tercer amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el tercer amplicón un segundo adaptador que no puede hibridar completamente a ninguno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. La incapacidad del segundo adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura puede, en algunos ejemplos, inhibir la amplificación del tercer amplicón. En algunos ejemplos, cualquier dúplex parcial entre el segundo adaptador del tercer amplicón y cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C.

En algunos ejemplos, la composición incluye además un cuarto amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, teniendo el cuarto amplicón un primer adaptador que no puede hibridar completamente a ninguno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales. En algunos ejemplos, la incapacidad del primer adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura inhibe la amplificación del cuarto amplicón.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5y los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5 acortados y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7 acortados.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.

También se describe en la presente memoria otra composición para amplificar un polinucleótido. La composición puede incluir un sustrato que incluye una primera región y una segunda región; una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato; y una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato. La composición también puede incluir una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato; una primera pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles acoplados a los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura; y una segunda pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles acoplados a los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, la composición incluye además un fluido que comprende polinucleótidos diana, incluyendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura. En algunos ejemplos, los primeros adaptadores de los polinucleótidos diana tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura, y los segundos adaptadores de los polinucleótidos diana tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, un dúplex formado a partir de la hibridación entre el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el uno de los cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que aproximadamente 40 °C, o un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero

de los polinucleótidos diana y el uno de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que aproximadamente 40 °C.

En algunos ejemplos, el primer adaptador de un segundo de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o el segundo adaptador del segundo de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, el grupo de bloqueo extraíble acoplado al uno de los cebadores de captura inhibe la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana, o el grupo de bloqueo extraíble acoplado al uno de los cebadores de captura ortogonales inhibe la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana.

En algunos ejemplos, la composición incluye además un amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el amplicón un segundo adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, la composición incluye además un amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, teniendo el amplicón un primer adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura son cebadores de captura P5, y los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para amplificar un polinucleótido. El método incluye poner en contacto una composición con un fluido. La composición incluye un sustrato que incluye una primera región y una segunda región; una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato. Los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son más largos que los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. La composición también incluye una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato. Los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. El fluido incluye polinucleótidos diana, incluyendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura. El método incluye hibridar el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana a un cebador de captura ortogonal de la primera o la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, o hibridar el segundo adaptador de ese polinucleótido diana a un cebador de captura de la primera o la segunda pluralidades de cebadores de captura; y después amplificar el primero de los polinucleótidos diana, comprendiendo la amplificación generar amplicones del primero de los polinucleótidos diana.

En algunos ejemplos, los primeros adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y los segundos adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el primero de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m) de más de aproximadamente 40 °C. En algunos ejemplos, el amplicón se hibrida al primero de los polinucleótidos diana. En algunos ejemplos, el método incluye deshibridar el primero de los polinucleótidos diana, y después amplificar el amplicón.

En algunos ejemplos, el método incluye acoplar covalentemente un primer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, e hibridar completamente un segundo adaptador del primer amplicón a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, el método incluye acoplar covalentemente un segundo amplicón a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, e hibridar completamente un primer adaptador del segundo amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, el método incluye acoplar covalentemente un tercer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y no poder hibridar completamente un segundo adaptador del tercer amplicón a ninguno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, la incapacidad del segundo adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura inhibe la amplificación del tercer amplicón. En algunos ejemplos, cualquier dúplex parcial entre el segundo adaptador del tercer amplicón y cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C.

En algunos ejemplos, el método incluye acoplar covalentemente un cuarto amplicón a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y no poder hibridar completamente un primer adaptador del cuarto amplicón a ninguno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales. En algunos ejemplos, la incapacidad del primer adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura inhibe la amplificación del cuarto amplicón.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5y los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5 acortados y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7 acortados. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.

En algunos ejemplos, se proporciona otro método para amplificar un polinucleótido. El método puede incluir poner en contacto una composición con un fluido. La composición puede incluir un sustrato que incluye una primera región y una segunda región; una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato; y una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato. La composición puede incluir además una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato; y una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato; una primera pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles acoplados a los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura; y una segunda pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles acoplados a los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. El fluido puede incluir polinucleótidos diana, incluyendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura. El método puede incluir hibridar el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana a un primero de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o hibridar el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana a un primero de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. El método puede incluir amplificar el primero de los polinucleótidos diana, incluyendo la amplificación generar un primer amplicón del primero de los polinucleótidos diana en la primera región del sustrato. El método puede incluir extraer la primera y la segunda pluralidades de grupos de bloqueo extraíbles; y después amplificar adicionalmente el primero de los polinucleótidos diana, incluyendo la amplificación generar amplicones adicionales del primero de los polinucleótidos diana en la segunda región del sustrato.

En algunos ejemplos, los primeros adaptadores de los polinucleótidos diana tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y los segundos adaptadores de los polinucleótidos diana tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, un dúplex formado a partir de la hibridación entre el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el uno de los cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que aproximadamente 40 °C, o en donde un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el uno de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que aproximadamente 40 °C.

En algunos ejemplos, el primer adaptador de un segundo de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o en donde el segundo adaptador del segundo de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, el grupo de bloqueo extraíble acoplado al uno de los cebadores de captura inhibe la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana, o en donde el grupo de bloqueo extraíble acoplado al uno de los cebadores de captura ortogonales inhibe la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana.

En algunos ejemplos, el método incluye además acoplar covalentemente un amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el amplicón un segundo adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura.

En algunos ejemplos, el método incluye además acoplar covalentemente un amplicón a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, teniendo el amplicón un primer adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura son cebadores de captura P5, y los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. En algunos ejemplos, los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

En algunos ejemplos, la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato. En algunos ejemplos, la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.

Debe entenderse que cualquier característica/ejemplo respectivo de cada uno de los aspectos de la descripción tal como se describe en la presente memoria puede implementarse conjuntamente en cualquier combinación apropiada, y que cualquier característica/ejemplo de uno cualquiera o más de estos aspectos puede implementarse junto con cualquiera de las características del (de los) otro(s) aspecto(s) como se describe en la presente memoria en cualquier combinación apropiada para lograr los beneficios que se describen en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1C ilustran esquemáticamente ejemplos de amplificación de polinucleótidos sobre un sustrato.

Las figuras 2A-2D ilustran esquemáticamente ejemplos adicionales de amplificación de polinucleótidos sobre un sustrato.

Las figuras 3A-3J ilustran esquemáticamente ejemplos de composiciones y operaciones en un flujo de proceso para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato.

Las figuras 4A-4L ilustran esquemáticamente ejemplos de composiciones y operaciones en un flujo de proceso para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato.

Las figuras 5A-5D ilustran esquemáticamente composiciones ilustrativas adicionales para utilizar en la amplificación de un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato.

Las figuras 6A-6D ilustran esquemáticamente ejemplos de composiciones adicionales para utilizar en la amplificación de un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato.

La figura 7 ilustra un flujo de operaciones ilustrativo en un método para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato.

La figura 8 ilustra un flujo de operaciones ilustrativo en un método para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato.

- 5 La figura 9 ilustra esquemáticamente una composición modelo a base de soluciones para caracterizar el efecto de la longitud del cebador de captura sobre la eficiencia de amplificación.

La figura 10 es un gráfico que ilustra la intensidad de fluorescencia que resulta de la amplificación con diferentes longitudes de cebadores de captura.

10 Descripción detallada

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria se refieren a amplificar polinucleótidos. Se describen composiciones y métodos para llevar a cabo tal amplificación.

15 La monoclonalidad de una agrupación resultante de la amplificación de polinucleótido(s) diana puede afectar la facilidad con la que el (los) polinucleótido(s) diana de esa agrupación pueden secuenciarse posteriormente, p. ej., utilizando secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés). Los polinucleótidos que tienen la misma secuencia entre sí se consideran “monoclonales”, mientras que los polinucleótidos que tienen secuencias diferentes se consideran “policlonales”. Cuanto mayor sea la monoclonalidad de una agrupación, es decir, cuanto mayor sea el número de polinucleótidos que tienen la misma secuencia entre sí en esa agrupación, mayor será la probabilidad de que una señal del conjunto de polinucleótidos dentro de esa agrupación sea suficiente para secuenciar correctamente el polinucleótido que tiene el mayor número de amplicones utilizando SBS. Una agrupación con un número de amplicones del mismo polinucleótido suficiente para secuenciar correctamente ese polinucleótido se considera “funcionalmente monoclonal”, incluso si esa agrupación puede ser policlonal. De modo ilustrativo, una agrupación de la que aproximadamente el 60 % o más de la señal de SBS proviene de amplicones de un polinucleótido particular, y de la que aproximadamente el 40 % o menos de la señal de SBS proviene de amplicones de uno o más polinucleótidos diferentes, puede ser funcionalmente monoclonal, y como tal puede secuenciarse con precisión utilizando SBS. En algunos ejemplos, la cantidad de señal de SBS se escala aproximadamente de modo lineal con la cantidad de un polinucleótido, y como tal una agrupación con aproximadamente el 60 % o más de amplicones de un polinucleótido particular, y con aproximadamente el 40 % o menos de amplicones de uno o más de otros polinucleótidos, puede ser funcionalmente monoclonal.

35 El grado en que una agrupación determinada es monoclonal puede estar relacionado con varios factores. Por ejemplo, las figuras 1A-1C ilustran esquemáticamente ejemplos de amplificación de polinucleótidos en un sustrato. Como se muestra en la figura 1A, la captura y la amplificación de una única semilla 111 en la región 101 de sustrato puede dar como resultado una agrupación monoclonal 121 que puede llenar la región de sustrato, y que puede utilizarse fácilmente para la SBS (los círculos discontinuos y punteados pretenden representar la expansión de la agrupación a lo largo del tiempo). En comparación, como se muestra en la figura 1B, la captura y la amplificación de dos semillas 112, 113 en la región 101 de sustrato pueden dar como resultado una agrupación policlonal que tiene una primera región 122 que resulta de la amplificación de la semilla 112, y una segunda región 123 que resulta de la amplificación de la semilla 113. En este ejemplo, el grado en que la agrupación es policlonal puede ser lo suficientemente baja como para que la agrupación pueda ser útil para la SBS. Por ejemplo, aproximadamente el 60 % o más de la señal de la región 101 de sustrato puede provenir de los amplicones de la semilla 112 en la primera región 122 y aproximadamente el 40 % o menos de la señal de la región 101 de sustrato puede provenir de los amplicones de la semilla 113 en la segunda región 123. Por ejemplo, aproximadamente el 60 % o más de la región 101 de sustrato puede estar cubierta por los amplicones de la semilla 112 en la primera región 122 y aproximadamente el 40 % o menos de la región 101 de sustrato puede estar cubierta por los amplicones de la semilla 113 en la segunda región 123. Como tal, la agrupación policlonal 122, 123 puede ser funcionalmente monoclonal.

50 Sin embargo, las ubicaciones relativas de diferentes semillas en el sustrato pueden afectar el grado en que la agrupación es policlonal, y el grado en que la agrupación puede utilizarse para la SBS. Por ejemplo, como se muestra en la figura 1C, la captura y amplificación de dos semillas 114, 115 en la región 101 de sustrato da como resultado una agrupación policlonal que tiene una primera región 124 que resulta de la amplificación de la semilla 112, y una segunda región 125 que resulta de la amplificación de la semilla 115, pero la segunda región 125 es más grande que la segunda región 123 en la figura 1B porque la semilla 115 está más céntricamente ubicada que la semilla 113. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 60 % de la señal de la región 101 de sustrato puede provenir de los amplicones de la semilla 114 en la primera región 124 y más de aproximadamente el 40 % de la señal de la región 101 de sustrato puede provenir de los amplicones de la semilla 115 en la segunda región 125, y como tal la agrupación policlonal 124, 125 puede no ser funcionalmente monoclonal. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 60 % de la región 101 de sustrato puede estar cubierta por amplicones de la semilla 114 en la primera región 124 y más de aproximadamente el 40 % de la región 101 de sustrato puede estar cubierta por amplicones de la semilla 115 en la segunda región 125. Como tal, la agrupación policlonal 124, 125 puede no ser funcionalmente monoclonal. En este ejemplo, el grado en el que la agrupación es policlonal puede ser demasiado alto para que la agrupación sea útil para la SBS.

El número de semillas que se espera que caigan en una región de sustrato determinada puede aumentar con el tamaño del sustrato. La formación de patrones de sustrato puede afectar además el grado en que las agrupaciones son policlonales y el grado en que tales agrupaciones son útiles para la SBS. Por ejemplo, las figuras 2A-2D ilustran esquemáticamente ejemplos adicionales de amplificación de polinucleótidos en un sustrato. El sustrato puede incluir una primera región 201 y una segunda región 202, que pueden tener diferentes tratamientos de superficie entre sí de un modo tal como se describe con referencia a la figura 3A. Puede desearse realizar lecturas de extremo pareadas simultáneas en copias del mismo polinucleótido diana en las regiones 201, 202 para mejorar la fiabilidad de la lectura, p. ej., realizando lecturas de SBS en las copias en una primera dirección en la región 201 y en la dirección opuesta en la región 202, y después utilizando software para alinear los resultados, que deberían ser complementarios entre sí y por lo tanto indicar la misma secuencia entre sí. Como se muestra en la figura 2A, la captura y amplificación de una sola semilla 211 en la región 202 de sustrato (o, de modo equivalente, la región 201 de sustrato) dan como resultado agrupaciones monoclonales en la primera región 221 y en la segunda región 222, que pueden llenar las regiones de sustrato y que pueden utilizarse fácilmente para lecturas de extremo pareadas simultáneas.

En comparación, como se muestra en la figura 2B, la captura y la amplificación de una primera semilla 212 que abarca las regiones 201, 202 de sustrato y una segunda semilla 213 en la región 201 de sustrato da como resultado un agrupamiento policlonal dentro de la región 201 de sustrato que tiene una primera región 223 que resulta de la amplificación de la semilla 212 dentro de la región 201 de sustrato, y una segunda región 225 que resulta de la amplificación de la semilla 213 dentro de la región 201 de sustrato; y una agrupación monoclonal 224 dentro de la región 202 de sustrato que resulta de la amplificación de la semilla 212 dentro de la región 202 de sustrato. En este ejemplo, el grado en el que una agrupación es policlonal es lo suficientemente bajo como para que la región 201 de sustrato pueda ser funcionalmente monoclonal. Como tal, las regiones 201 y 202 juntas pueden ser funcionalmente monoclonales, y las agrupaciones 223, 224 pueden ser útiles para lecturas de extremo pareadas simultáneas. Por ejemplo, para lecturas de extremo pareadas simultáneas, puede ser útil que las regiones de sustrato sean independientemente al menos funcionalmente monoclonales, y que las regiones de sustrato tomadas juntas también sean al menos funcionalmente monoclonales.

Similarmente a los ejemplos descritos con referencia a las figuras 1B-1C, las ubicaciones relativas de las diferentes semillas en el sustrato pueden afectar el grado en que la agrupación es policlonal, y el grado en que la agrupación puede utilizarse para SBS, y en particular para lecturas de extremo pareadas simultáneas. Por ejemplo, como se muestra en la figura 2C, una primera semilla 214 que une las regiones 201, 202 de sustrato y una segunda semilla 215 en la región 201 de sustrato da como resultado un agrupamiento policlonal dentro de la región 201 de sustrato que tiene una primera región 226 que resulta de la amplificación de la semilla 214 dentro de la región 201 de sustrato, y una segunda región 228 que resulta de la amplificación de la semilla 215 dentro de la región 201 de sustrato; y una agrupación monoclonal 227 dentro de la región 202 de sustrato que resulta de la amplificación de la semilla 214 dentro de la región 202 de sustrato. En el ejemplo de la figura 2C, la segunda región 228 es más grande que la segunda región 225 de la figura 2B porque la semilla 215 está ubicada más centralmente que la semilla 213. En este ejemplo, la región 201 de sustrato es policlonal sin ser funcionalmente monoclonal, mientras que la región 202 de sustrato es monoclonal. Como tal, las regiones 201 y 202 juntas pueden no ser funcionalmente monoclonales, y el grado en que la agrupación es policlonal puede ser demasiado alto para que las agrupaciones 226, 228 sean útiles para lecturas de extremo pareadas simultáneas. Además, debido a que la región 201 no es funcionalmente monoclonal, la región 201 puede no ser útil para la secuenciación, mientras que la región 202 puede utilizarse de forma independiente para la secuenciación.

En otro ejemplo, como se muestra en la figura 2D, una primera semilla 216 en la región 202 de sustrato y una segunda semilla 217 en la región 201 de sustrato dan como resultado una agrupación monoclonal 229 dentro de la región 201 de sustrato que resulta de la amplificación de la semilla 217 dentro de la región 201 de sustrato, y una segunda agrupación monoclonal dentro de la región 202 de sustrato que resulta de la amplificación de la semilla 216 dentro de la región 202 de sustrato. Aunque las agrupaciones 229 y 230 son cada una monoclonales, pueden no ser útiles para lecturas de extremo pareadas simultáneas porque tienen copias de polinucleótidos diana diferentes entre sí, y por lo tanto es posible que no estén alineados entre sí mediante software. No obstante, debido a que cada una de las agrupaciones 229, 230 es monoclonal, o al menos funcionalmente monoclonal, esas agrupaciones pueden utilizarse independientemente para la secuenciación aunque las secuencias de las dos agrupaciones no son complementarias entre sí.

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria pueden mejorar el grado en que una agrupación es monoclonal (incluidos, pero sin limitarse a, sustratos con superficies complejas) a través del uso de cebadores modificados, en comparación con la monoclonalidad que puede lograrse con el uso de cebadores P5 y P7 estándar. Tales cebadores modificados pueden incluir cualquier combinación adecuada de una o más secuencias modificadas, longitud modificada, uso de restos no nucleótidos, y utilizarse junto con otros cebadores modificados. Los cebadores modificados pueden utilizarse para reducir el área de amplificación efectiva, o desviar de cualquier otro modo la amplificación, a fin de mejorar la monoclonalidad de las agrupaciones. Por ejemplo, puede esperarse que el número de semillas que se amplifiquen en una región determinada del sustrato en ejemplos tales como los descritos con referencia a las figuras 1A-1C y 2A-2D siga la distribución de Poisson. En comparación, el uso de cebadores modificados tal como se proporciona en la presente memoria, puede proporcionar una monoclonalidad que supera la que predeciría la distribución de Poisson.

En primer lugar, se explicarán brevemente algunos términos utilizados en la presente memoria. A continuación, se describirán algunas composiciones ilustrativas y métodos ilustrativos para amplificar polinucleótidos.

5 Términos

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. El uso del término “incluyendo”, así como otras formas, tales como “incluyen”, “incluye” e “incluido”, no es limitante. El uso del término “que tiene”, así como otras formas, tales como “tienen”, “tiene” y “tenido”, no es limitante. Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, ya sea en una expresión de transición o en el cuerpo de la reivindicación, se ha de interpretar que las expresiones “que consta de” y “que constan de” tienen un significado abierto. Es decir, las expresiones se han de interpretar como sinónimos de las expresiones “que tiene(n) al menos” o “que incluye(n) al menos”. Cuando se utiliza en el contexto de un proceso, la expresión “que consta de” significa que el proceso incluye al menos las etapas citadas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se utiliza en el contexto de un compuesto, composición o dispositivo, la expresión “que consta de” significa que el compuesto, la composición o el dispositivo incluye al menos las características o los componentes citados, pero que también puede incluir características o componentes adicionales.

Los términos “sustancialmente”, “aproximadamente” y “alrededor de” utilizados a lo largo de esta memoria descriptiva, se utilizan para describir y considerar pequeñas fluctuaciones, tales como las debidas a variaciones en el procesamiento. Por ejemplo, pueden referirse a menor que o igual a $\pm 10\%$, tal como menor que o igual a $\pm 5\%$, tal como menor que o igual a $\pm 2\%$, tal como menor que o igual a $\pm 1\%$, tal como menor que o igual a $\pm 0,5\%$, tal como menor que o igual a $\pm 0,2\%$, tal como menor que o igual a $\pm 0,1\%$, tal como menor que o igual a $\pm 0,05\%$.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “hibridar” pretende significar asociar de modo no covalente un primer polinucleótido a un segundo polinucleótido a lo largo de las longitudes de esos polímeros para formar un “dúplex” bicatenario. Por ejemplo, dos cadenas de polinucleótidos de ADN pueden asociarse a través del emparejamiento de bases complementarias. La resistencia de la asociación entre el primer y el segundo polinucleótidos aumenta con la complementariedad entre las secuencias de nucleótidos dentro de esos polinucleótidos. La resistencia de hibridación entre los polinucleótidos puede caracterizarse por una temperatura de fusión (T_m) a la que el 50 % de los dúplex tienen cadenas de polinucleótidos que se disocian entre sí. Los polinucleótidos que se hibridan “parcialmente” entre sí significan que tienen secuencias que son complementarias entre sí, pero tales secuencias se hibridan entre sí a lo largo de solo una parte de sus longitudes para formar un dúplex parcial. Los polinucleótidos con una “incapacidad” para hibridar incluyen aquellos que están separados físicamente entre sí de tal modo que un número insuficiente de sus bases pueden ponerse en contacto entre sí de tal modo que hibriden entre sí.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “nucleótido” pretende significar una molécula que incluye un azúcar y al menos un grupo fosfato, y en algunos ejemplos también incluye una nucleobase. Un nucleótido que carece de una nucleobase puede denominarse “abásico”. Los nucleótidos incluyen desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, nucleótidos peptídicos, nucleótidos peptídicos modificados, nucleótidos de esqueleto de azúcar y fosfato modificados, y mezclas de los mismos. Los ejemplos de nucleótidos incluyen monofosfato de adenosina (AMP, por sus siglas en inglés), difosfato de adenosina (ADP, por sus siglas en inglés), trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés), monofosfato de timidina (TMP, por sus siglas en inglés), difosfato de timidina (TDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de timidina (TTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de citidina (CMP, por sus siglas en inglés), difosfato de citidina (CDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de citidina (CTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de guanosina (GMP, por sus siglas en inglés), difosfato de guanosina (GDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de guanosina (GTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de uridina (UMP, por sus siglas en inglés), difosfato de uridina (UDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de uridina (UTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de desoxitimidina (dAMP, por sus siglas en inglés), difosfato de desoxiadenosina (dADP, por sus siglas en inglés), trifosfato de desoxiadenosina (dATP, por sus siglas en inglés), monofosfato de desoxitimidina (dTMP, por sus siglas en inglés), difosfato de desoxitimidina (dTDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de desoxitimidina (dTTP, por sus siglas en inglés), difosfato de desoxicitidina (dCDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de desoxicitidina (dCTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de desoxiguanosina (dGMP, por sus siglas en inglés), difosfato de desoxiguanosina (dGDP, por sus siglas en inglés), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP, por sus siglas en inglés), monofosfato de desoxiuridina (dUMP, por sus siglas en inglés), difosfato de desoxiuridina (dUDP, por sus siglas en inglés) y trifosfato de desoxiuridina (dUTP, por sus siglas en inglés).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “nucleótido” también pretende abarcar cualquier análogo de nucleótido que sea un tipo de nucleótido que incluya una nucleobase, un resto de azúcar y/o fosfato modificado en comparación con los nucleótidos naturales. Las nucleobases modificadas ilustrativas incluyen inosina, xantantina, hipoxantantina, isocitocina, isoguanina, 2-aminopurina, 5-metilcitosina, 5-hidroximetil citosina, 2-aminoadenina, 6-metil adenina, 6-metil guanina, 2-propil guanina, 2-propil adenina, 2-tio-uracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 15-halouracilo, 15-halocitosina, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina o guanina, 8-amino adenina o guanina, 8-tiol adenina o guanina, 8-tioalquil adenina o guanina, 8-hidroxil adenina o guanina, uracilo o citosina sustituido con 5-halo, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina, 3-desazaadenina o similares. Como se conoce

en la técnica, ciertos análogos de nucleótidos no pueden incorporarse en un polinucleótido, por ejemplo, análogos de nucleótidos tales como adenosina 5'-fosfosulfato. Los nucleótidos pueden incluir cualquier número adecuado de fosfatos, p. ej., tres, cuatro, cinco, seis, o más de seis fosfatos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido” se refiere a una molécula que incluye una secuencia de nucleótidos que están unidos entre sí. Un polinucleótido es un ejemplo no limitante de un polímero. Los ejemplos de polinucleótidos incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), y análogos de los mismos. Un polinucleótido puede ser una secuencia monocatenaria de nucleótidos, tal como ARN o ADN monocatenario, una secuencia bicatenaria de nucleótidos, tal como ADN bicatenario, o puede incluir una mezcla de secuencias de nucleótidos monocatenarias y bicatenarias. El ADN bicatenario (ADNbc) incluye ADN genómico y productos de PCR y amplificación. El ADN monocatenario (ADNmc) puede convertirse en ADNbc y viceversa. Los polinucleótidos pueden incluir ADN no natural, tal como el ADN enantiomérico. La secuencia precisa de nucleótidos en un polinucleótido puede ser conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos ilustrativos de polinucleótido: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta de secuencia expresada [EST, por sus siglas en inglés] o análisis en serie de expresión de genes [SAGE, por sus siglas en inglés]), ADN genómico, fragmento de ADN genómico, exón, intrón, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozima, ADNc, polinucleótido recombinante, polinucleótido sintético, polinucleótido ramificado, plásmido, vector, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sonda de ácido nucleico, cebador o copia amplificada de cualquiera de los anteriores.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una “polimerasa” pretende significar una enzima que tiene un sitio activo que ensambla polinucleótidos polimerizando nucleótidos en polinucleótidos. Una polimerasa puede unirse a un polinucleótido diana monocatenario cebado y puede añadir secuencialmente nucleótidos al cebador en crecimiento para formar un polinucleótido de “copia complementaria” que tiene una secuencia que es complementaria a la del polinucleótido diana. Otra polimerasa, o la misma polimerasa, puede entonces formar una copia del nucleótido diana formando una copia complementaria de espolinucleótido de copia complementaria. Cualquiera de tales copias puede denominarse en la presente memoria “amplicones”. Las ADN polimerasas pueden unirse al polinucleótido diana y después se mueven hacia abajo del polinucleótido diana añadiendo secuencialmente nucleótidos al grupo hidroxilo libre del extremo 3' de una cadena de polinucleótidos (amplicón en crecimiento). Las ADN polimerasas pueden sintetizar moléculas de ADN complementarias a partir de patrones de ADN y las ARN polimerasas pueden sintetizar moléculas de ARN a partir de patrones de ADN (transcripción). Las polimerasas pueden utilizar una cadena corta de ARN o ADN (cebador), para iniciar el crecimiento de la cadena. Algunas polimerasas pueden desplazar la cadena corriente arriba del sitio donde están añadiendo bases a una cadena. Se dice que dichas polimerasas desplazan la cadena, lo que significa que tienen una actividad que elimina una cadena complementaria de una cadena molde leída por la polimerasa. Ejemplos de polimerasas que tienen actividad de desplazamiento de cadena incluyen, de modo no limitativo, el fragmento grande de polimerasa de Bst (*Bacillus stearothermophilus*), la polimerasa exo-Klenow o exopolimerasa T7 de grado de secuenciación. Algunas polimerasas degradan la cadena delante de ellas, reemplazándola efectivamente por la cadena en crecimiento por detrás (actividad exonucleasa 5'). Algunas polimerasas tienen una actividad que degrada la cadena detrás de ellas (actividad exonucleasa 3'). Se han modificado algunas polimerasas útiles, ya sea por mutación o de otro modo, para reducir o eliminar la actividad exonucleasa 3' y/o 5'.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “cebador” se define como un polinucleótido al que pueden añadirse nucleótidos mediante un grupo OH 3' libre. Una imprimación puede incluir un bloque de 3' que evita la polimerización hasta que se retire el bloque. Un cebador puede incluir una modificación en el terminal 5' para permitir una reacción de acoplamiento o para acoplar el cebador a otro resto. Un cebador puede incluir uno o más restos que pueden escindir en condiciones adecuadas, tales como luz UV, química, enzima, o similares. La longitud del cebador puede ser cualquier número de bases de longitud y puede incluir una variedad de nucleótidos naturales y/o no naturales. Un polinucleótido diana puede incluir un “adaptador” que se hibrida a (tiene una secuencia que es complementaria a) un cebador, y puede amplificarse para generar un polinucleótido de copia complementaria añadiendo nucleótidos al grupo OH en 3' libre del cebador. Un “cebador de captura” pretende significar un cebador que se acopla al sustrato y puede hibridar a un segundo adaptador del polinucleótido diana, mientras que un “cebador de captura ortogonal” pretende significar un cebador que se acopla al sustrato y puede hibridar a un primer adaptador de ese polinucleótido diana. El primer adaptador puede tener una secuencia que es complementaria a la del cebador de captura ortogonal, y el segundo adaptador puede tener una secuencia que es complementaria a la del cebador de captura. Un cebador de captura y un cebador de captura ortogonal pueden tener secuencias diferentes e independientes entre sí. Adicionalmente, un cebador de captura y un cebador de captura ortogonal pueden diferir entre sí en al menos otra propiedad. Por ejemplo, el cebador de captura y el cebador de captura ortogonal pueden tener longitudes diferentes entre sí; el cebador de captura o el cebador de captura ortogonal puede incluir un resto que no sea de ácido nucleico (tal como un grupo de bloqueo o un resto de escisión) del que carece el otro cebador de captura o el cebador de captura ortogonal; o cualquier combinación adecuada de tales propiedades.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “sustrato” se refiere a un material utilizado como un soporte para las composiciones descritas en la presente memoria. Los materiales de sustrato ilustrativos pueden incluir vidrio, sílice, plástico, cuarzo, metal, óxido metálico, organosilicato (p. ej., silsesquioxanos orgánicos poliédricos [POSS, por sus siglas en inglés]), poliacrilatos, óxido de tántalo, semiconductores de óxido metálico complementario (CMOS, por sus siglas en inglés) o combinaciones de los mismos. Un ejemplo de POSS puede ser el descrito en Kehagias y col.,

Microelectronic Engineering 86 (2009), pp. 776–778. En algunos ejemplos, los sustratos utilizados en la presente solicitud incluyen sustratos a base de sílice, tales como vidrio, sílice fundida, u otros materiales que contienen sílice. En algunos ejemplos, los sustratos pueden incluir silicio, nitruro de silicio, o hidruro de silicón. En algunos ejemplos, los sustratos utilizados en la presente solicitud incluyen materiales plásticos tales como polietileno, poliestireno, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, nailon, poliésteres, policarbonatos, y poli(metacrilato de metilo). Los materiales plásticos ilustrativos incluyen sustratos de poli(metacrilato de metilo), poliestireno, y polímero de olefina cíclica. En algunos ejemplos, el sustrato es o incluye un material a base de sílice o material plástico o una combinación de los mismos. En ejemplos particulares, el sustrato tiene al menos una superficie que comprende vidrio o un polímero a base de silicio. En algunos ejemplos, los sustratos pueden incluir un metal. En algunos de tales ejemplos, el metal es oro. En algunos ejemplos, el sustrato tiene al menos una superficie que comprende un óxido metálico. En un ejemplo, la superficie comprende un óxido de tántalo u óxido de estaño. También puede utilizarse acrilamidas, enonas, o acrilatos como un componente o material de sustrato. Otros materiales de sustrato pueden incluir, pero no se limitan a, arseniuro de galio, fosfuro de indio, aluminio, cerámica, poliimida, cuarzo, resinas, polímeros y copolímeros. En algunos ejemplos, el sustrato y/o la superficie de sustrato pueden ser, o incluyen, semiconductores, tales como GaAs o ITO. Las listas anteriores pretenden ser ilustrativas de, pero no se limitan a, la presente solicitud. Los sustratos pueden comprender un único material o una pluralidad de materiales diferentes. Los sustratos pueden ser compuestos o laminados. En algunos ejemplos, el sustrato comprende un material de organosilicato. Los sustratos pueden ser planos, redondos, esféricos, en forma de varilla, o de cualquier otra forma adecuada. Los sustratos pueden ser rígidos o flexibles. En algunos ejemplos, un sustrato es una perla o una celda de flujo.

En algunos ejemplos, un sustrato incluye una superficie estampada. Una “superficie estampada” se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un sustrato. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser características donde uno o más cebadores de captura están presentes. Las características pueden estar separadas por regiones intersticiales donde no están presentes los cebadores de captura. En algunos ejemplos, el patrón puede ser un formato de características x-y que estén en filas y columnas. En algunos ejemplos, el patrón puede ser una disposición repetitiva de características y/o regiones intersticiales. En algunos ejemplos, el patrón puede ser una disposición aleatoria de características y/o regiones intersticiales. En algunos ejemplos, el sustrato incluye una matriz de pocillos (depresiones) en una superficie. Los pocillos pueden estar provistos de paredes laterales sustancialmente verticales. Los pocillos pueden fabricarse como se sabe generalmente en la técnica utilizando una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse a, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica utilizada dependerá de la composición y forma del sustrato de la matriz.

Las características en una superficie estampada de un sustrato puede incluir pocillos en una matriz de pocillos (p. ej., micropocillos o nanopocillos) sobre vidrio, silicio, plástico u otros materiales adecuados con gel covalentemente enlazado, estampado tal como poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM). El proceso crea almohadillas de gel utilizadas para la secuenciación que pueden ser estables durante las tandas de secuenciación con una gran número de ciclos. El enlace covalente del polímero a los pocillos puede ser útil para mantener el gel en las casillas estructuradas a lo largo de la vida útil del sustrato estructurado durante diversos usos. Sin embargo en muchos ejemplos, el gel no tiene por qué estar enlazado covalentemente a los pocillos. Por ejemplo, en algunas condiciones puede utilizarse acrilamida sin silano (SFA, por sus siglas en inglés), que no está acoplada covalentemente a ninguna parte del sustrato estructurado.

En ejemplos particulares, un sustrato estructurado puede fabricarse diseñando un material adecuado con pocillos (p. ej., micropocillos o nanopocillos), recubriendo el soporte estampado con un material de gel (p. ej., PAZAM, SFA o variantes de los mismos modificadas químicamente, tal como la versión azidolizada de SFA [azido-SFA]) y puliendo la superficie recubierta con gel, por ejemplo a través de un pulido químico o mecánico, conservando de este modo gel en los pocillos, pero extrayendo o inactivando sustancialmente todo el gel de las regiones intersticiales en la superficie del sustrato estructurado entre los pocillos. Los cebadores pueden acoplarse al material de gel. Una solución que incluye una pluralidad de polinucleótidos diana (p. ej., un genoma humano fragmentado o una parte del mismo) puede ponerse en contacto después con el sustrato pulido de tal modo que los polinucleótidos diana individuales siembren pocillos individuales mediante interacciones con cebadores acoplados al material de gel; sin embargo, los polinucleótidos diana no ocuparán las regiones intersticiales debido a la ausencia o inactividad del material de gel. La amplificación de los polinucleótidos diana puede confinarse a los pocillos, ya que la ausencia o inactividad del gel en las regiones intersticiales puede inhibir la migración hacia el exterior de la agrupación creciente. El proceso permite de forma conveniente la fabricación, al ser escalable y utilizar métodos convencionales de micro o nanofabricación.

Un sustrato estampado puede incluir, por ejemplo, pocillos grabados en un portaobjetos o un chip. El patrón de los grabados y la geometría de los pocillos pueden adoptar una variedad de formas y tamaños diferentes, y tales características pueden separarse física o funcionalmente entre sí. Los sustratos particularmente útiles que tienen tales características estructurales incluyen sustratos estampados que pueden seleccionar el tamaño de partículas sólidas tales como las microesferas. Un sustrato estampado ilustrativo que tiene estas características es el sustrato grabado utilizado en relación con la tecnología BEAD ARRAY (Illumina, Inc., San Diego, California).

En algunos ejemplos, un sustrato descrito en la presente memoria forma al menos parte de una celda de flujo o está ubicado en una celda de flujo. Las celdas de flujo pueden incluir una cámara de flujo que está dividida en una pluralidad de carriles o una pluralidad de sectores. Las celdas de flujo y los sustratos ilustrativos para la fabricación de celdas de flujo que pueden utilizarse en métodos y composiciones expuestos en la presente memoria incluyen, pero sin limitarse a, los comercializados por Illumina, Inc. (San Diego, California).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “directamente” cuando se utiliza en referencia a una capa que cubre la superficie de un sustrato pretende significar que la capa cubre la superficie del sustrato sin una capa intermedia significativa, tal como, p. ej., una capa adhesiva o una capa de polímero. Las capas que cubren directamente una superficie pueden acoplarse a esta superficie a través de cualquier interacción química o física, incluidos los enlaces covalentes o la adhesión no covalente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inmovilizado” cuando se utiliza en referencia a un polinucleótido pretende significar el acoplamiento directo o indirecto a un sustrato a través de enlaces covalentes o no covalentes. En ciertos ejemplos, puede utilizarse el acoplamiento covalente o cualquier otro acoplamiento adecuado en el que los polinucleótidos permanezcan estacionarios o acoplados a un sustrato en condiciones en las que se pretenda utilizar el sustrato, por ejemplo, en la amplificación o secuenciación de polinucleótidos. Los polinucleótidos que se utilizarán como cebadores de captura o como polinucleótidos diana pueden inmovilizarse de tal modo que un extremo de 3' esté disponible para la extensión enzimática y al menos una parte de la secuencia sea capaz de hibridar a una secuencia complementaria. La inmovilización puede ocurrir a través de hibridación a un oligonucleótido acoplado a la superficie, en cuyo caso el oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado puede estar en la orientación 3'-5'. Alternativamente, la inmovilización puede producirse mediante otros medios diferentes a la hibridación de emparejamiento de bases, tal como un acoplamiento covalente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “matriz” se refiere a una población de regiones de sustrato que pueden diferenciarse entre sí según la ubicación relativa. Las diferentes moléculas (tales como los polinucleótidos) que se encuentran en diferentes sitios de una matriz pueden diferenciarse entre sí según las ubicaciones de los sitios en la matriz. Una región individual de una matriz puede incluir una o más moléculas de un tipo particular. Por ejemplo, una región de sustrato puede incluir un único polinucleótido diana que tiene una secuencia particular, o una región de sustrato puede incluir varios polinucleótidos que tienen la misma secuencia (o secuencias complementarias de la misma). Las regiones de una matriz respectivamente pueden incluir características diferentes entre sí en el mismo sustrato. Como casillas ilustrativas se incluyen, sin limitación, pocillos en un sustrato, perlas (u otras partículas) en o sobre un sustrato, proyecciones desde un sustrato, crestas sobre un sustrato o canales en un sustrato. Las regiones de una matriz respectivamente pueden incluir diferentes regiones en sustratos diferentes entre sí. Pueden identificarse diferentes moléculas acopladas a diferentes sustratos según las ubicaciones de los sustratos en una superficie a la que están asociados los sustratos o según las ubicaciones de los sustratos en un líquido o gel. Como matrices ilustrativas en que se ubican distintos sustratos en una superficie se incluyen, sin limitación, las que tienen perlas en pocillos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “pluralidad” pretende significar una población de dos o más elementos diferentes. Las pluralidades pueden oscilar en tamaño desde pequeñas, medianas, grandes, hasta muy grandes. El tamaño de una pequeña pluralidad puede oscilar, por ejemplo, desde unos pocos elementos hasta decenas de elementos. Las pluralidades de tamaño mediano pueden oscilar, por ejemplo, desde decenas de elementos hasta aproximadamente 100 elementos o cientos de elementos. Las pluralidades grandes pueden oscilar, por ejemplo, desde aproximadamente cientos de elementos hasta aproximadamente 1000 elementos, hasta miles de elementos y hasta decenas de miles de elementos. Las pluralidades muy grandes pueden oscilar, por ejemplo, desde decenas de miles de elementos hasta aproximadamente cientos de miles, un millón, millones, decenas de millones y hasta cientos de millones de elementos o más. Por lo tanto, el tamaño de una pluralidad puede oscilar entre dos y más de cien millones de elementos, así como todos los tamaños, medidos por el número de elementos, intermedios y mayores que los rangos ilustrativos anteriores. Las pluralidades de polinucleótidos ilustrativos incluyen, por ejemplo, poblaciones de aproximadamente 1×10^5 o más, 5×10^5 o más, o 1×10^6 o más polinucleótidos diferentes. En consecuencia, la definición del término pretende incluir todos los valores enteros mayores que dos. Puede establecerse un límite superior de una pluralidad, por ejemplo, mediante la diversidad teórica de secuencias de polinucleótidos en una muestra.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “bicatenario”, cuando se utiliza en referencia a un polinucleótido, pretende significar que todos o sustancialmente todos los nucleótidos del polinucleótido están unidos por enlaces de hidrógeno a los nucleótidos respectivos en un polinucleótido complementario. Un polinucleótido “parcialmente” bicatenario puede tener al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % de sus nucleótidos, pero menos que todos sus nucleótidos, unidos por enlaces de hidrógeno a los nucleótidos de un polinucleótido complementario.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “monocatenario”, cuando se utiliza en referencia a un polinucleótido, significa que esencialmente ninguno de los nucleótidos del polinucleótido está unido por enlace de

hidrógeno a un nucleótido respectivo en un polinucleótido complementario. Un polinucleótido que tiene una “incapacidad” para hibridar a otro polinucleótido puede ser monocatenario.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido diana” pretende significar un polinucleótido que es el objeto de un análisis o acción. El análisis o la acción incluyen someter el polinucleótido a amplificación, secuenciación y/u otro procedimiento. Un polinucleótido diana puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales a una secuencia diana a analizarse. Por ejemplo, un polinucleótido diana puede incluir uno o más adaptadores, incluido un adaptador que funciona como un sitio de unión al cebador, que flanquean una secuencia de polinucleótidos diana que va a analizarse. Un polinucleótido diana hibridado a un cebador de captura puede incluir nucleótidos que se extienden más allá del extremo 5' o 3' del oligonucleótido de captura de tal modo que no todo el polinucleótido diana es propicio para extensión. En ejemplos particulares, los polinucleótidos diana pueden tener secuencias diferentes entre sí, pero pueden tener un primer y un segundo adaptadores que son iguales entre sí. Los dos adaptadores que pueden flanquear una secuencia polinucleotídica diana particular pueden tener la misma secuencia entre sí, o secuencias complementarias entre sí, o los dos adaptadores pueden tener secuencias diferentes. Por lo tanto, las especies en una pluralidad de polinucleótidos diana pueden incluir regiones de secuencia conocida que flanquean regiones de secuencia desconocida que van a evaluarse, por ejemplo, mediante secuenciación (por ejemplo, SBS). En algunos ejemplos, los polinucleótidos diana llevan un adaptador en un único extremo, y tal adaptador puede estar ubicado en el extremo 3' o en el extremo 5' del polinucleótido diana. Los polinucleótidos diana pueden utilizarse sin ningún adaptador, en cuyo caso una secuencia de unión al cebador puede provenir directamente de una secuencia que se encuentra en el polinucleótido diana.

Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se utilizan indistintamente en la presente memoria. Los diferentes términos no pretenden indicar ninguna diferencia particular de tamaño, secuencia, u otra propiedad, a menos que se indique específicamente de cualquier otro modo. Para mayor claridad de la descripción, los términos pueden utilizarse para distinguir una especie de polinucleótido de otra cuando se describe un método o composición particular que incluye varias especies de polinucleótidos.

Como se utiliza en la presente memoria, cuando el término “amplicón” se utiliza en referencia a un polinucleótido, pretende significar un producto para copiar el polinucleótido, en donde el producto tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente la misma que, sustancialmente complementaria a, al menos una parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido. “Amplificación” y “amplificar” se refieren al proceso de fabricar un amplicón de un polinucleótido. Un primer amplicón de un polinucleótido diana puede ser una copia complementaria. Los amplicones adicionales son copias que se crean, después de la generación del primer amplicón, a partir del polinucleótido diana o del primer amplicón. Un amplicón posterior puede tener una secuencia que es sustancialmente complementaria al polinucleótido diana o sustancialmente idéntica al polinucleótido diana. Se entenderá que un pequeño número de mutaciones (p. ej., debido a artefactos de amplificación) de un polinucleótido puede ocurrir cuando se genera un amplicón de ese polinucleótido.

Una región de sustrato que incluye sustancialmente solo amplicones de un polinucleótido dado puede denominarse “monoclonal”, mientras que una región de sustrato que incluye amplicones de polinucleótidos que tienen secuencias diferentes entre sí puede denominarse “policlonal”. Una región de sustrato que incluye un número suficiente de amplicones de un polinucleótido dado para utilizarse para secuenciar ese polinucleótido puede denominarse “funcionalmente monoclonal”. Ilustrativamente, una región de sustrato en la que aproximadamente el 60 % o más de los amplicones son de un polinucleótido dado puede considerarse “funcionalmente monoclonal”. Adicionalmente, o alternativamente, una región de sustrato de la que aproximadamente el 60 % o más de una señal proviene de amplicones de un polinucleótido dado puede considerarse “funcionalmente monoclonal”. Una región policlonal de un sustrato puede incluir diferentes subregiones en el mismo que respectivamente son monoclonales. Cada una de estas regiones monoclonales, ya sea dentro de una región policlonal más grande o por sí sola, puede corresponder a una “agrupación” generada a partir de una “semilla”. La “semilla” puede referirse a un único polinucleótido diana, mientras que la “agrupación” puede referirse a una colección de amplicones de ese polinucleótido diana.

Composiciones y métodos para amplificar polinucleótidos

Los ejemplos proporcionados en la presente memoria se refieren generar agrupaciones que sean sustancialmente monoclonales, proporcionando cebadores de captura con características seleccionadas en la(s) región(es) de sustrato en la(s) que van a generarse las agrupaciones. Los ejemplos de la presente memoria son particularmente adecuados para generar agrupaciones para utilizar en lecturas de extremo pareadas simultáneas en las que la secuencia de un polinucleótido amplificado se lee utilizando SBS en una primera región de sustrato, y esa secuencia complementaria del polinucleótido se lee utilizando SBS en un segundo sustrato, en paralelo entre sí, pero debe entenderse que los ejemplos son generalmente aplicables a cualquier tipo de agrupación.

En algunos ejemplos, aunque la siembra con varios polinucleótidos puede producirse en cualquier parte de la primera y la segunda regiones de sustrato según la distribución de Poisson, los cebadores de captura acoplados al sustrato en la primera y la segunda regiones pueden seleccionarse de tal modo que un polinucleótido diana que se capture lo suficientemente cerca del límite entre esas regiones se amplifique preferiblemente en comparación con los polinucleótidos que se capturan más lejos del límite. Tal amplificación preferencial puede lograrse, en algunos

ejemplos, acortando un subconjunto de los cebadores de captura (p. ej., cebadores P5*) en la primera región en comparación con otros cebadores de captura (p. ej., cebadores P7 de longitud completa) en la primera región, acortando un subconjunto de otros cebadores de captura (p. ej., cebadores P7*) en la segunda región en comparación con otros cebadores de captura (p. ej., cebadores P5 de longitud completa), y proporcionando polinucleótidos diana que tienen adaptadores cortos (p. ej., versiones acortadas de cP5 y cP7). Como se explica con mayor detalle a continuación, estos diversos cebadores de captura acortados y adaptadores acortados pueden desviar la amplificación para ciertos polinucleótidos diana que pueden acoplarse al sustrato. Por ejemplo, un polinucleótido diana que forma una semilla en el límite entre la primera y la segunda regiones puede amplificarse más fácilmente que los polinucleótidos que forman semillas lo suficientemente lejos del límite. El amplicón resultante, en comparación con el polinucleótido diana, puede extenderse para incluir adaptadores de longitud completa (p. ej., adaptadores cP5 y cP7 de longitud completa), facilitando de este modo la amplificación posterior de ese amplicón en la primera y la segunda regiones del sustrato.

Por ejemplo, las figuras 3A-3J ilustran esquemáticamente composiciones y operaciones ilustrativas en un flujo de proceso para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato. Haciendo referencia primero a la figura 3A, la composición 3000 incluye el sustrato 300 y una pluralidad de cebadores acoplados al mismo. En este ejemplo, el sustrato 300 incluye la primera región 301 y la segunda región 302, que pueden estar adyacentes entre sí. Opcionalmente, la primera región 301 y la segunda región 302 pueden tener diferentes tratamientos superficiales entre sí, p. ej., diferentes polímeros entre sí, o el mismo polímero entre sí pero con diferentes restos unidos a las mismas, a las que pueden acoplarse selectivamente los diferentes cebadores de captura. Como se explica más adelante, los cebadores acoplados respectivamente a la primera y la segunda regiones 301, 302 pueden incluir cebadores de captura que difieren entre sí en al menos una característica, y cebadores de captura ortogonales que difieren entre sí en al menos una característica, para inhibir la amplificación de los polinucleótidos diana que se hibridan a tales cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales en regiones suficientemente alejadas del límite 310 entre la primera y la segunda regiones.

Por ejemplo, la primera pluralidad de cebadores 331 de captura puede acoplarse a la primera región 301 del sustrato 300, y la segunda pluralidad de cebadores 341 de captura puede acoplarse a la segunda región 302 del sustrato 300. Los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden ser más largos que los cebadores 331 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. La primera pluralidad de cebadores 332 de captura ortogonales puede acoplarse a la primera región 301 del sustrato 300, y la segunda pluralidad de cebadores 342 de captura ortogonales puede acoplarse a la segunda región 302 del sustrato. Los cebadores 342 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden ser más cortos que los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

Ilustrativamente, los cebadores 331 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura pueden ser, en algunos ejemplos, al menos 2 bases más cortos que los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, p. ej., pueden ser al menos 3 bases más cortos, al menos 4 bases más cortos, al menos 5 bases más cortos, al menos 6 bases más cortos, al menos 7 bases más cortos, al menos 8 bases más cortos, al menos 9 bases más cortos, o al menos 10 bases más cortos, que los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. Los cebadores 342 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden ser, en algunos ejemplos, al menos 2 bases más cortos que los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, p. ej., pueden ser al menos 3 bases más cortos, al menos 4 bases más cortos, al menos 5 bases más cortos, al menos 6 bases más cortos, al menos 7 bases más cortos, al menos 8 bases más cortos, al menos 9 bases más cortos, o al menos 10 bases más cortos que los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

No es necesario que todos los cebadores acoplados al sustrato 300 tengan longitudes diferentes entre sí. Por ejemplo, los cebadores 331 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura pueden tener, en algunos ejemplos, aproximadamente la misma longitud que los cebadores 342 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. Los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden tener, en algunos ejemplos, aproximadamente la misma longitud que los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura. Sin embargo, debe apreciarse que cualquier longitud respectiva adecuada de cebadores de captura y cebadores de captura ortogonales puede utilizarse en regiones adecuadas del sustrato 300. Como se describe con mayor detalle a continuación, las diferentes longitudes de los cebadores 331, 341 de captura entre sí en la primera y la segunda regiones, y las diferentes longitudes de los cebadores 332, 342 de captura entre sí en la primera y la segunda regiones, pueden causar que un polinucleótido diana que cae lo suficientemente cerca del límite 310 entre la primera y la segunda regiones se amplifique preferiblemente en comparación con los polinucleótidos diana que caen lo suficientemente lejos del límite 310. Entonces, ese amplicón puede amplificarse aún más preferiblemente en toda la primera y la segunda regiones en comparación con los polinucleótidos diana que se encuentran lo suficientemente lejos del límite 310, como se describe con mayor detalle a continuación.

Como se muestra en la figura 3A, la composición 3000 puede incluir además un fluido que incluye los polinucleótidos diana 351, 352, 353, p. ej., polinucleótidos que van a amplificarse y, finalmente, secuenciarse. Cada uno de los polinucleótidos diana 351, 352, 353 puede incluir un primer adaptador 354 que es complementario a los cebadores 332 de captura ortogonales, 342 de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un

segundo adaptador 355 que es complementario a los cebadores 331, 341 de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura. Los primeros adaptadores 354 de los polinucleótidos diana 351, 352, 353 pueden ser más cortos que los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. En algunos ejemplos, al menos 2 bases más cortos que los cebadores 332 de captura ortogonales, p. ej., pueden ser al menos 3 bases más cortos, al menos 4 bases más cortos, al menos 5 bases más cortos, al menos 6 bases más cortos, al menos 7 bases más cortos, al menos 8 bases más cortos, al menos 9 bases más cortos, o al menos 10 bases más cortos que los cebadores 332 de captura ortogonales. Los segundos adaptadores 355 de los polinucleótidos diana 351, 352, 353 pueden ser más cortos que los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, en algunos ejemplos, al menos 2 bases más cortos que los cebadores 341 de captura, p. ej., pueden ser al menos 3 bases más cortos, al menos 4 bases más cortos, al menos 5 bases más cortos, al menos 6 bases más cortos, al menos 7 bases más cortos, al menos 8 bases más cortos, al menos 9 bases más cortos, o al menos 10 bases más cortos que los cebadores 341 de captura. El primer y el segundo adaptadores 354, 355 pueden tener, pero no necesariamente, la misma longitud entre sí.

En un ejemplo no limitante, los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5, y los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7. Los cebadores de captura P5, que son comercializados por Illumina, Inc. (San Diego, California) tienen la secuencia 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' (Id. de sec. n.º: 1). Los cebadores de captura P7, que también son comercializados por Illumina, Inc., tienen la secuencia 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (Id. de sec. n.º: 2). En algunos ejemplos, los cebadores 331 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son cebadores de captura P5 acortados (que pueden denominarse P5* en la presente memoria), y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7 acortados (que pueden denominarse P7*) en la presente memoria. Por ejemplo, las secuencias dadas anteriormente para P5 y P7 pueden acortarse desde el extremo 3' entre aproximadamente 2 y 10 bases para formar los cebadores de captura P5 acortados (P5*) y los cebadores de captura P7 acortados (P7*), respectivamente. En algunos ejemplos, los cebadores de captura P7 acortados (P7*) pueden tener la secuencia 5'-TTTTTCAAGCAGAAGACGGC-3' (Id. de sec. n.º: 3). En algunos ejemplos, los cebadores de captura P5 acortados (P5*) pueden tener la secuencia 5'-TTTTAATGATACGGCGACCA-3' (Id. de sec. n.º: 4).

Los segundos adaptadores 355 pueden ser adaptadores P5 complementarios acortados (que pueden denominarse cP5* en la presente memoria), p. ej., pueden ser versiones acortadas de los adaptadores P5 complementarios de longitud completa (que pueden denominarse cP5 en la presente memoria). Los adaptadores P5 complementarios de longitud completa (cP5) pueden tener la secuencia 5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3' (Id. de sec. n.º: 5) y son comercializados por Illumina, Inc. Los adaptadores P5 complementarios acortados (cP5*) pueden tener la secuencia 3'-GCGACCACCGAGATCTACAC-5' (Id. de sec. n.º: 6). Los primeros adaptadores 354 pueden ser adaptadores P7 complementarios acortados (que pueden denominarse cP7* en la presente memoria), p. ej., pueden ser versiones acortadas de los adaptadores P7 complementarios de longitud completa (que pueden denominarse cP7 en la presente memoria). Los adaptadores P7 complementarios de longitud completa (cP7) pueden tener la secuencia 5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' (Id. de sec. n.º: 7) y son comercializados por Illumina, Inc. Los adaptadores P7 complementarios acortados (cP7*) pueden tener la secuencia 3'-GACGGCATACGAGAT-5' (Id. de sec. n.º: 8), donde la G indicada en negrita puede, en algunos ejemplos ser 8-oxo-G, que puede ser un resto escindible tal como se describe en otra parte de la presente memoria. Ilustrativamente, las secuencias anteriores para cP5 y cP7 pueden acortarse desde el extremo 3' o el extremo 5', o desde el extremo 3' y el extremo 5', en aproximadamente 2 a 10 bases para formar los adaptadores cP7 acortados (cP7*) y los adaptadores cP5 acortados (cP5*).

Como se ilustra en la figura 3B, los adaptadores 354, 355 del primer, segundo, y tercer polinucleótidos diana 351, 352, 353 pueden hibridar aleatoriamente a diferentes cebadores de captura en diferentes ubicaciones del sustrato 300, p. ej., según la distribución de Poisson. En el ejemplo particularmente ilustrado, el primer adaptador 354 del polinucleótido diana 351 se hibrida a un cebador 332 de captura ortogonal de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales en la primera región 301 del sustrato 300 para formar el dúplex 361. El segundo adaptador 355 del polinucleótido diana 352 se hibrida a un cebador 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura en la segunda región 302 del sustrato 300 para formar el dúplex 362. El primer adaptador 354 del polinucleótido diana 353 se hibrida a un cebador 332 de captura ortogonal de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales en la primera región 301 del sustrato 300 para formar el dúplex 363. Los dúplex resultantes de tales hibridaciones iniciales entre adaptadores y cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales pueden tener temperaturas de fusión (T_m) mayores que aproximadamente 40 °C, p. ej., mayores que aproximadamente 45 °C, o mayores que aproximadamente 50 °C, o mayores que aproximadamente 55 °C, o mayores que aproximadamente 60 °C, o mayores que aproximadamente 65 °C, o mayores que aproximadamente 70 °C, p. ej., pueden ser relativamente estables en la temperatura de reacción u otra temperatura a la que se mantenga la composición 3000. Sin embargo, como se describe en la presente memoria, las ubicaciones particulares del sustrato en las que los adaptadores de los polinucleótidos diana se hibridan inicialmente a cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales afectan el grado en que se amplifican tales polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos diana que inicialmente se hibridan suficientemente cerca del límite 310 entre la primera y la segunda regiones 301, 302 de sustrato pueden amplificarse fácilmente en comparación con los polinucleótidos que inicialmente se hibridan lo suficientemente lejos de ese límite.

Por ejemplo, como se ilustra en la figura 3C, después de las hibridaciones iniciales descritas con referencia a la figura 3B, cada uno del primer, segundo, y tercer polinucleótidos diana 351, 352, 353 pueden amplificarse, p. ej., formando el primer amplicón 351', el segundo amplicón 352', y el tercer amplicón 353' respectivamente. Después de tal amplificación, el primer, segundo, y tercer polinucleótidos 351, 352, 353 pueden deshibridarse de un modo tal como se ilustra en la figura 3D, mientras que el primer, segundo, y tercer amplicones 351', 352', 353' permanecen unidos covalentemente al sustrato 300. Obsérvese que tal deshibridación no necesita realizarse necesariamente. Por ejemplo, en lugar de deshibridar el primer, segundo, y tercer polinucleótidos diana 351, 352, 353, tales polinucleótidos pueden permanecer hibridados al sustrato y pueden amplificarse adicionalmente utilizando un proceso de invasión de cadenas tal como es conocido en la técnica y puede denominarse ExAmp.

Como se ilustra en la figura 3E, después de las amplificaciones iniciales descritas con referencia a las figuras 3C-3D, los amplicones resultantes pueden doblarse para hibridar potencialmente a otros cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales en el sustrato 300. Por ejemplo, el primer adaptador 354 del segundo amplicón 352' puede hibridar insuficientemente a un segundo de los cebadores 342 de captura ortogonales para estar estable a la temperatura de reacción. Por ejemplo, debido a que cada uno de los cebadores 342 de captura ortogonales es relativamente corto, y el primer adaptador 354 del segundo amplicón 352' es relativamente corto, el segundo amplicón 352' puede no ser capaz de doblarse lo suficiente como para alinear suficientemente la secuencia de cualquiera de los cebadores 342 de captura ortogonales con la secuencia del adaptador 354. Como tal, cualquier dúplex formado entre el primer adaptador 354 del segundo amplicón y cualquier cebador 342 de captura ortogonal puede tener una temperatura de fusión (T_m) que esté por debajo de la temperatura de reacción, y por lo tanto cualquier dúplex de este tipo puede fundirse con la suficiente rapidez como para inhibir la amplificación del segundo amplicón 352'. Por ejemplo, cualquier dúplex 365 que resulte de una hibridación parcial como máximo entre el primer adaptador 354 del segundo amplicón 352' y cualquiera de los cebadores 342 de captura ortogonales puede tener una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C, p. ej., de menos de aproximadamente 15 °C, de menos de aproximadamente 10 °C, o de menos de aproximadamente 5 °C. Ilustrativamente, utilizando las secuencias ilustrativas proporcionadas anteriormente, un cebador P7 de captura acortado (P7*) puede superponerse a un adaptador P7 complementario acortado (cP7*) solo en aproximadamente 5 bases o menos, y un cebador P5 de captura acortado (P5*) puede superponerse a un cebador P5 complementario acortado en solo aproximadamente 10 bases o menos, o aproximadamente 9 bases o menos, o aproximadamente 8 bases o menos, o aproximadamente 7 bases o menos, o aproximadamente 6 bases o menos, o aproximadamente 5 bases o menos, o aproximadamente 4 bases o menos, o aproximadamente 3 bases o menos, o aproximadamente 2 bases o menos, o aproximadamente 1 base, o ninguna base. Como tal, a la temperatura de reacción, es poco probable que se forme un dúplex de este tipo durante un período de tiempo suficiente para que una polimerasa (no ilustrada específicamente) comience a formar un amplicón del segundo amplicón 352' utilizando cualquier cebador 342 de captura ortogonal como un cebador para tal amplificación. Similarmente, el segundo adaptador 355 del primer amplicón 351' puede ser incapaz de hibridar suficientemente a ninguno de los cebadores 331 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. Por ejemplo, debido a que cada uno de los cebadores 331 de captura es relativamente corto, y el adaptador 355 es relativamente corto, el primer amplicón 351' puede no ser capaz de doblarse lo suficiente como para poner la secuencia del adaptador 355 en contacto suficiente con la secuencia de cualquiera de los cebadores 331 de captura. Tal incapacidad para hibridar suficientemente puede inhibir la amplificación del primer amplicón 351', p. ej., puede inhibir que una polimerasa (no ilustrada específicamente) pueda formar un amplicón del primer amplicón 351' utilizando cualquier cebador 331 de captura como cebador para tal amplificación.

En comparación, el tercer amplicón 353' está lo suficientemente cerca del límite 310 entre la primera y la segunda regiones 301, 302 del sustrato 300 como para que el segundo adaptador 355 de ese amplicón pueda cruzar el límite para hibridar completamente a un cebador 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura en la segunda región 302 del sustrato 300 para formar el dúplex 366. Por ejemplo, dado que el cebador 341 de captura es de longitud completa, aunque el adaptador 355 sea relativamente corto, el tercer amplicón 353' puede doblarse lo suficiente como para alinear la secuencia del adaptador 355 con la secuencia del cebador 341 de captura. La hibridación del segundo adaptador 355 del tercer amplicón 353' al cebador 341 de captura puede promover la amplificación del tercer amplicón 353', y por lo tanto promover una mayor amplificación del polinucleótido diana 353.

Por ejemplo, el dúplex 366 resultante de la hibridación entre el adaptador 355 del tercer amplicón 353' y el cebador 341 de captura puede tener una temperatura de fusión (T_m) de más de aproximadamente 40 °C, p. ej., de más de aproximadamente 45 °C, o de más de aproximadamente 50 °C, o de más de aproximadamente 55 °C, o de más de aproximadamente 60 °C, o de más de aproximadamente 65 °C, o de más de aproximadamente 70 °C. Como tal, a la temperatura de reacción, es probable que se forme el dúplex 366 (así como el dúplex 363 descrito con referencia a la figura 3B) durante un período de tiempo suficiente para que una polimerasa (no ilustrada específicamente) comience a formar un amplicón del tercer amplicón 353' utilizando el cebador 341 de captura como un cebador para tal amplificación.

Como tal, un polinucleótido diana (o un amplicón del mismo) que puede considerarse “suficientemente cerca del límite” puede hibridar a un cebador de captura en un lado del límite 310, y puede hibridar a un cebador de captura ortogonal en el otro lado del límite 310. Se apreciará que cuanto más largo sea el polinucleótido diana (o amplicón), más lejos del límite podrá hibridar a un cebador de captura en un lado del límite 310 y a un cebador de captura ortogonal en el otro lado del límite 310. Ilustrativamente, un polinucleótido diana (o amplicón) con una longitud de 500 bases puede

ser aproximadamente 150 nm de largo. Por lo tanto, dependiendo de dónde hibride inicialmente el polinucleótido diana (o amplicón), hasta aproximadamente 150 nm a cada lado del límite 310 pueden estar “suficientemente cerca del límite” para ese polinucleótido. Por el contrario, un polinucleótido diana (o amplicón) con una longitud de 250 bases puede ser aproximadamente 75 nm de largo, mientras que un polinucleótido diana (o amplicón) con una longitud de 1000 bases puede tener una longitud de aproximadamente 300 nm. En cualquiera de estos ejemplos, la distancia a través del límite 310 que el polinucleótido diana (o amplicón) puede alcanzar y, por lo tanto, amplificarse preferiblemente, se refiere a la longitud física de ese polinucleótido diana (o amplicón).

La figura 3F ilustra la composición de la figura 3E después de otra operación de amplificación. Puede observarse que la composición incluye un amplicón 353'' adicional del amplicón 353'. Tal amplicón adicional puede hibridar al amplicón 353'. Como se muestra en la figura 3F, la operación de amplificación puede extender el primer y segundo adaptadores 354, 355 del amplicón 353'' adicional para formar adaptadores 354', 355' extendidos (p. ej., de longitud completa) utilizando las secuencias del primer cebador 332 de captura ortogonal y el segundo cebador 341 de captura, respectivamente. En comparación, la composición puede no incluir ningún amplicón adicional de los amplicones 351', 352', p. ej., porque la hibridación insuficiente de los adaptadores de esos amplicones a los cebadores de captura o los cebadores de captura ortogonales puede inhibir cualquier amplificación de esos amplicones. La operación de amplificación puede repetirse cualquier número adecuado de veces para generar amplicones adicionales de los amplicones 353', 353'', cuyos adaptadores 354', 355' de longitud completa de cada uno pueden hibridar fácilmente con los respectivos cebadores 331, 342 de captura acortados o a los cebadores 332, 341 de captura de longitud completa, según sea apropiado. Por ejemplo, como se muestra en la figura 3G, un primer adaptador 354' de longitud completa del amplicón 353' puede hibridar con un cebador 332 de captura ortogonal de la primera pluralidad de cebadores de captura en la primera región 301, y un segundo adaptador 355' de longitud completa del amplicón 353'' puede hibridar con un cebador 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura en la segunda región 302. Como se muestra en la figura 3H, después de otra operación de amplificación, pueden formarse amplicones 356', 356'' adicionales del polinucleótido diana 353. Si las operaciones de amplificación se repiten hasta que la primera y segunda regiones 401, 402 de sustrato estén llenas, los adaptadores de los amplicones resultantes pueden no necesariamente hibridar a los correspondientes cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales, y por lo tanto los amplicones pueden extenderse linealmente alejándose del sustrato, como se ilustra en la figura 3I.

Las operaciones de amplificación pueden realizarse cualquier número de veces adecuado para llenar sustancialmente la primera y la segunda regiones 301, 302 de sustrato con al menos agrupaciones funcionalmente monoclonales, y en algunos ejemplos agrupaciones sustancialmente monoclonales, p. ej., con amplicones del polinucleótido diana 353. Por ejemplo, los amplicones dentro de cada una de la primera y la segunda regiones 301, 302 de sustrato pueden incluir cada uno al menos aproximadamente un 60 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 70 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 80 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 90 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 95 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 98 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 99 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o aproximadamente el 100 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado. Como se indicó anteriormente, en algunos ejemplos, ciertos cebadores de captura y cebadores de captura ortogonales pueden incluir restos no nucleótidos. Tales restos no nucleótidos pueden incluir, pero no se limitan a, restos de escisión a través de los cuales puede extraerse selectivamente una parte de los cebadores de captura, o grupos de bloqueo tales como los que se describen más adelante con referencia a las figuras 4A-4L. Por ejemplo, como se muestra en las figuras 3A-3I, los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden incluir restos 333 de escisión, y los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden incluir restos 343 de escisión. Los restos 333, 343 de escisión pueden estar ubicados en cualquier posición adecuada a lo largo de cualquier cebador o cebadores adecuados y pueden ser, pero no necesariamente, del mismo tipo de resto de escisión entre sí. Después de un número deseado de operaciones de amplificación adicionales, tal como las descritas con referencia a las figuras 3E-3I, las partes de los cebadores 332 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden extraerse haciendo reaccionar una enzima o reactivo adecuado con los restos 333 de escisión, y las partes de los cebadores 341 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden extraerse haciendo reaccionar una enzima o reactivo adecuado con los restos 343 de escisión. La enzima o reactivo utilizado con los restos 333 de escisión puede ser igual o diferente que la enzima o el reactivo utilizado con los restos 343 de escisión. Como se ilustra en la figura 3J, la reacción de los restos 333 de escisión elimina los polinucleótidos de una orientación en la primera región 301 de sustrato, y la reacción de los restos 334 de escisión elimina los polinucleótidos de la otra orientación en la segunda región 302 de sustrato, de tal modo que pueden realizarse lecturas de extremo pareadas simultáneas en las dos regiones de sustrato. Los amplicones linealizados resultantes en la primera y la segunda regiones 301, 302 de sustrato pueden ser al menos funcionalmente monoclonales y pueden ser sustancialmente monoclonales.

En la presente memoria también se describen otros métodos para generar regiones sustancialmente monoclonales de un sustrato. Ilustrativamente, en otros ejemplos descritos en la presente memoria, la siembra con polinucleótidos diana y la amplificación se realizan en una primera región del sustrato, mientras que los cebadores en una segunda región del sustrato pueden bloquearse, de modo que tal amplificación no pueda realizarse inicialmente en esa región. Los cebadores de la segunda región se desbloquean a continuación. Puede esperarse que el polinucleótido diana que

más se ha amplificado en la primera región, se amplifique aún más en la segunda región, mejorando así la monoclonalidad.

Por ejemplo, las figuras 4A-4L ilustran esquemáticamente composiciones y operaciones ilustrativos en un flujo de proceso para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato. La composición 4000 ilustrada en la figura 4A incluye el sustrato 400 que incluye la primera región 401 y la segunda región 402 que pueden ser similares a las descritas con referencia a la figura 3A. La primera pluralidad de cebadores 431 de captura puede acoplarse a la primera región 401 del sustrato 400, y la primera pluralidad de cebadores 432 de captura ortogonales puede acoplarse a la primera región 401 del sustrato 400. La segunda pluralidad de cebadores 441 de captura puede acoplarse a la segunda región 402 del sustrato 400, y la segunda pluralidad de cebadores 442 de captura ortogonales puede acoplarse a la segunda región 402 del sustrato. En el ejemplo ilustrado en la figura 4A, todos los cebadores pueden tener las mismas longitudes entre sí. Por ejemplo, los cebadores 431 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura pueden tener aproximadamente la misma longitud que los cebadores 441 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. Los cebadores 441 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden tener aproximadamente la misma longitud que los cebadores 432 de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. Alternativamente, los cebadores de captura y los cebadores de captura ortogonales pueden tener longitudes diferentes entre sí en diferentes regiones del sustrato, p. ej., del modo tal como se describe con referencia a las figuras 3A-3J.

Una primera pluralidad de grupos 444 de bloqueo extraíbles puede acoplarse a los cebadores 441 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y una segunda pluralidad de grupos 445 de bloqueo extraíbles puede acoplarse a los cebadores 442 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. Como se describe a continuación, los grupos 444, 445 de bloqueo pueden utilizarse para inhibir la amplificación de cualquier polinucleótido diana dentro de la segunda región 402 hasta que la amplificación dentro de la primera región 401 esté sustancialmente completa; tales grupos de bloqueo pueden extraerse después para permitir la amplificación de solo ciertos amplicones que se habían generado en la primera región 401, mejorando así la monoclonalidad dentro de la segunda región 402. En un ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen grupos 3'-fosfato que pueden extraerse utilizando una enzima adecuada, tal como una fosfatasa o quinasa (en actividad inversa). En otro ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen grupos alil-T terminados por un didesoxinucleótido (ddNTP), y pueden extraerse utilizando un reactivo adecuado, tal como paladio. En otro ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen restos de 3'-O-azida que pueden extraerse utilizando un reactivo adecuado, tal como un reductor. En otro ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen restos 3'-O-NH₂ que pueden extraerse utilizando un reactivo adecuado, tal como nitrato de sodio regulado (pH 5,2). En otro ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen restos de 3'-O-alilo que pueden extraerse utilizando un reactivo adecuado, tal como paladio. En otro ejemplo no limitante, los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen restos de 3'-éster que pueden extraerse utilizando una enzima adecuada, tal como una esterasa.

Similarmemente a como se describe con referencia a las figuras 3A-3J, la composición 4000 puede incluir además un fluido que incluye los polinucleótidos diana 451, 452, 453. Cada uno de los polinucleótidos diana 451, 452, 453 puede incluir un primer adaptador 454 que es complementario a los cebadores 432, 442 de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador 455 que es complementario a los cebadores 431, 441 de captura de la primera y la segunda pluralidad de cebadores de captura. En el ejemplo no limitante ilustrado en la figura 4A, los primeros adaptadores 454 de los polinucleótidos diana 451, 452, 453 tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores 432, 442 de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y los segundos adaptadores 455 de los polinucleótidos diana 451, 452, 453 tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores 431, 441 de captura de la primera y segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales.

En un ejemplo puramente ilustrativo, los cebadores 431, 441 de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura son cebadores de captura P5, y los cebadores 432 de captura ortogonales, 443 de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales son cebadores de captura P7, tal como se ha descrito anteriormente. Los primeros adaptadores 454 pueden ser adaptadores cP7, y los segundos adaptadores 455 pueden ser adaptadores cP5 tal como se ha descrito anteriormente. Los cebadores de captura, los cebadores de captura ortogonales, y los adaptadores pueden ser todas secuencias de longitud completa, o algunas de las cuales pueden acortarse del modo tal como se describe con referencia a las figuras 3A-3J.

Similarmemente a lo descrito con referencia a la figura 3B, los adaptadores 454, 455 de los polinucleótidos diana pueden hibridar a los respectivos cebadores 431, 441 de captura o cebadores 432, 442 de captura ortogonales aleatorios, p. ej., según la distribución de Poisson. Por ejemplo, el primer adaptador 454 del polinucleótido diana 451 puede hibridar con un cebador 432 de captura ortogonal de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales para formar el dúplex 461; el primer adaptador 454 del polinucleótido diana 453 puede hibridar con un cebador 432 de captura ortogonal de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales para formar el dúplex 463; y el segundo adaptador 455 del polinucleótido diana 452 puede hibridar con un cebador 442 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura para formar el dúplex 462. Los dúplex resultantes de tales hibridaciones iniciales entre adaptadores y cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales pueden tener temperaturas de fusión (T_m)

mayores que aproximadamente 40 °C, p. ej., mayores que aproximadamente 45 °C, o mayores que aproximadamente 50 °C, o mayores que aproximadamente 55 °C, o mayores que aproximadamente 60 °C, o mayores que aproximadamente 65 °C, o mayores que aproximadamente 70 °C, p. ej., pueden ser relativamente estables en la temperatura de reacción u otra temperatura a la que se mantenga la composición 4000. Como se describe a continuación, los polinucleótidos diana 451, 453 pueden amplificarse fácilmente dentro de la primera región 401 de sustrato, mientras que los grupos 444, 445 de bloqueo en la segunda región 402 de sustrato pueden inhibir la amplificación del polinucleótido diana 402.

Por ejemplo, como se ilustra en la figura 4C, después de las hibridaciones iniciales descritas con referencia a la figura 4B, el primer y tercer polinucleótidos diana 451, 453 pueden amplificarse, p. ej., formando el primer amplicón 451' y el tercer amplicón 453' respectivamente, mientras que el grupo 444 de bloqueo puede inhibir la amplificación del segundo polinucleótido diana 452. Después de tal amplificación, el primer, segundo, y tercer polinucleótidos 451, 452, 453 pueden deshibridarse de un modo tal como se ilustra en la figura 4D, mientras que el primer, segundo, y tercer amplicones 451', 453' permanecen unidos covalentemente al sustrato 400.

Como se ilustra en la figura 4E, el segundo adaptador 455 del primer amplicón 451' puede hibridar a un cebador 431 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales para formar el dúplex 464. El segundo adaptador 455 del tercer amplicón 453' puede hibridar con un cebador 431 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura para formar el dúplex 465. De un modo similar al descrito con referencia a la figura 3E, la hibridación de los segundos adaptadores 455 de los amplicones 451', 453' a cebadores 431 de captura puede promover la amplificación de los amplicones 451', 453'. Por ejemplo, los dúplex resultantes de la hibridación entre los adaptadores 455 respectivos de los amplicones 451', 453' y los cebadores 431 de captura pueden tener una temperatura de fusión (T_m) de más de aproximadamente 40 °C, p. ej., de más de aproximadamente 45 °C, o de más de aproximadamente 50 °C, o de más de aproximadamente 55 °C, o de más de aproximadamente 60 °C, o de más de aproximadamente 65 °C, o de más de aproximadamente 70 °C. Por lo tanto, a la temperatura de reacción para la amplificación, es probable que se formen los dúplex 464, 465 (así como los dúplex 461, 463 descritos con referencia a la figura 4B) durante un período de tiempo suficiente para que una polimerasa (no ilustrada específicamente) comience a formar los respectivos amplicones de los amplicones 451', 453' utilizando los cebadores de captura o los cebadores de captura ortogonales como cebadores para tal amplificación.

Como se muestra en la figura 4F, una operación de amplificación genera un amplicón 451'' adicional del amplicón 451' y un amplicón 453'' adicional del amplicón 453', mientras que la segunda región 402 de sustrato puede no incluir ningún amplicón que pueda amplificarse adicionalmente. Por ejemplo, incluso si el primer adaptador 455 de uno de los polinucleótidos diana (o amplicones) se hibrida a uno de los cebadores 442 de captura ortogonales, el grupo 445 de bloqueo extraíble acoplado a ese cebador de captura ortogonal, puede inhibir la amplificación de ese polinucleótido diana (o amplicón). Como otro ejemplo, incluso si el segundo adaptador de uno de los polinucleótidos diana (o amplicones) se hibrida a uno de los cebadores 441 de captura, el grupo 444 de bloqueo extraíble acoplado a ese cebador de captura puede inhibir la amplificación de ese polinucleótido diana (o amplicón). Por ejemplo, el grupo 444, 445 de bloqueo puede impedir que una polimerasa comience a formar un amplicón del polinucleótido diana (p. ej., el polinucleótido diana 452) utilizando el cebador 441 de captura o el cebador 442 de captura ortogonal como cebador para tal amplificación. Obsérvese que tal inhibición de la amplificación puede lograrse alternativamente utilizando solo uno del grupo 444 de bloqueo extraíble y el grupo 445 de bloqueo extraíble, o utilizando tanto el grupo 444 de bloqueo extraíble como el grupo 445 de bloqueo extraíble.

Pueden utilizarse operaciones de amplificación adicionales para generar amplicones adicionales de polinucleótido(s) diana en la primera región 401 de sustrato, mientras que los grupos 444, 445 de bloqueo continúan inhibiendo la amplificación en la segunda región 402 de sustrato. Por ejemplo, como se muestra en la figura 4G, los adaptadores de los amplicones 451', 451'', 453', 453'' pueden hibridarse a diferentes cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales, y posteriormente amplificarse para producir aún más amplicones tal como se ilustra en la figura 4H. Si las operaciones de amplificación se repiten hasta que la primera región 401 de sustrato esté llena, los adaptadores de los polinucleótidos diana y los amplicones pueden no hibridarse necesariamente con los correspondientes cebadores de captura o cebadores de captura ortogonales, y como tales los polinucleótidos y amplicones diana pueden extenderse linealmente alejándose del sustrato.

Después de tal amplificación, puede retirarse la primera pluralidad de grupos 444 de bloqueo extraíbles, y puede retirarse la segunda pluralidad de grupos 445 de bloqueo extraíbles, tal como se muestra en la figura 4I. La extracción de los grupos 444 de bloqueo puede ser simultánea con la extracción de los grupos 445 de bloqueo, p. ej., si los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen el mismo tipo de resto entre sí. Alternativamente, los grupos 444 de bloqueo se pueden eliminar en una etapa diferente a la de los grupos 445 de bloqueo, p. ej., si los grupos 444, 445 de bloqueo incluyen diferentes tipos de restos entre sí. Como se ilustra en la figura 4J, después de eliminar la primera y la segunda pluralidades de los grupos 444, 445 de bloqueo extraíbles, el primer adaptador 454 de un amplicón de uno de los polinucleótidos diana 451, 453 se hibrida a un cebador 442 de captura ortogonal de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, p. ej., un cebador de captura ortogonal que anteriormente estaba bloqueado. Adicionalmente, como se ilustra en la figura 4J, después de extraer la primera y la segunda pluralidades de los grupos 444, 445 de bloqueo extraíbles, el segundo adaptador de un amplicón de uno de los polinucleótidos diana 451, 453 se hibrida al cebador 441 de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, p. ej., un cebador de captura que

anteriormente estaba bloqueado. Por tanto, puede entenderse que extraer los grupos de bloqueo de los cebadores 441 de captura y los cebadores 442 de captura ortogonales hace que la segunda región 402 de sustrato esté disponible para amplificaciones adicionales de los amplicones que se generaron utilizando la primera región 401 de sustrato. Los diversos amplicones pueden amplificarse aún más, dando como resultado una composición tal como la ilustrada en la figura 4K.

Además, de un modo similar al descrito con referencia a las figuras 3A-3J, los cebadores 431 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura pueden incluir restos 433 de escisión, y los cebadores 442 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden incluir restos 433 de escisión. Los restos 433, 443 de escisión pueden ser, pero no necesariamente, del mismo tipo de resto de escisión entre sí. Después de un número deseado de operaciones de amplificación tales como las descritas con referencia a las figuras 4F-4K, partes de los cebadores 431 de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura pueden extraerse haciendo reaccionar una enzima o reactivo adecuado con los restos 433 de escisión, y partes de los cebadores 442 de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden extraerse haciendo reaccionar una enzima o reactivo adecuado con los restos 443 de escisión. La enzima o reactivo utilizado con los restos 433 de escisión puede ser igual a, o diferente que, la enzima o el reactivo utilizado con los restos 443 de escisión. Como se ilustra en la figura 4L, la reacción de los restos 433 de escisión elimina los polinucleótidos de una orientación en la primera región 401 de sustrato, y la reacción de los restos 434 de escisión elimina los polinucleótidos de la otra orientación en la segunda región 402 de sustrato, de tal modo que pueden realizarse lecturas de extremo pareadas simultáneas en las dos regiones de sustrato. Cada una de las regiones 401, 402 de sustrato puede ser lo suficientemente monoclonal como para permitir lecturas de extremo pareadas simultáneas. Por ejemplo, los amplicones dentro de cada una de la primera y la segunda regiones 401, 402 de sustrato pueden incluir cada uno al menos aproximadamente un 60 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 70 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 80 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 90 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 95 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente un 98 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado, o al menos aproximadamente el 99 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado polinucleótido diana, o aproximadamente el 100 % de amplicones de un polinucleótido diana seleccionado.

Aunque los ejemplos descritos con referencia a las figuras 3A-3J y las figuras 4A-4L se ilustran para sugerir el uso de sustratos planos con una primera y una segunda regiones adyacentes entre sí, debería ser evidente que pueden utilizarse sustratos más complejos. Por ejemplo, las figuras 5A-5D ilustran esquemáticamente composiciones ilustrativas adicionales para utilizar en la amplificación de un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato. Las composiciones tales como las descritas con referencia a las figuras 5A-5D pueden utilizarse de un modo similar a los descritos con referencia a las figuras 3A-3J, p. ej., para desviar la amplificación para que sea más eficiente en un área seleccionada. En el ejemplo mostrado en sección transversal en la figura 5A y en vista en planta en la figura 5C, el sustrato 500 puede incluir una o más paredes laterales verticales 503 que proporcionan un pocillo en el que una primera región 501 del sustrato rodea la segunda región 502 del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 503 puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 501 y la segunda región 502, la primera región 501 puede ser sustancialmente anular, y la segunda región 502). Alternativamente, la segunda región 502 del sustrato puede rodear la primera región 501 del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 503 puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 501 y la segunda región 502, la segunda región 502 puede ser sustancialmente anular, y la primera región 501 puede ser sustancialmente circular). Como una alternativa adicional, la pared lateral vertical 503 puede omitirse, y el sustrato 500 puede ser sustancialmente plano en las regiones ilustradas. Se apreciará que la primera y la segunda regiones 501, 502 pueden tener cualquier forma y posición adecuadas entre sí. Por ejemplo, la segunda región 502 no tiene que ser necesariamente sustancialmente circular y no tiene que estar necesariamente dispuesta en el centro de la primera región 501. Similarmente, la primera región 501 no tiene que ser necesariamente sustancialmente anular y no tiene que rodear necesariamente la segunda región simétricamente. En cualquiera de estos ejemplos, de un modo similar al descrito con referencia a la figura 3A, los cebadores de captura relativamente cortos y los cebadores de captura ortogonales pueden acoplarse al sustrato 500 en la primera región 501, mientras que los cebadores de captura más largos (p. ej., de longitud completa) y los cebadores de captura ortogonales pueden acoplarse al sustrato 500 en la segunda región 502. Como tal, la amplificación puede desviarse para que sea más eficiente en la segunda región 502, que puede estar ubicada centralmente y donde los cebadores más largos están acoplados al sustrato 500.

En el ejemplo mostrado en sección transversal en la figura 5B y en vista en planta en la figura 5D, el sustrato 500' puede incluir una o más paredes laterales verticales 503' que proporcionan un pocillo que abarca la segunda región 502' del sustrato, y que está rodeado por la primera región 501' del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 503' puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la segunda región 502' sustancialmente circular, mientras que la primera región 501' puede ser sustancialmente anular y rodear la pared vertical 503' y la segunda región 502'). Alternativamente, la primera región 501' del sustrato puede rodear la segunda región 502' del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 503' puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 501' sustancialmente circular, mientras que la segunda región 502' puede ser sustancialmente anular y rodear la pared lateral vertical 503' y la primera región 501'). Como aun una alternativa adicional, la pared lateral vertical 503' puede omitirse, y el sustrato 500 puede ser sustancialmente plano en las regiones ilustradas. Se apreciará que la primera y la segunda regiones 501', 502' pueden tener cualquier

forma y posición adecuadas entre sí. Por ejemplo, la segunda región 502 no tiene que ser necesariamente sustancialmente circular y no tiene que estar necesariamente dispuesta en el centro de la primera región 501'. Similarmente, la primera región 501 no tiene que ser necesariamente sustancialmente anular y no tiene que rodear necesariamente la segunda región simétricamente. En cualquiera de estos ejemplos, de un modo similar al descrito con referencia a la figura 3A, los cebadores de captura relativamente cortos y los cebadores de captura ortogonales pueden acoplarse al sustrato 500 en la primera región 501, mientras que los cebadores de captura más largos (p. ej., de longitud completa) y los cebadores de captura ortogonales pueden acoplarse al sustrato 500 en la segunda región 502'. Como tal, la amplificación puede desviarse para que sea más eficiente en la segunda región 502, que puede estar ubicada centralmente y donde los cebadores más largos están acoplados al sustrato 500'.

Las figuras 6A-6D ilustran esquemáticamente ejemplos de composiciones adicionales para utilizar en la amplificación de un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato. Las composiciones tales como las descritas con referencia a las figuras 6A-6D pueden utilizarse de un modo similar a los descritos con referencia a las figuras 4A-4L, p. ej., para desviar la amplificación para que sea más eficiente en un área seleccionada. En el ejemplo mostrado en sección transversal en la figura 6A y en vista en planta en la figura 6C, el sustrato 600 puede incluir una o más paredes laterales verticales 603 que proporcionan un pocillo en el que una primera región 601 del sustrato rodea la segunda región 602 del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 603 puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 601 y la segunda región 602, la primera región 601 puede ser sustancialmente anular, y la segunda región 602). Alternativamente, la segunda región 602 del sustrato puede rodear la primera región 601 del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 603 puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 601 y la segunda región 602, la segunda región 602 puede ser sustancialmente anular, y la primera región 601 puede ser sustancialmente circular). Como aun una alternativa adicional, la pared lateral vertical 603 puede omitirse, y el sustrato 600 puede ser sustancialmente plano en las regiones ilustradas. Se apreciará que la primera y la segunda regiones 601, 602 pueden tener cualquier forma y posición adecuadas entre sí. Por ejemplo, la segunda región 602 no tiene que ser necesariamente sustancialmente circular y no tiene que estar necesariamente dispuesta en el centro de la primera región 601. Similarmente, la primera región 601 no tiene que ser necesariamente sustancialmente anular y no tiene que rodear necesariamente la segunda región simétricamente. En cualquiera de tales ejemplos, de un modo similar al descrito con referencia a la figura 4A, los cebadores de captura y los cebadores de captura ortogonales que tienen grupos de bloqueo acoplados a los mismos pueden acoplarse al sustrato 600 en la primera región 601, mientras que los cebadores de captura desbloqueados y los cebadores de captura ortogonales pueden acoplarse al sustrato 600 en la segunda región 602. Como tal, la amplificación puede desviarse para que sea más eficiente en la segunda región 602, que puede estar ubicada centralmente y donde se omiten los grupos 601 de bloqueo.

En el ejemplo mostrado en sección transversal en la figura 6B y en vista en planta en la figura 6D, el sustrato 600' puede incluir una o más paredes laterales verticales 603' que proporcionan un pocillo que abarca la segunda región 602' del sustrato, y que está rodeado por la primera región 601' del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 603' puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la segunda región 602' sustancialmente circular, mientras que la primera región 601' puede ser sustancialmente anular y rodear la pared vertical 603' y la segunda región 602'). Alternativamente, la primera región 601' del sustrato puede rodear la segunda región 602' del sustrato (p. ej., la pared lateral vertical 603' puede ser sustancialmente cilíndrica y rodear la primera región 601' sustancialmente circular, mientras que la segunda región 602' puede ser sustancialmente anular y rodear la pared lateral vertical 603' y la primera región 601'). Como aun una alternativa adicional, la pared lateral vertical 603 puede omitirse, y el sustrato 600 puede ser sustancialmente plano en las regiones ilustradas. Se apreciará que la primera y la segunda regiones 601, 602 pueden tener cualquier forma y posición adecuadas entre sí. Por ejemplo, la segunda región 602 no tiene que ser necesariamente sustancialmente circular y no tiene que estar necesariamente dispuesta en el centro de la primera región 601. Similarmente, la primera región 601 no tiene que ser necesariamente sustancialmente anular y no tiene que rodear necesariamente la segunda región simétricamente. En cualquiera de tales ejemplos, de un modo similar al descrito con referencia a la figura 4A, los cebadores de captura bloqueados y los cebadores de captura ortogonales bloqueados pueden acoplarse al sustrato 600' en la primera región 601', mientras que los cebadores de captura desbloqueados y los cebadores de captura ortogonales desbloqueados pueden acoplarse al sustrato 600' en la segunda región 602'. Como tal, la amplificación puede desviarse para que sea más eficiente en la segunda región 602, que puede estar ubicada centralmente y donde se omiten los grupos 601 de bloqueo.

Se apreciará que las composiciones ilustrativas tal como se describen en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier método adecuado para amplificar un polinucleótido. Por ejemplo, la figura 7 ilustra un flujo de operaciones ilustrativo en un método 700 para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores de diferentes longitudes en la primera y la segunda regiones de sustrato. Aunque el método 700 puede implementarse utilizando la composición 3000 descrita con referencia a las figuras 3A-3J o las composiciones descritas con referencia a las figuras 5A-5D, el método 700 puede implementarse utilizando cualquier otra composición adecuada.

Haciendo referencia ahora a la figura 7, el método 700 incluye poner en contacto una composición con un fluido (operación 710). En algunos ejemplos, la composición puede ser tal como se describe con referencia a las figuras 3A, 5A, o 5B. Ilustrativamente, la composición puede incluir un sustrato que incluye una primera región y una segunda región, p. ej., la primera región 301, 501, o 501' y la segunda región 302, 502, o 502'. Una primera pluralidad de cebadores de captura puede acoplarse a la primera región del sustrato, p. ej., los cebadores 331 de captura o los

cebadores de captura dentro de la primera región 501 o 501'. Una segunda pluralidad de cebadores de captura puede acoplarse a la segunda región del sustrato, p. ej., los cebadores 341 de captura, o los cebadores de captura dentro de la segunda región 502 o 502'. Los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura pueden ser más largos que los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. Una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales puede acoplarse a la primera región del sustrato, p. ej., los cebadores 332 de captura ortogonales, o los cebadores de captura ortogonales dentro de la primera región 501 o 501'. Una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales puede acoplarse a la segunda región del sustrato, p. ej., los cebadores 342 de captura ortogonales, o los cebadores de captura ortogonales dentro de la segunda región 502 o 502'. Los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales pueden ser más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.

El fluido puede incluir polinucleótidos diana. Cada uno de los polinucleótidos diana puede incluir un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura, p. ej., el primer y segundo adaptadores 354, 355 descritos con referencia a la figura 3A.

El método 700 puede incluir además hibridar el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana a un cebador de captura ortogonal de la primera o segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o hibridar el segundo adaptador de ese polinucleótido diana a un cebador de captura de la primera o segunda pluralidad de cebadores de captura (operación 720). Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente con referencia a la figura 3B, los polinucleótidos diana pueden distribuirse a través de la superficie del sustrato, p. ej., según la distribución de Poisson. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente con referencia a las figuras 3E-3I, para los polinucleótidos diana que hibridan lo suficientemente lejos del límite entre la primera y la segunda regiones de sustrato, los cebadores de captura acortados o los cebadores de captura ortogonales acortados en esa región del sustrato pueden inhibir totalmente o parcialmente la hibridación del otro adaptador de tales polinucleótidos. En comparación, para un polinucleótido diana que hibrida lo suficientemente cerca del límite entre la primera y la segunda regiones de sustrato, pueden generarse múltiples amplicones.

El método 700 puede incluir además amplificar el polinucleótido diana, incluyendo la amplificación generar amplicones de ese polinucleótido diana (operación 730). Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente con referencia a las figuras 3E-3I, un amplicón del polinucleótido diana que esté lo suficientemente cerca del límite entre la primera y la segunda regiones del sustrato fácilmente puede amplificarse aún más, mientras que los amplicones de los polinucleótidos diana que están suficientemente lejos del límite pueden no amplificarse más. Ilustrativamente, el método 700 puede incluir acoplar covalentemente un primer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, e hibridar completamente un segundo adaptador del primer amplicón a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, p. ej., de tal modo que el amplicón abarque el límite entre la primera y la segunda regiones del sustrato, y por lo tanto pueda amplificarse aún más. Alternativamente, el método 700 puede incluir acoplar covalentemente un segundo amplicón a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, e hibridar completamente un primer adaptador del segundo amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, p. ej., de tal modo que el amplicón abarque el límite entre la primera y la segunda regiones del sustrato, y por lo tanto pueda amplificarse aún más.

El método 700 también puede incluir acoplar covalentemente un tercer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y no poder hibridar completamente un segundo adaptador del tercer amplicón a cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. La incapacidad del segundo adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura puede amplificar el tercer amplicón, p. ej., es posible que ese amplicón no abarque el límite entre la primera y la segunda regiones del sustrato. En algunos ejemplos, cualquier dúplex parcial entre el segundo adaptador del tercer amplicón y cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C. El método 700 también o alternativamente puede incluir acoplar covalentemente un cuarto amplicón a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y no poder hibridar completamente un primer adaptador del cuarto amplicón a cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales. La incapacidad del primer adaptador para hibridar completamente a cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales puede amplificar el cuarto amplicón. Como tal, el primer o segundo amplicones pueden amplificarse aún más, mientras que el tercer y cuarto amplicones pueden no amplificarse aún más.

La figura 8 ilustra un flujo de operaciones ilustrativo en un método 800 para amplificar un polinucleótido utilizando cebadores desbloqueados en una primera región de sustrato y cebadores bloqueados de modo extraíble en una segunda región de sustrato. Aunque el método 800 puede implementarse utilizando la composición 4000 descrita con referencia a las figuras 4A-4L o las composiciones descritas con referencia a las figuras 6A-6D, el método 800 puede implementarse utilizando cualquier otra composición adecuada.

Haciendo referencia ahora a la figura 8, el método 800 puede incluir poner en contacto una composición con un fluido (operación 810). En algunos ejemplos, de un modo tal como se describe en cualquier otra parte de la presente memoria, la composición puede incluir un sustrato que incluye una primera región y una segunda región, p. ej., la primera región 401, 601 o 601' y la segunda región 402, 602 o 602'. Una primera pluralidad de cebadores de captura puede acoplarse a la primera región del sustrato, p. ej., los cebadores 431 de captura, o los cebadores de captura dentro de la primera región 601 o 601'. Una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales puede acoplarse a la primera región del sustrato, p. ej., los cebadores 432 de captura ortogonales, o los cebadores de captura ortogonales dentro de la primera región 601 o 601'. Una segunda pluralidad de cebadores de captura puede acoplarse a la segunda región del sustrato, p. ej., los cebadores 441 de captura, o los cebadores de captura dentro de la segunda región 602 o 602'. Una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales puede acoplarse a la segunda región del sustrato, p. ej., los cebadores 442 de captura ortogonales, o los cebadores de captura ortogonales dentro de la segunda región 602 o 602'. Una primera pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles (p. ej., los grupos 444 de bloqueo) puede acoplarse a los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. Una segunda pluralidad de grupos de bloqueo extraíbles (p. ej., los grupos 445 de bloqueo) puede acoplarse a los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura. El fluido puede incluir polinucleótidos diana. Cada uno de los polinucleótidos diana puede incluir un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y la segunda pluralidades de cebadores de captura, p. ej., el primer y segundo adaptadores 454, 455 descritos con referencia a la figura 4A.

El método 800 puede incluir además hibridar, respectivamente, el primer adaptador de un primer polinucleótido diana a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o hibridar el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos diana a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura (operación 820). Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente con referencia a la figura 4B, los polinucleótidos diana pueden distribuirse a través de la superficie del sustrato, p. ej., según la distribución de Poisson, y pueden hibridar con cebadores acoplados a tales regiones. Uno o más de tales polinucleótidos diana pueden estar en regiones en las que los cebadores incluyen grupos de bloqueo, y uno o más de tales polinucleótidos diana (p. ej., el primero de los polinucleótidos de diana) pueden estar en regiones en las que los cebadores no incluyen grupos de bloqueo.

El método 800 puede incluir además amplificar el primero de los polinucleótidos diana, comprendiendo la amplificación generar un amplicón del primero de los polinucleótidos diana en la primera región del sustrato (operación 830). Por ejemplo, debido a que los cebadores en la primera región del sustrato carecen de grupos de bloqueo, la amplificación puede realizarse fácilmente en la primera región del modo tal como se describe con referencia a las figuras 4F-4H. Por ejemplo, el método 800 puede incluir acoplar covalentemente un amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el amplicón un segundo adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura. Ese amplicón fácilmente puede amplificarse aún más en la primera región del sustrato. Alternativamente, el método 800 puede incluir acoplar covalentemente un amplicón a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, teniendo el amplicón un primer adaptador completamente hibridado a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales. Ese amplicón fácilmente puede amplificarse aún más en la primera región del sustrato.

En comparación, debido a que los cebadores en la segunda región del sustrato incluyen grupos de bloqueo, la amplificación puede inhibirse en la segunda región. Los grupos de bloqueo pueden inhibir la amplificación de cualquier polinucleótido diana que hibride en la segunda región del sustrato. Por ejemplo, el primer adaptador de un segundo de los polinucleótidos diana puede hibridarse a uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o en donde el segundo adaptador del segundo de los polinucleótidos diana se hibrida a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura. El grupo de bloqueo extraíble acoplado a uno de los cebadores de captura puede inhibir la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana, o el grupo de bloqueo extraíble acoplado a uno de los cebadores de captura ortogonales puede inhibir la amplificación del segundo de los polinucleótidos diana.

El procedimiento 800 puede incluir extraer la primera y la segunda pluralidades de grupos de bloqueo extraíbles (operación 840), p. ej., del modo tal como se describe con referencia a la figura 4I. El método 800 puede incluir después amplificar adicionalmente el primero de los polinucleótidos diana, comprendiendo la amplificación generar amplicones adicionales del primero de los polinucleótidos diana en la segunda región del sustrato (operación 850), p. ej., del modo tal como se describe con referencia a las figuras 4J-4K. Se apreciará que las presentes composiciones y métodos no se limitan a utilizarse las operaciones particulares descritas anteriormente. Por ejemplo, aunque las figuras 3A-3J y las figuras 4A-4L pueden considerarse operaciones consistentes con la “amplificación puente” o la “reacción en cadena de la polimerasa unida a la superficie”, se apreciará que las presentes composiciones y métodos pueden adaptarse fácilmente para utilizarse con otras realizaciones de amplificación. Una realización de amplificación tal es la “amplificación por exclusión” o ExAmp. Los métodos de amplificación de exclusión permiten la amplificación de un polinucleótido diana único por región de sustrato y la producción de una población sustancialmente monoclonal de amplicones en una región de sustrato. Por ejemplo, la velocidad de amplificación del primer polinucleótido diana capturado dentro de una región de sustrato puede ser más rápida en relación con velocidades mucho más lentas de

transporte y captura de los polinucleótidos diana en la región de sustrato. Como tal, el primer polinucleótido diana capturado en una región de sustrato puede amplificarse rápidamente y llenar toda la región de sustrato, inhibiendo de este modo la captura del polinucleótido diana adicional en la misma región de sustrato. Alternativamente, si un segundo polinucleótido diana se acopla a la misma región de sustrato después del primer polinucleótido, la amplificación relativamente rápida del primer polinucleótido puede llenar una cantidad suficiente de la región de sustrato para dar como resultado una señal que sea lo suficientemente fuerte como para realizar la secuenciación por síntesis (p. ej., la región de sustrato puede ser al menos funcionalmente monoclonal). El uso de la amplificación por exclusión también puede dar como resultado distribuciones de súper Poisson de regiones de sustrato monoclonales; es decir, la fracción de regiones de sustrato en una matriz que son funcionalmente monoclonales puede superar la fracción predicha por la distribución de Poisson.

El aumento de las distribuciones de súper Poisson de agrupaciones útiles es útil porque las regiones de sustrato más funcionalmente monoclonales pueden dar como resultado una señal de mayor calidad, y por lo tanto una SBS mejorada; sin embargo, la siembra de polinucleótidos diana en regiones de sustrato puede seguir una distribución espacial de Poisson, donde la compensación por aumentar el número de regiones de sustrato ocupadas es aumentar el número de regiones de sustrato policlonales. Un método para obtener distribuciones de super-Poisson más altas es hacer que la siembra ocurra rápidamente, seguida de un retraso entre los polinucleótidos diana sembrados. El retraso, denominado “retraso cinético” porque se cree que surge a través de cinéticas de reacciones bioquímicas, le da a un polinucleótido diana sembrado un inicio más temprano que las otras dianas sembradas. La amplificación de exclusión trabaja utilizando una recombinasa para facilitar la invasión de los cebadores (p. ej., cebadores acoplados a una región de sustrato) en el ADN bicatenario (p. ej., un polinucleótido diana) cuando la recombinasa media una coincidencia de secuencias. Las presentes composiciones y métodos pueden adaptarse para utilizarse con recombinasa para facilitar la invasión de los presentes cebadores de captura y cebadores de captura ortogonales en los presentes polinucleótidos diana cuando la recombinasa media una coincidencia de secuencias. De hecho, las presentes composiciones y métodos pueden adaptarse para utilizarse con cualquier método de amplificación de polinucleótidos basado en la superficie tal como la PCR térmica, la PCR desnaturalizada químicamente, y los métodos mediados enzimáticamente (que también pueden denominarse amplificación por recombinasa polimerasa [RPA, por sus siglas en inglés] o ExAmp).

Ejemplos de trabajo

Los siguientes ejemplos pretenden ser puramente ilustrativos, y en ninguna forma limitantes.

La figura 9 ilustra esquemáticamente una composición modelo a base de soluciones para caracterizar el efecto de la longitud del cebador de captura sobre la eficiencia de amplificación. Más específicamente, la composición modelo incluía un dúplex que incluye un primer oligonucleótido acoplado al fluoróforo (fluorescencia, FAM), hibridado a un segundo oligonucleótido que incluye un cebador P5 acoplado a un extintor (extintor de agujeros negros, BHQ, por sus siglas en inglés) de tal modo que el extintor inhibía la fluorescencia del fluoróforo. Se utilizaron un adaptador P5, una recombinasa, una polimerasa, y una pluralidad de nucleótidos para invadir el dúplex entre el primer y el segundo oligonucleótidos en un proceso de amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA o ExAmp), causando la extensión del cebador P5 invasor y la disociación del segundo oligonucleótido del primer oligonucleótido, permitiendo que el fluoróforo emitiera fluorescencia.

La figura 10 es un gráfico que ilustra la intensidad de fluorescencia que resulta de la amplificación con diferentes longitudes de cebadores de captura. Más específicamente, la traza 1001 es la intensidad de fluorescencia medida a partir de la composición modelo descrita con referencia a la figura 9, utilizando un cebador P5 de longitud completa que tenía 29 bases de largo; la traza 1002 es la intensidad medida de ese sistema utilizando un cebador P5 modificado que tenía 15 bases de largo; la traza 1003 es la intensidad medida de ese sistema utilizando un cebador P5 modificado que tenía 10 bases de largo; la traza 1004 es la intensidad medida de ese sistema utilizando un cebador P5 modificado que tenía 13 bases de largo; y la traza 1005 es la intensidad medida en ese sistema sin utilizar un cebador P5 invasor (control negativo). En la figura 10, puede observarse que la intensidad de fluorescencia inicial de la composición modelo utilizando el cebador P5 de longitud completa fue la más alta, lo que indica que este cebador se amplificó más eficazmente, lo que causó la mayor disociación del extintor del fluoróforo. La intensidad de fluorescencia de la composición modelo utilizando el cebador P5 modificado que tenía 15 bases de largo comenzó en un valor significativamente más bajo que al utilizar el cebador P5 de longitud completa, pero aumentó gradualmente hasta un valor similar al utilizar el cebador P5 de longitud completa. Las intensidades de fluorescencia de las composiciones modelo que utilizan los cebadores P5 modificados que tenían 13 y 10 bases de largo, respectivamente, fueron similares entre sí. La intensidad de fluorescencia de la composición modelo sin utilizar un cebador P5 invasor (control negativo) fue la más baja. A partir de la figura 10, puede entenderse que cabe esperar que los cebadores más cortos tengan una eficiencia de amplificación más baja. Como tal, para composiciones tales como las descritas con referencia a las figuras 3A-3J, cabe esperar que la amplificación sea menos eficaz en las regiones donde los polinucleótidos diana pueden acceder sustancialmente solo a cebadores acortados, que en la región de límite donde los polinucleótidos diana pueden acceder a cebadores más largos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para amplificar un polinucleótido, comprendiendo la composición:

un sustrato que comprende una primera región y una segunda región;
 una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato;
 una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato, siendo los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura más largos que los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura;
 una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato; y
 una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato, siendo los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales,
 comprendiendo la composición además un fluido que comprende polinucleótidos diana, comprendiendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y segunda pluralidades de cebadores de captura.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde los primeros adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y en donde los segundos adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana se hibrida con un primero de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o en donde el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos objetivo se hibrida con un primero de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura;
 opcionalmente, en donde un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el primero de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m) de más de aproximadamente 40 °C.

4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un primer amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el primer amplicón un segundo adaptador completamente hibridado con uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.

5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:

(i) la composición comprende además un segundo amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, teniendo el segundo amplicón un primer adaptador completamente hibridado con uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales; y/o

(ii) la composición comprende además un tercer amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, teniendo el tercer amplicón un segundo adaptador que no puede hibridarse completamente con ninguno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura;
 opcionalmente, en donde (a) la incapacidad del segundo adaptador para hibridarse completamente con cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura inhibe la amplificación del tercer amplicón; o (b) la incapacidad del segundo adaptador para hibridarse completamente con cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura inhibe la amplificación del tercer amplicón y cualquier dúplex parcial entre el segundo adaptador del tercer amplicón y cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C;
 y/o

(iii) la composición comprende además un cuarto amplicón acoplado covalentemente a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, teniendo el cuarto amplicón un primer adaptador que no puede hibridarse completamente con ninguno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, opcionalmente en donde la incapacidad del primer adaptador para hibridarse completamente con cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales inhibe la amplificación del cuarto amplicón.

6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son cebadores P5 de captura, y en donde los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores P7 de captura, opcionalmente en donde los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son cebadores P5 de captura acortados, y en donde los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores P7 de captura acortados.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y en donde los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde:
 - (i) los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura; y/o
 - (ii) los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura; y/o
 - (iii) la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato; y/o
 - (iv) la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato o la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.
9. Un método para amplificar un polinucleótido, comprendiendo el método:

poner en contacto una composición con un fluido, en donde la composición comprende:

un sustrato que comprende una primera región y una segunda región;
una primera pluralidad de cebadores de captura acoplados a la primera región del sustrato;
una segunda pluralidad de cebadores de captura acoplados a la segunda región del sustrato, siendo los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura más largos que los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura;
una primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la primera región del sustrato; y
una segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales acoplados a la segunda región del sustrato, siendo los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y

en donde el fluido comprende:
polinucleótidos diana, comprendiendo cada uno de los polinucleótidos diana un primer adaptador que es complementario a los cebadores de captura ortogonales de la primera y segunda pluralidades de cebadores de captura ortogonales, y un segundo adaptador que es complementario a los cebadores de captura de la primera y segunda pluralidades de cebadores de captura;
hibridar el primer adaptador de un primero de los polinucleótidos diana con uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera o segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, o hibridar el segundo adaptador del primero de los polinucleótidos objetivo con uno de los cebadores de captura de la primera o segunda pluralidad de cebadores de captura; y a continuación
amplificar el primero de los polinucleótidos diana, comprendiendo la amplificación generar un amplicón del primero de los polinucleótidos diana.
10. El método de la reivindicación 9, en donde los primeros adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y en donde los segundos adaptadores de los polinucleótidos diana son más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura.
11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde:
 - (i) un dúplex formado a partir de la hibridación entre el primer adaptador del primero de los polinucleótidos diana y el primero de los cebadores de captura ortogonales tiene una temperatura de fusión (T_m) de más de aproximadamente 40 °C; y/o

- (ii) el amplicón se hibrida con el primero de los polinucleótidos diana, opcionalmente en donde el método comprende además deshibridar el primero de los polinucleótidos diana, y a continuación amplificar el amplicón; y/o
- 5 (iii) el método comprende además acoplar covalentemente un primer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, e hibridar completamente un segundo adaptador del primer amplicón con uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura; y/o
- 10 (iv) el método comprende además acoplar covalentemente un segundo amplicón a uno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, e hibridar completamente un primer adaptador del segundo amplicón con uno de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales; y/o
- 15 (v) el método comprende además acoplar covalentemente un tercer amplicón a uno de los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales, y no poder hibridar por completo un segundo adaptador del tercer amplicón con ninguno de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura, opcionalmente en donde la incapacidad del segundo adaptador para hibridar completamente con cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura los cebadores inhibe la amplificación del tercer amplicón; y/o
- 20 (vi) cualquier dúplex parcial entre el segundo adaptador del tercer amplicón y cualquiera de los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tiene una temperatura de fusión (T_m) de menos de aproximadamente 20 °C; y/o
- 25 (vii) el método comprende además acoplar covalentemente un cuarto amplicón a uno de los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y no poder hibridar completamente un primer adaptador del cuarto amplicón con cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales, opcionalmente en donde la incapacidad del primer adaptador para hibridar completamente con cualquiera de los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales inhibe la amplificación del cuarto amplicón.
- 30 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura son cebadores P5 de captura, y en donde los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores P7 de captura;
- 35 opcionalmente, en donde los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son cebadores P5 de captura acortados y los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son cebadores P7 de captura acortados.
- 40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura, y en donde los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura ortogonales son al menos 5 bases más cortos que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura ortogonales.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde:
- (i) los cebadores de captura de la primera pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la segunda pluralidad de cebadores de captura; y/o
- 50 (ii) los cebadores de captura de la segunda pluralidad de cebadores de captura tienen aproximadamente la misma longitud que los cebadores de captura ortogonales de la primera pluralidad de cebadores de captura; y/o
- (iii) la primera región del sustrato es adyacente a la segunda región del sustrato; y/o
- (iv) la primera región del sustrato rodea la segunda región del sustrato o
- 55 la segunda región del sustrato rodea la primera región del sustrato.

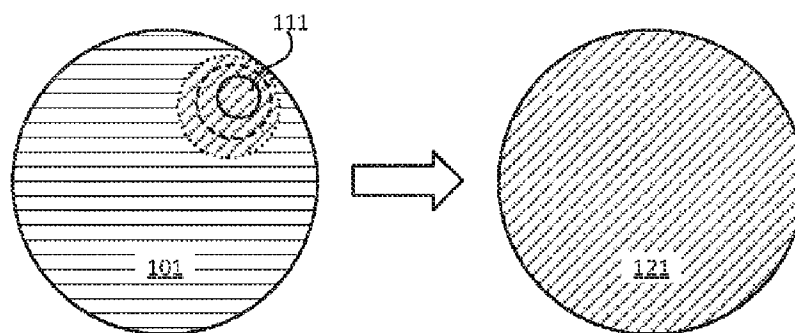


Fig. 1A

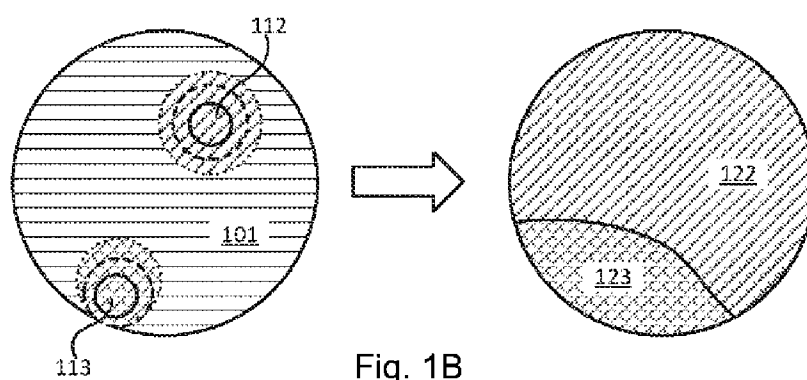


Fig. 1B

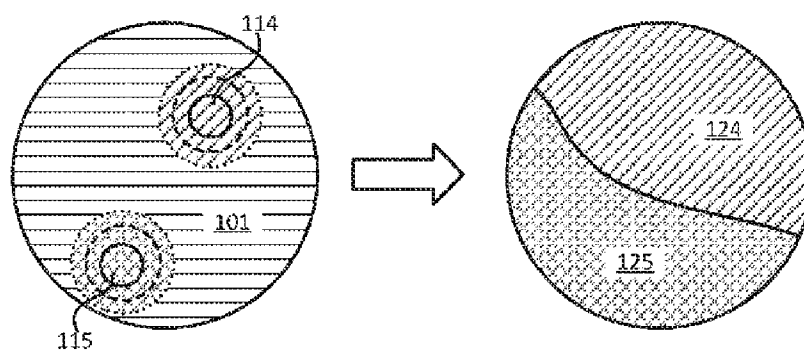


Fig. 1C

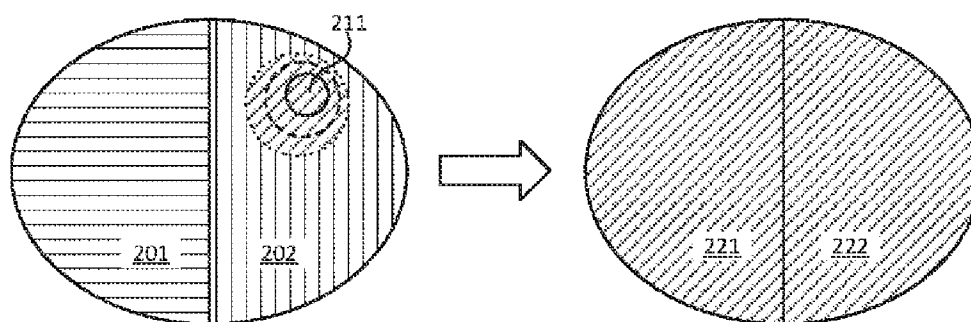


Fig. 2A

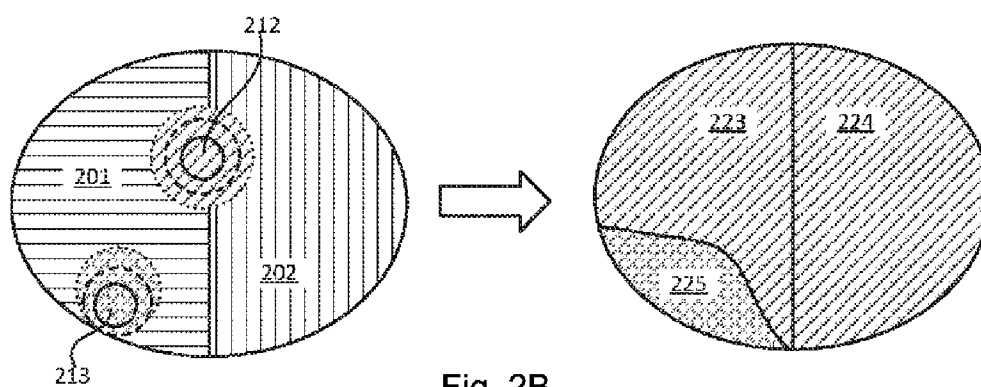


Fig. 2B

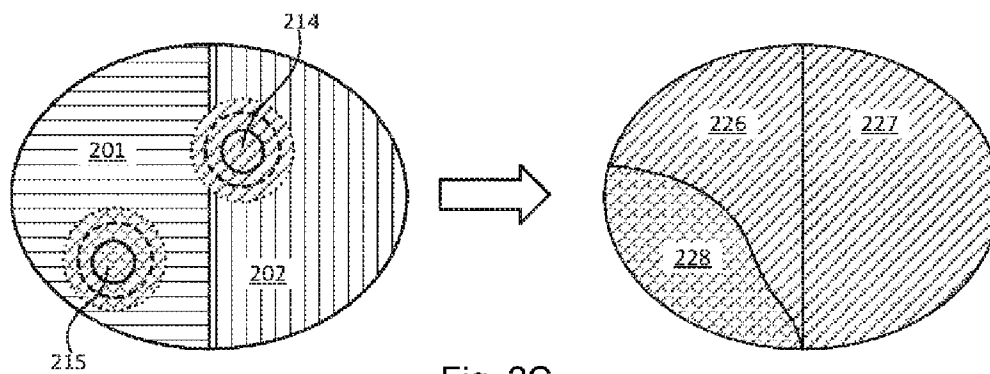


Fig. 2C

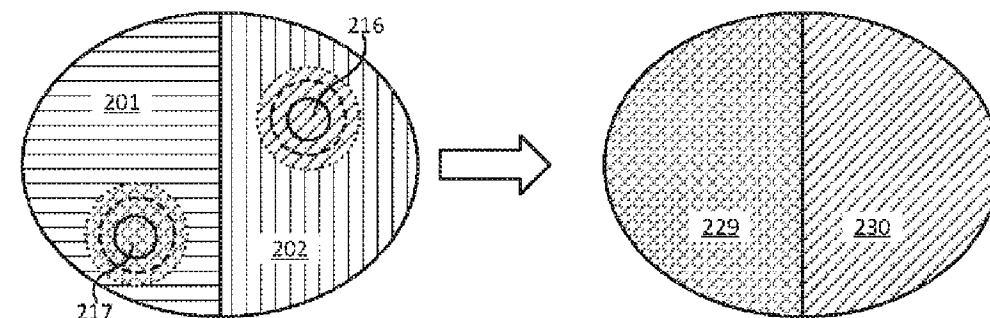
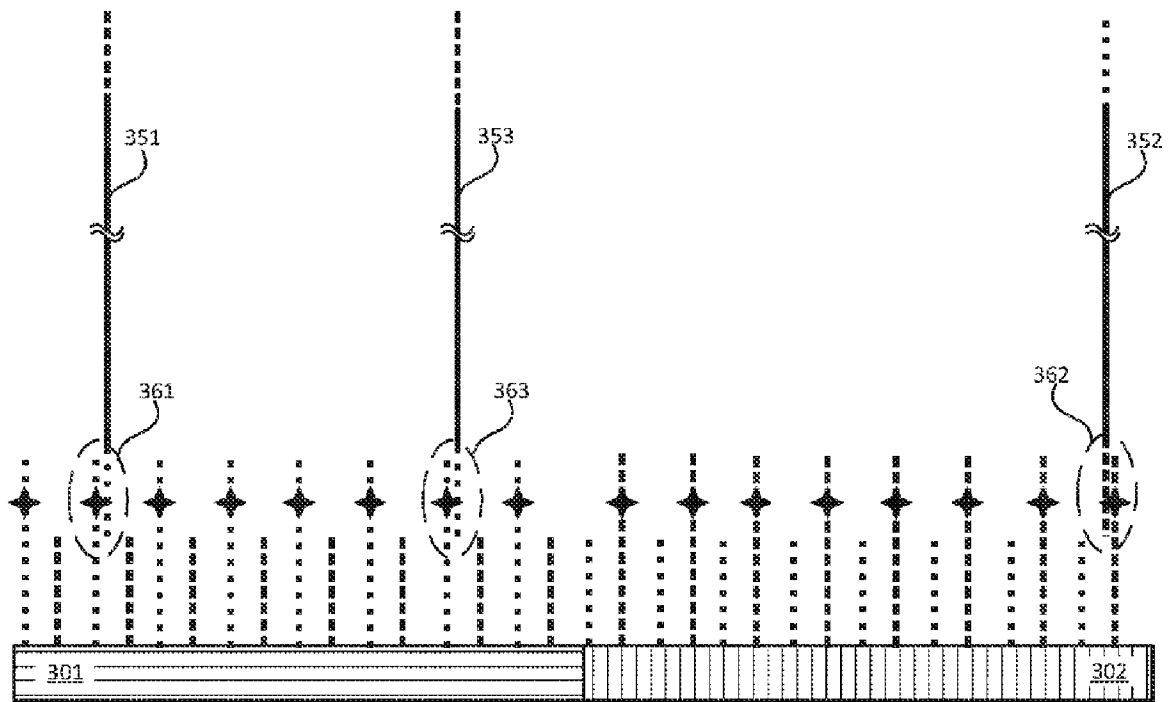
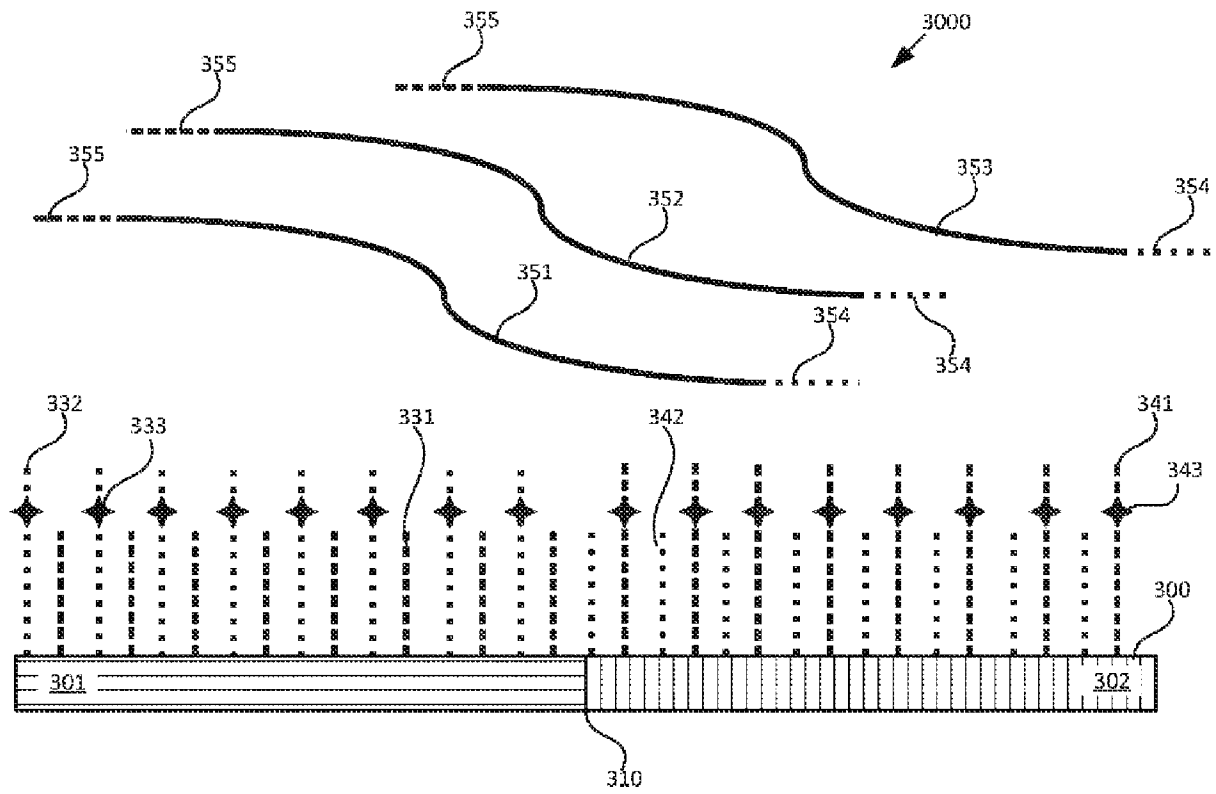


Fig. 2D



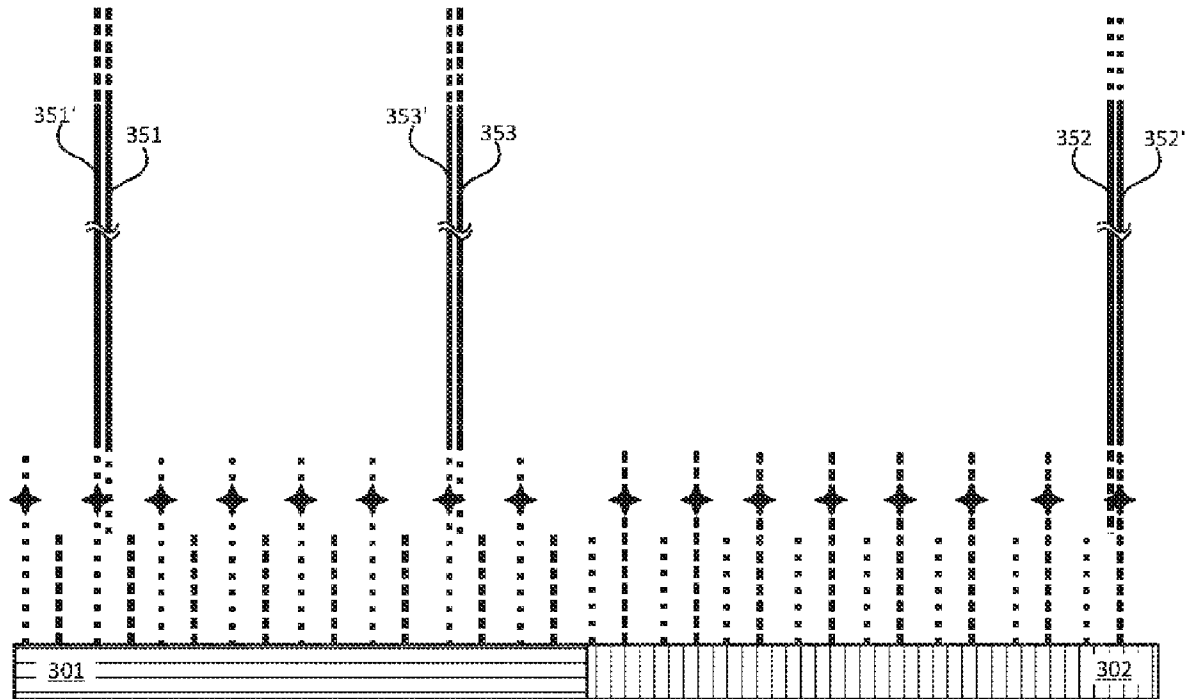


Fig. 3C

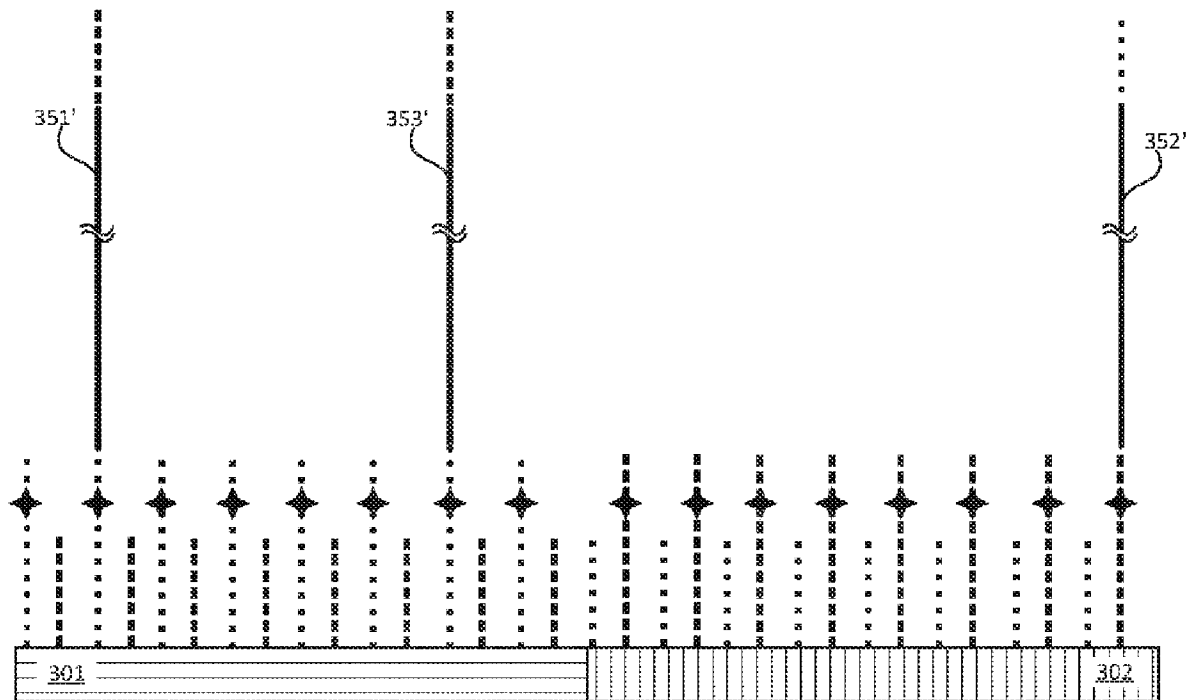


Fig. 3D

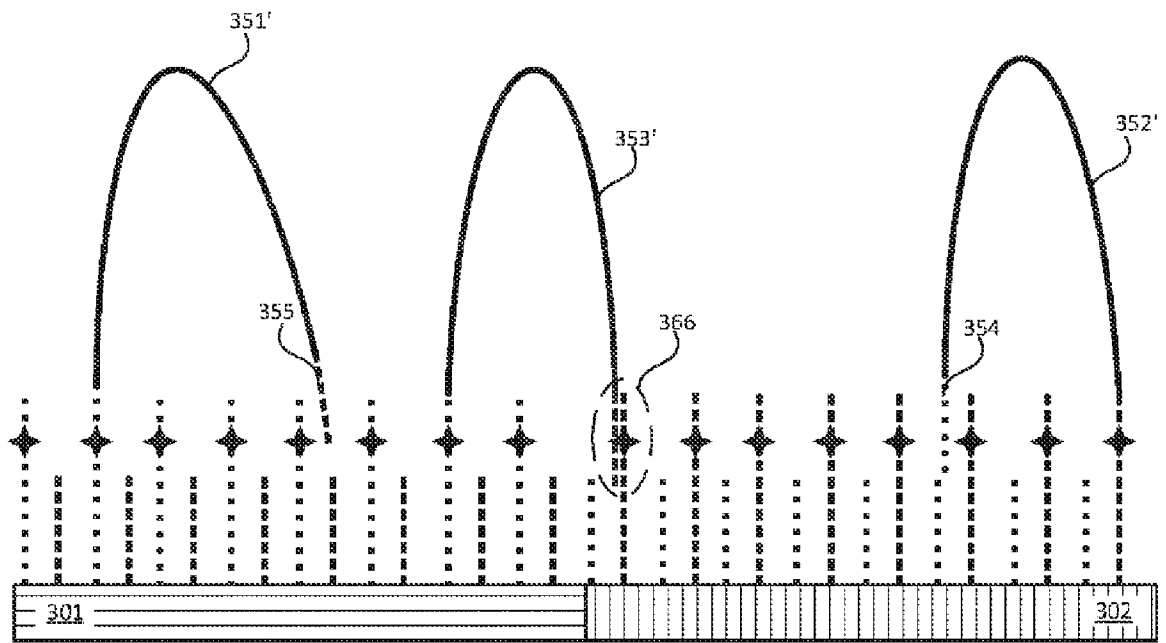


Fig. 3E

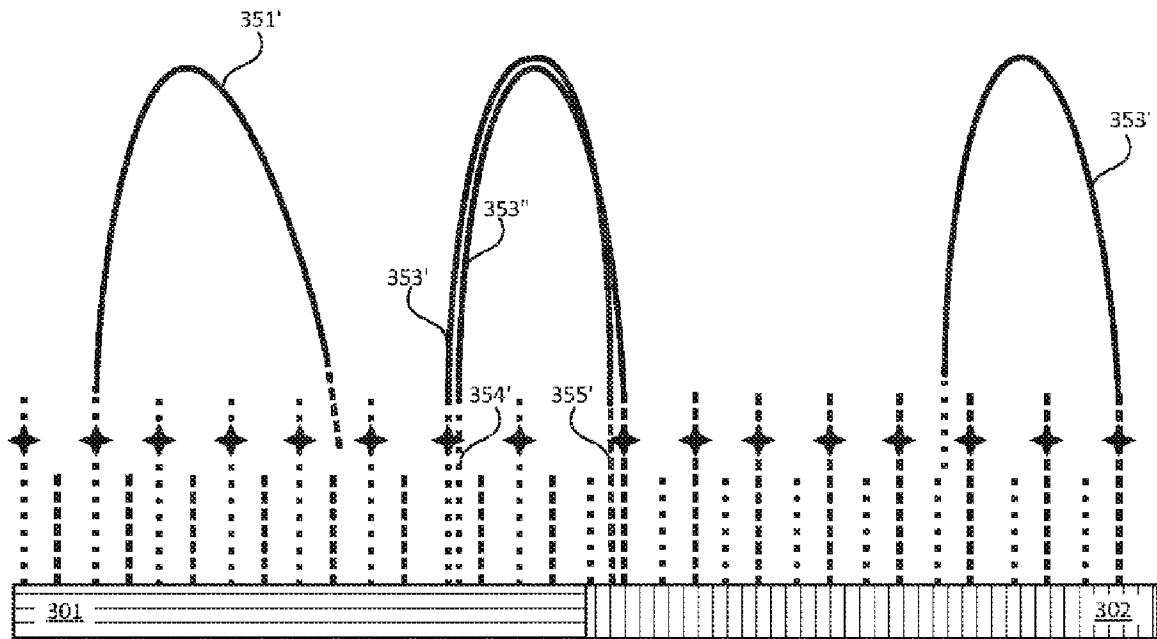


Fig. 3F

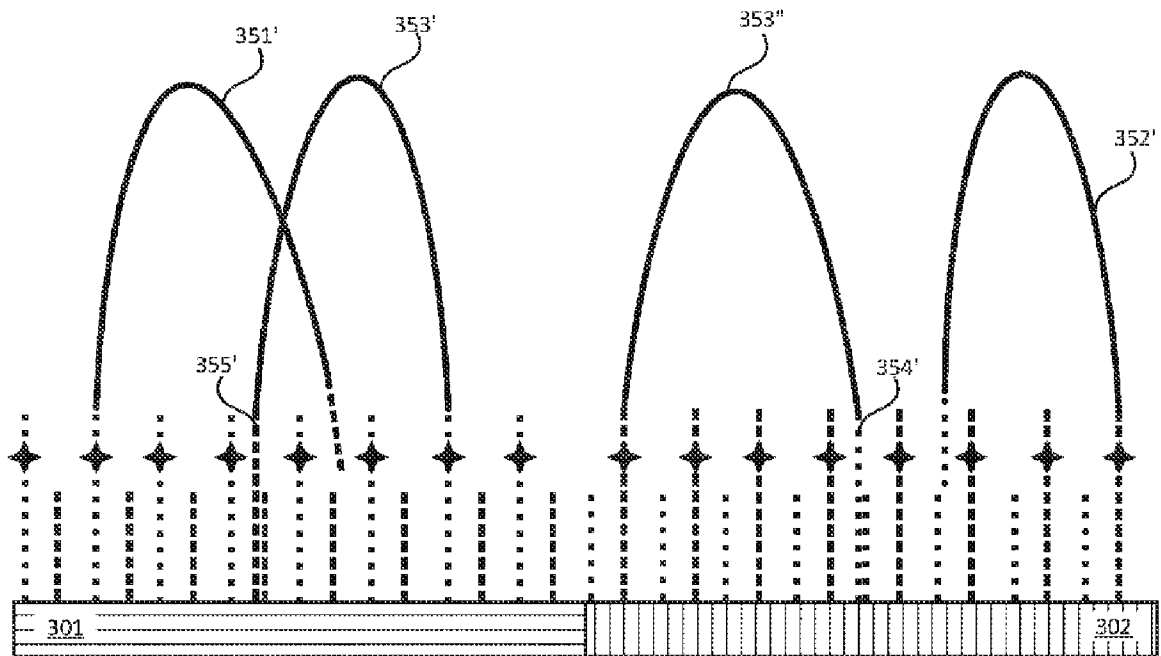


Fig. 3G

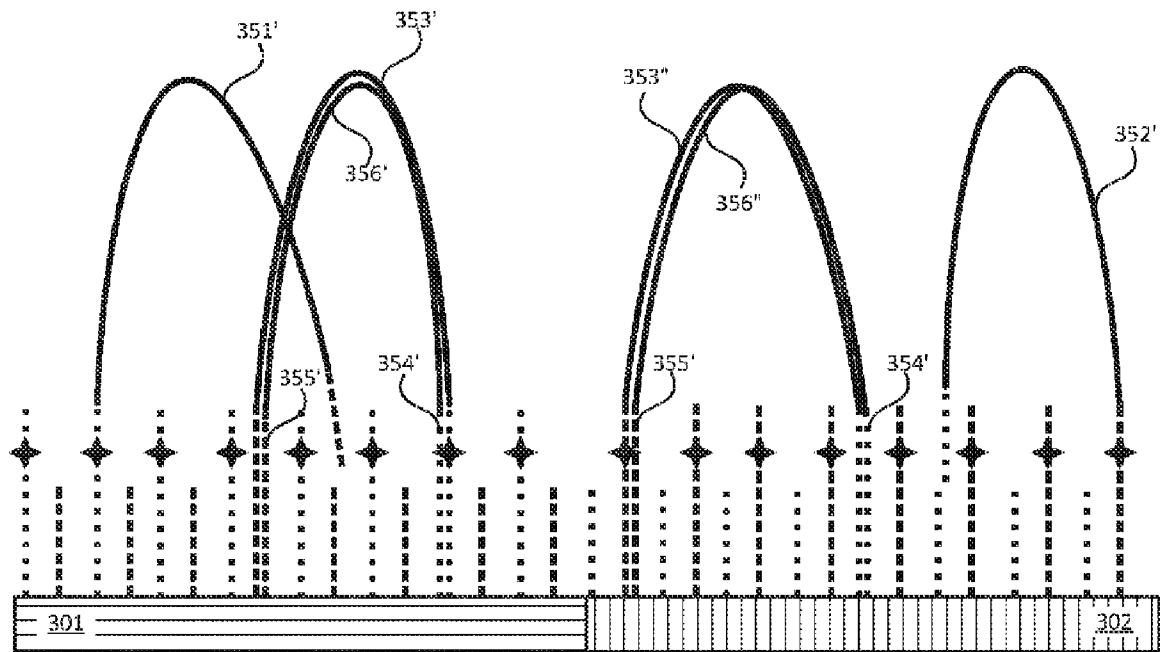


Fig. 3H

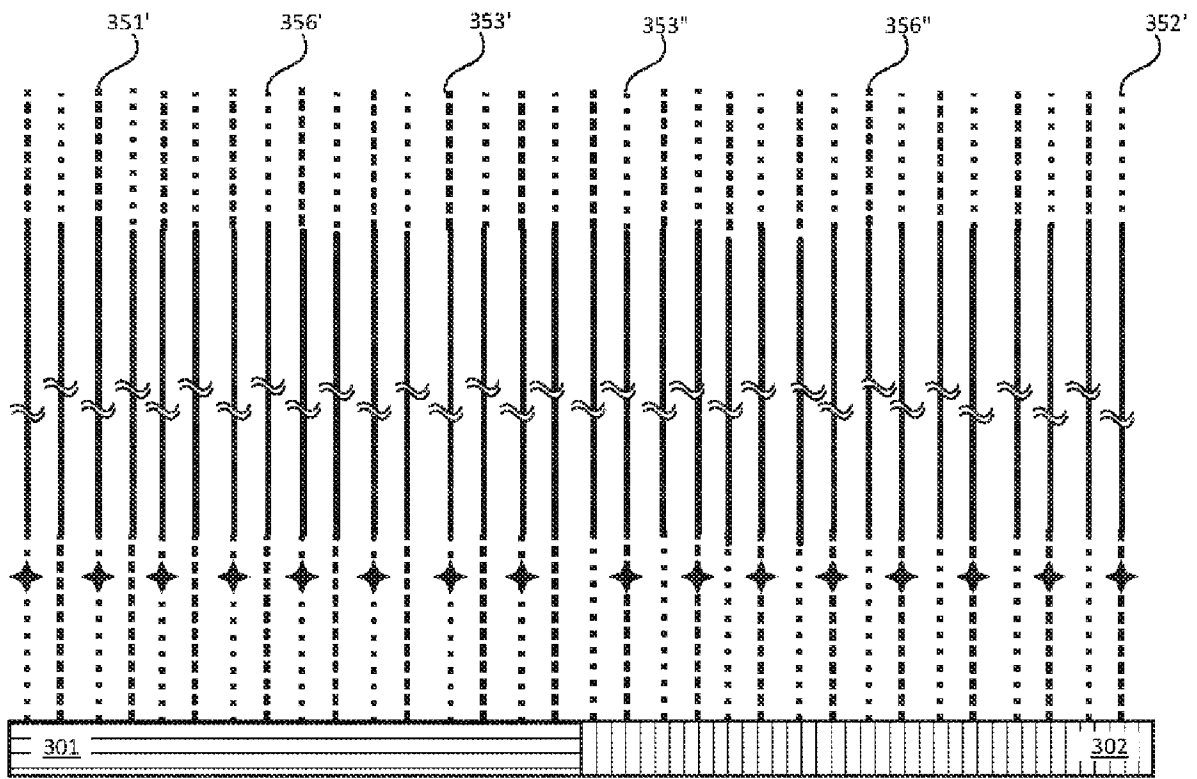


Fig. 3I

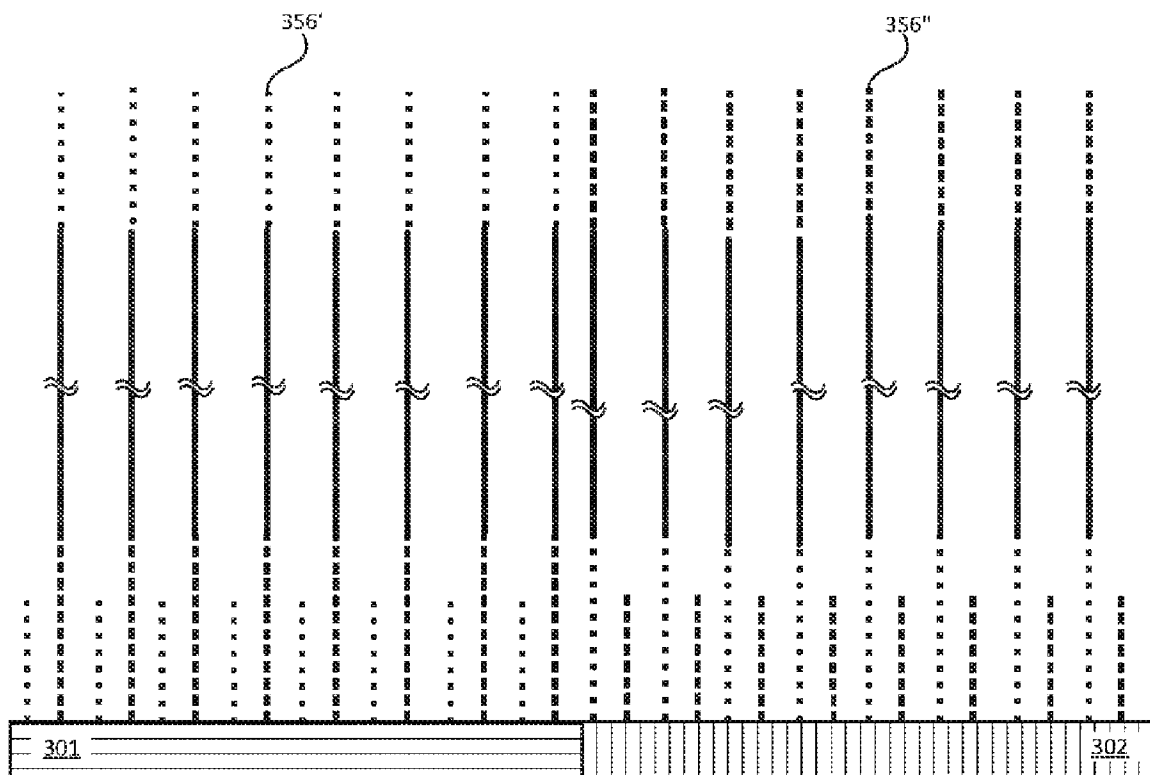


Fig. 3J

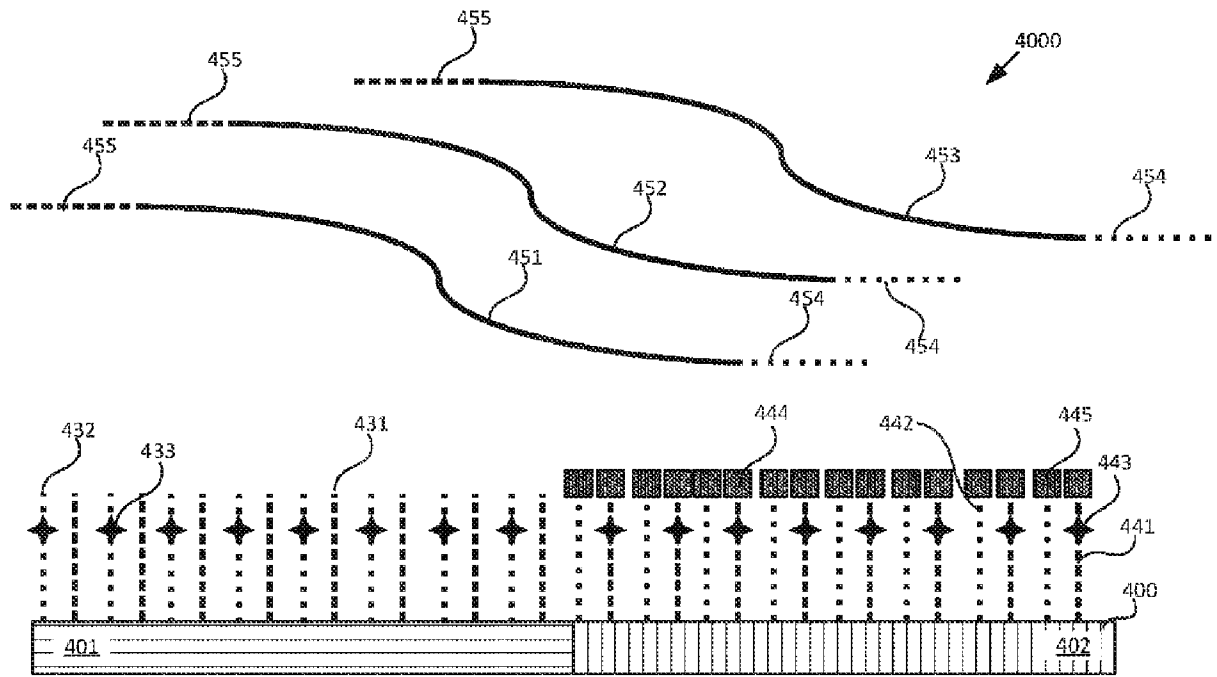


Fig. 4A

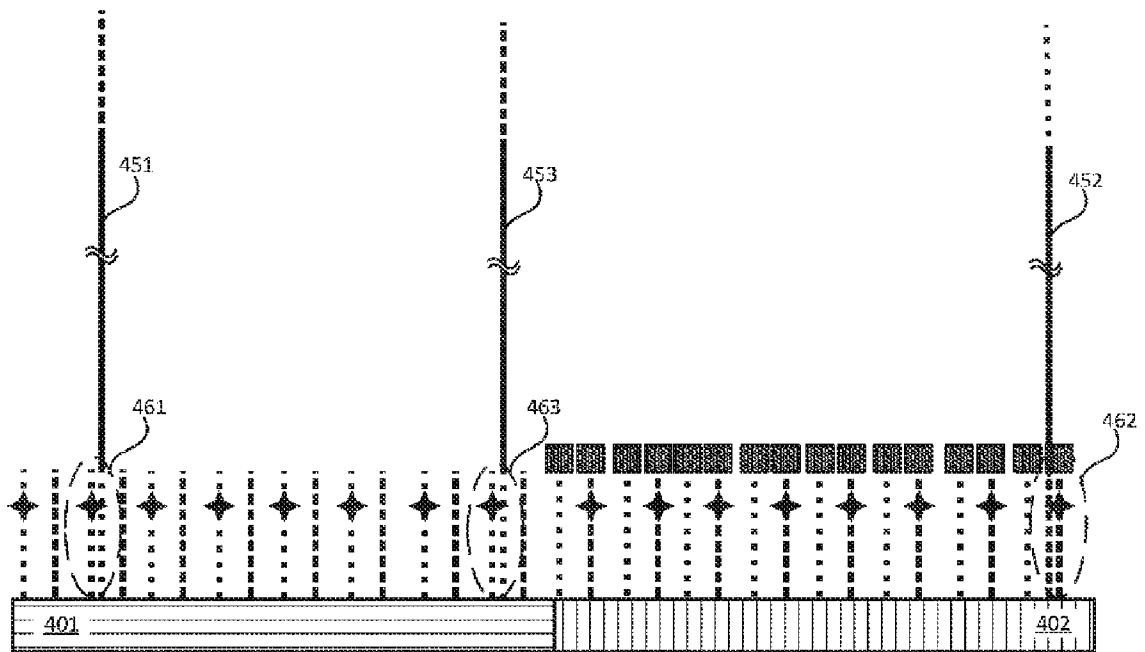


Fig. 4B

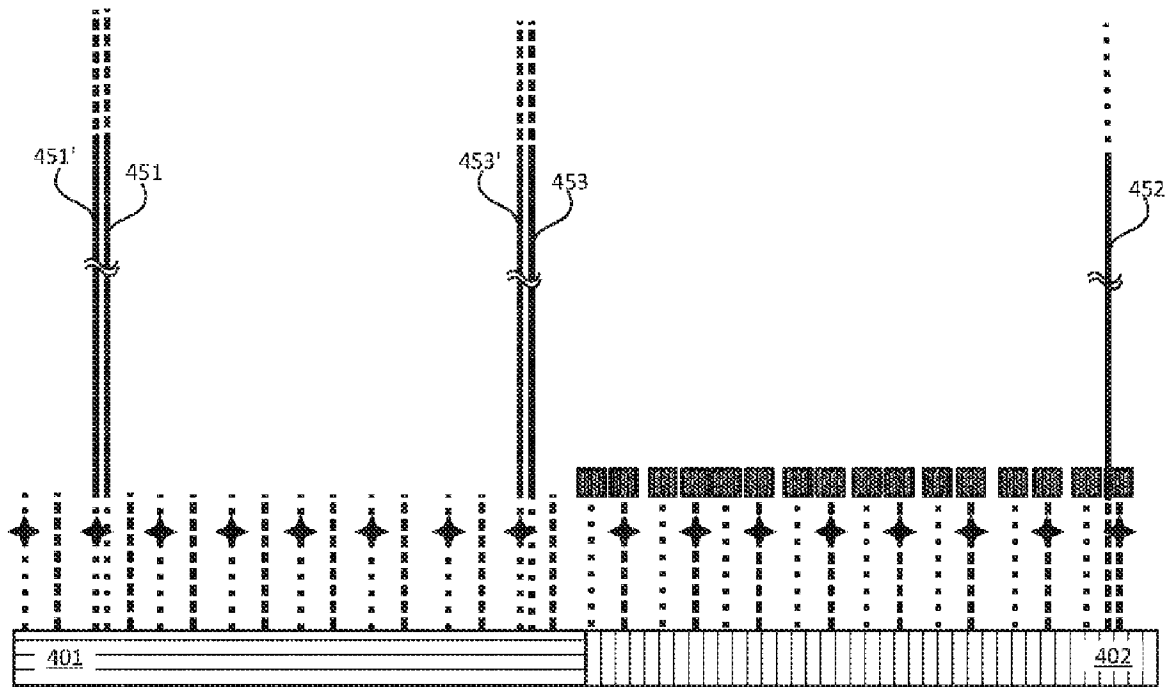


Fig. 4C

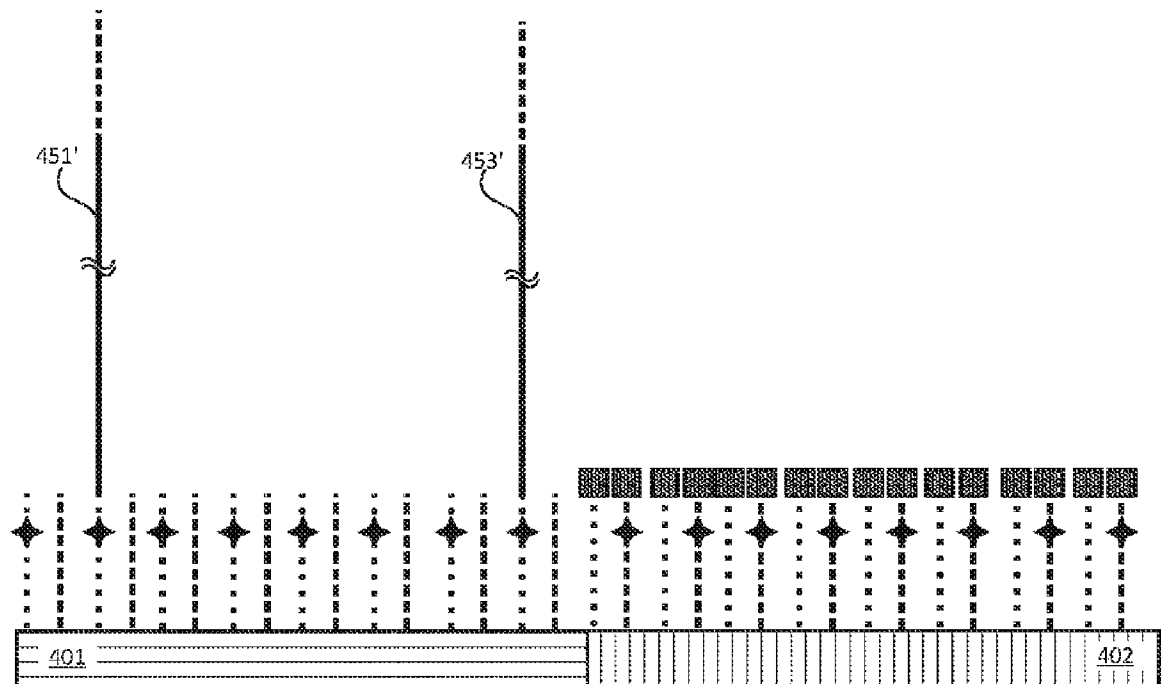
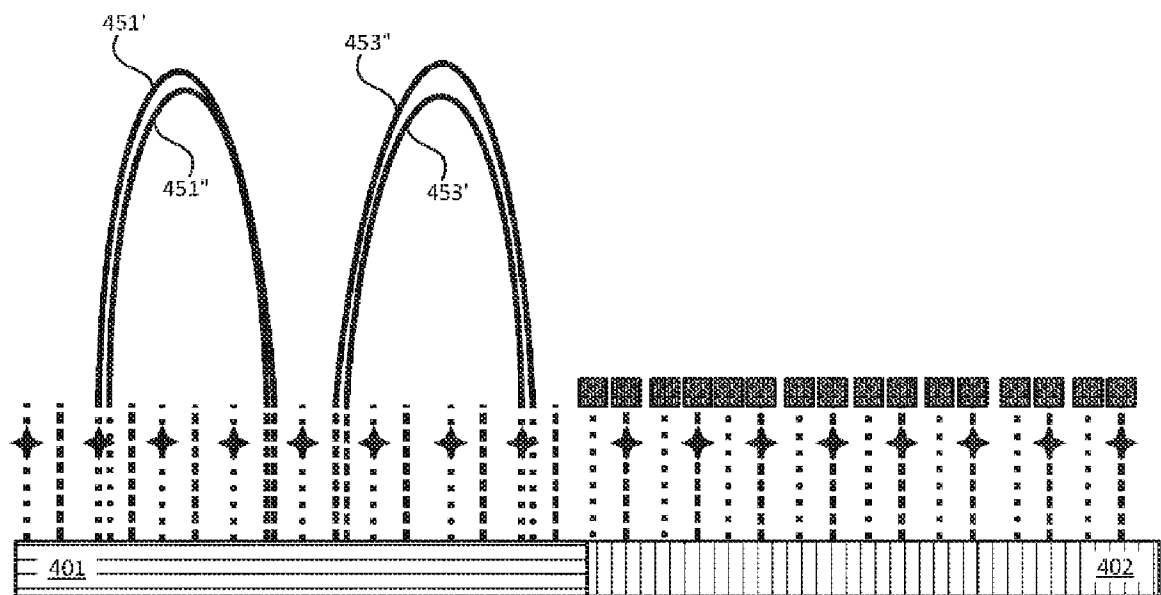
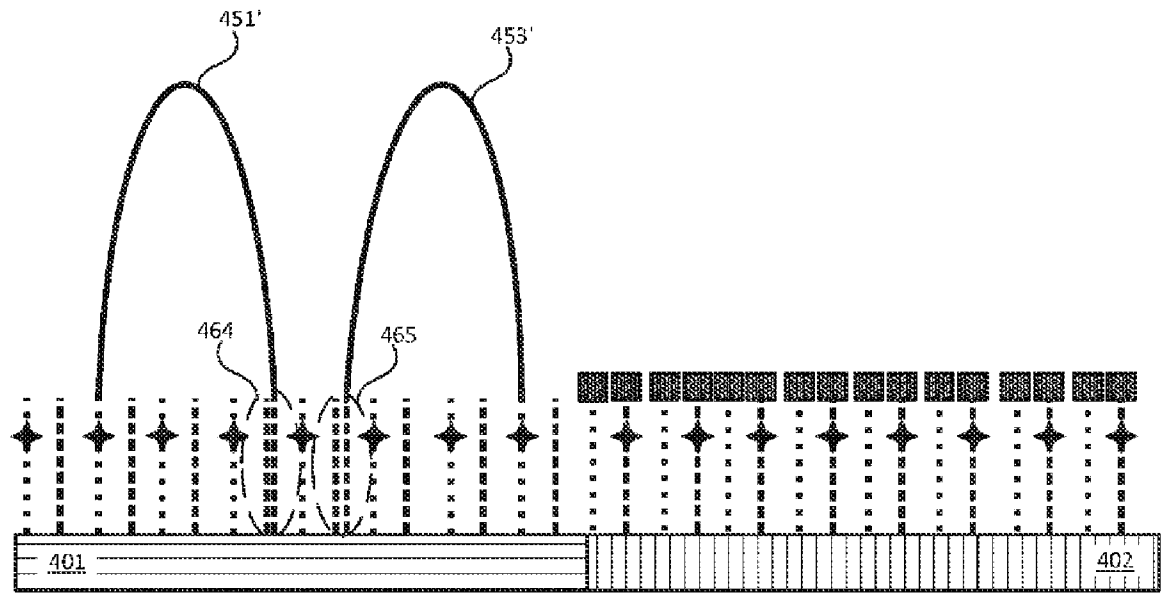
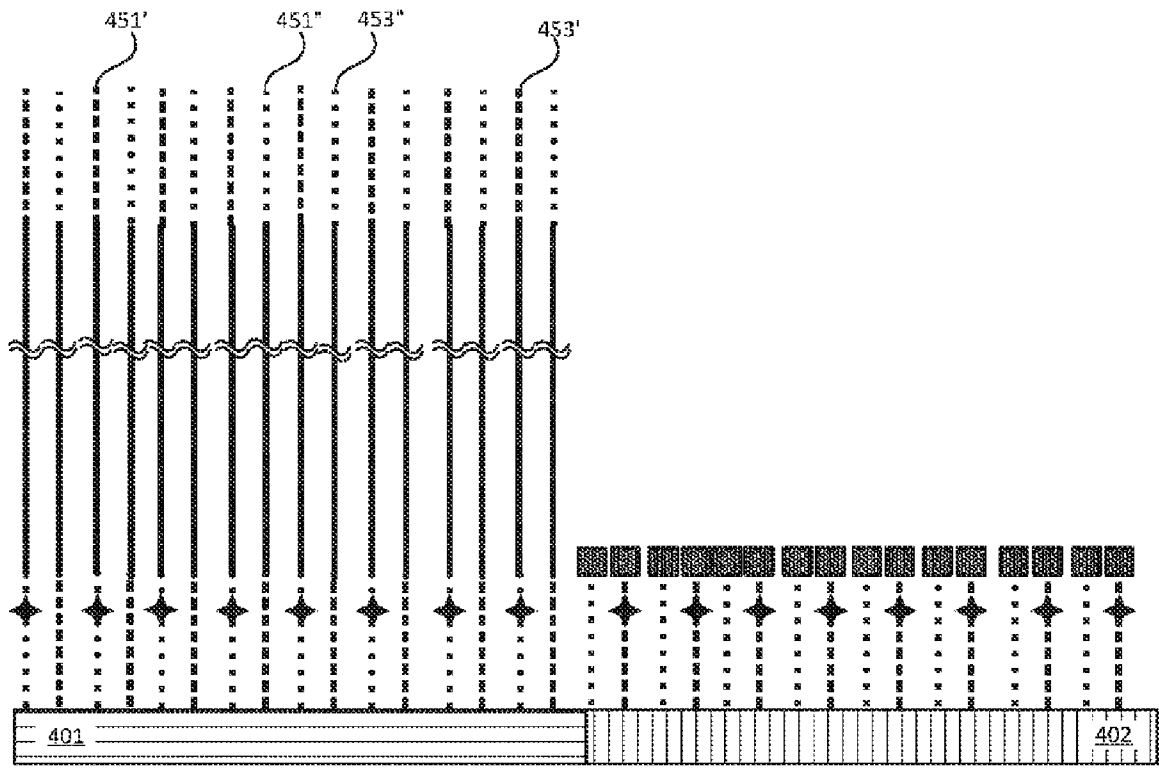
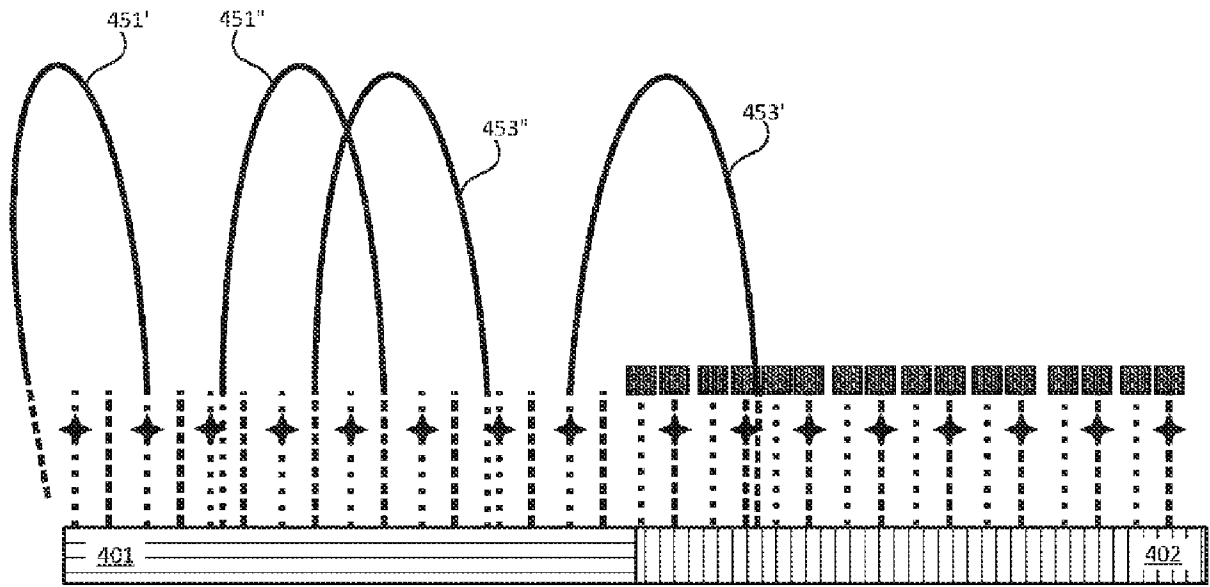


Fig. 4D





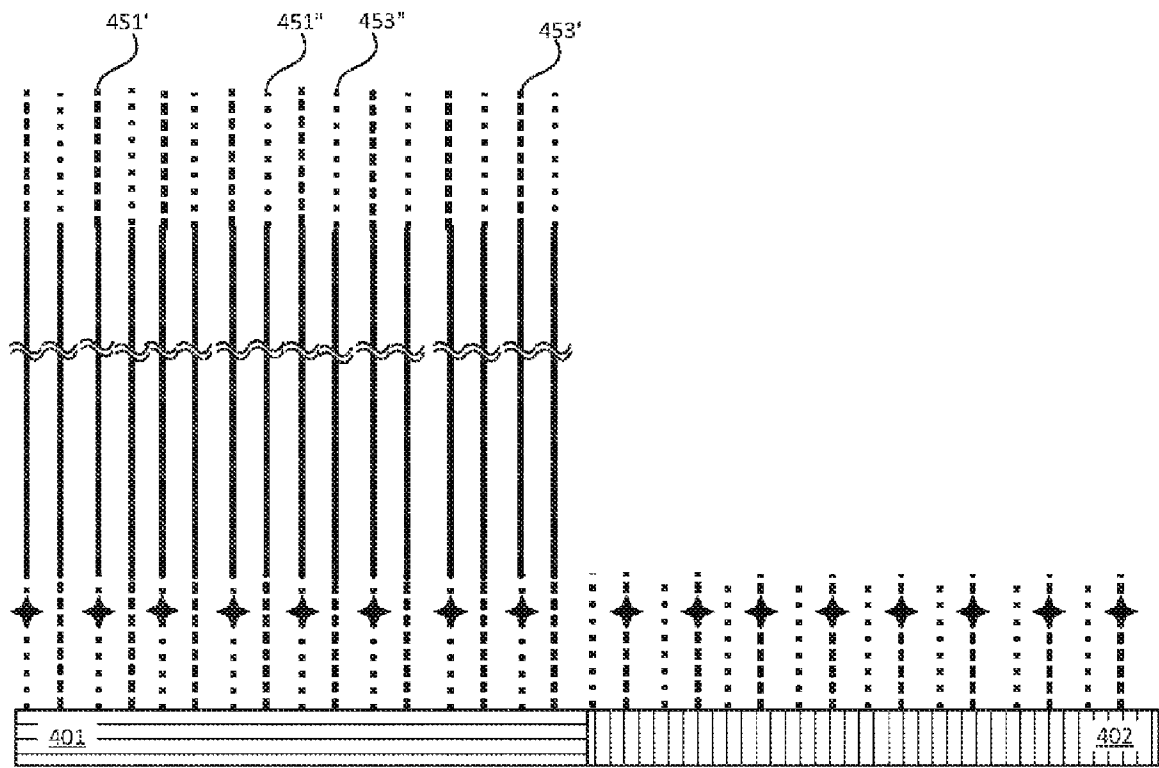


Fig. 4I

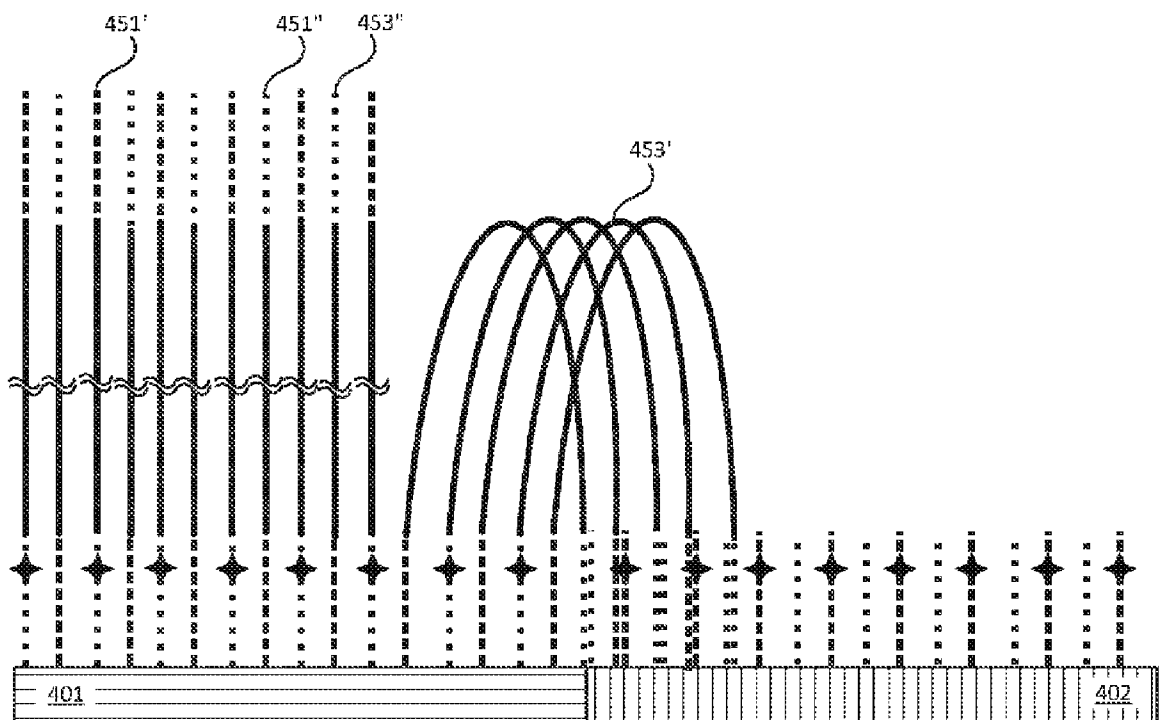


Fig. 4J

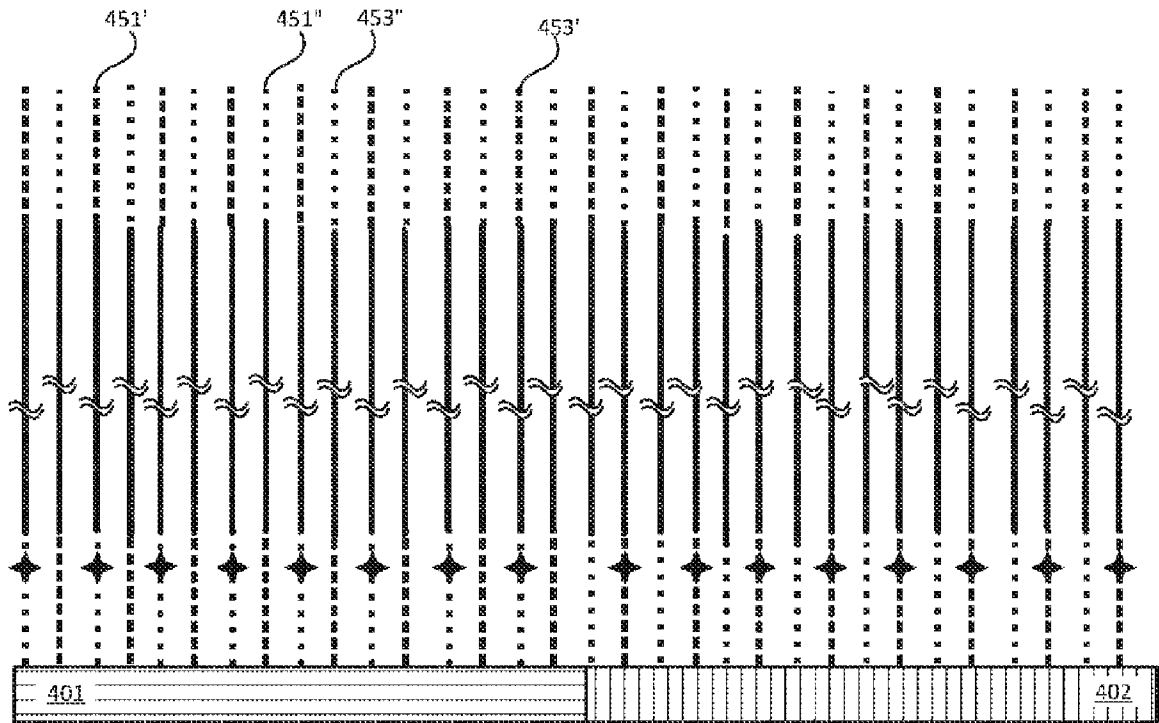


Fig. 4K

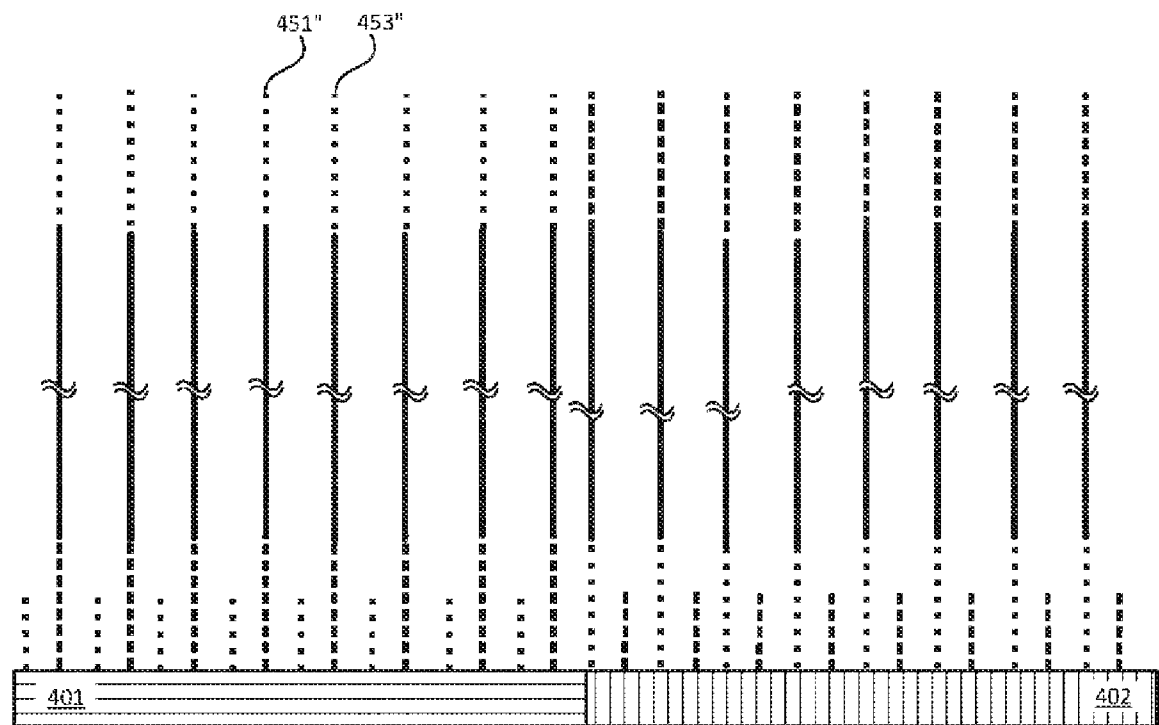


Fig. 4L

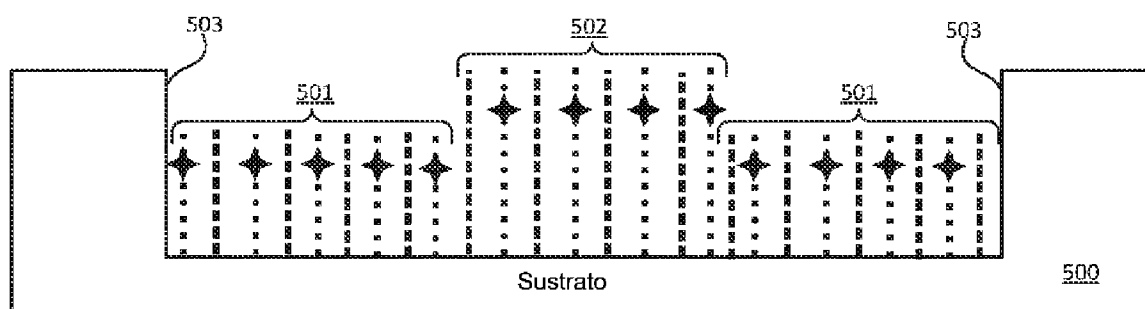


Fig. 5A

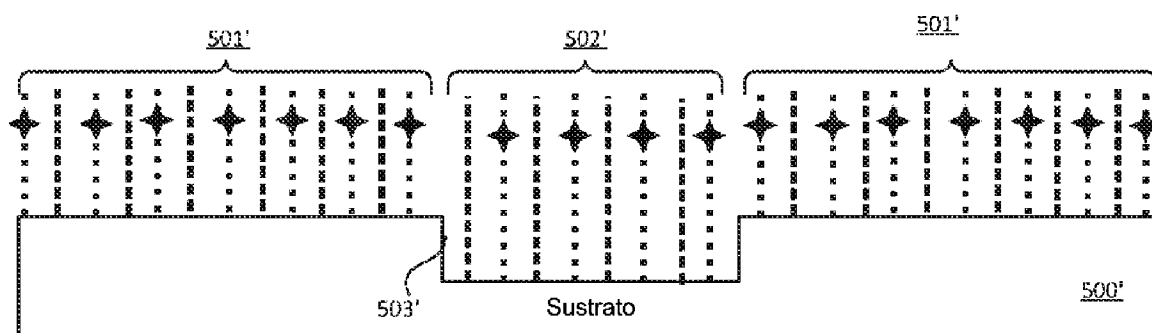


Fig. 5B

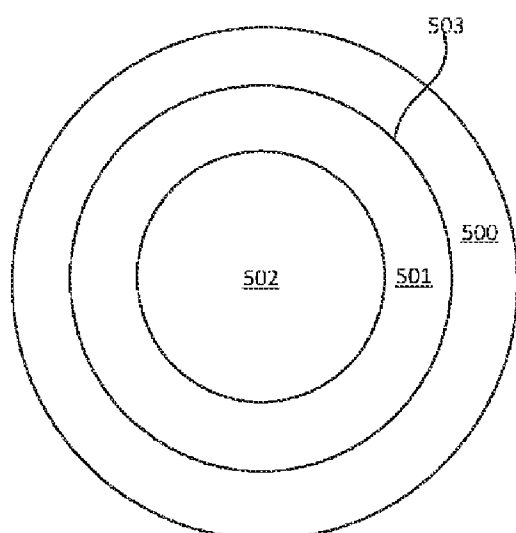


FIG. 5C

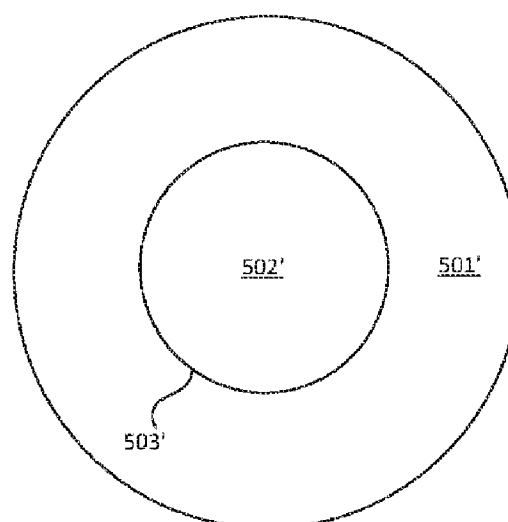


FIG. 5D

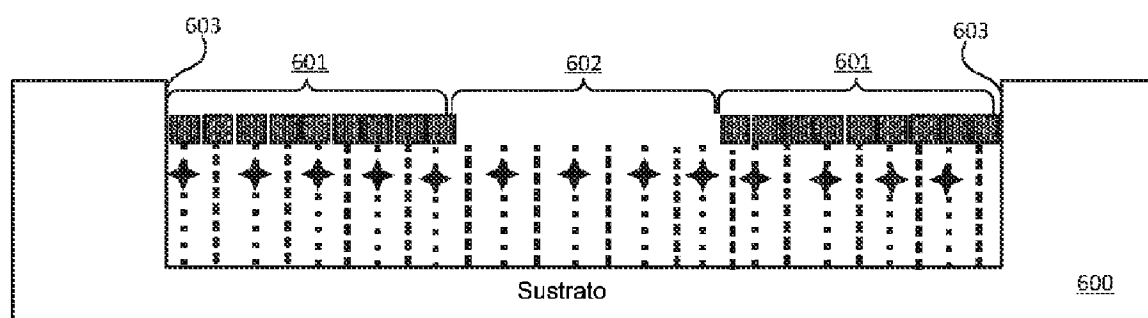


Fig. 6A

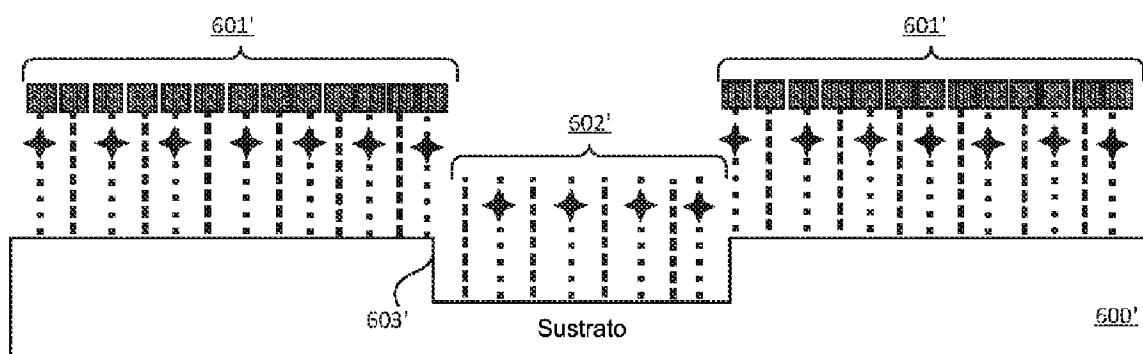


Fig. 6B

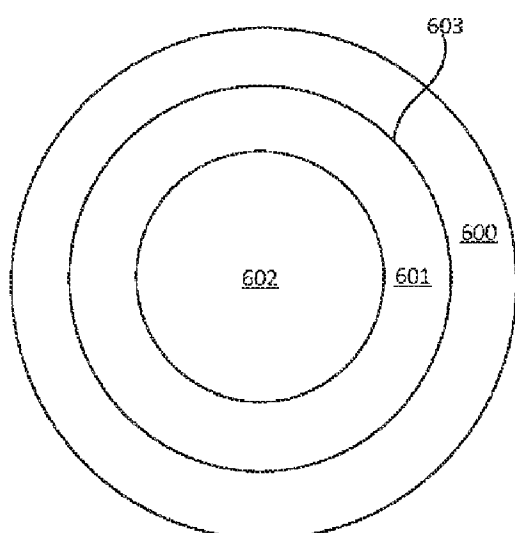


FIG. 6C

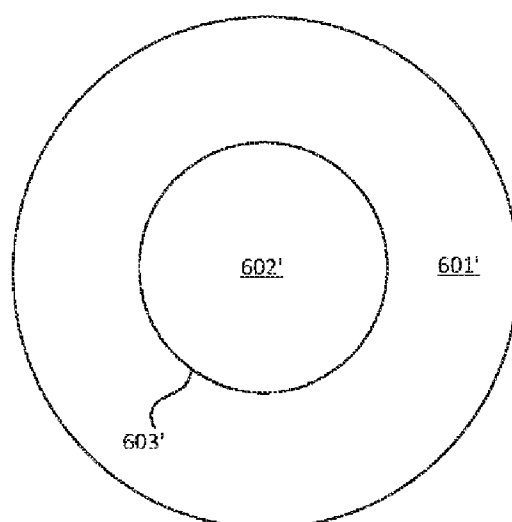


FIG. 6D

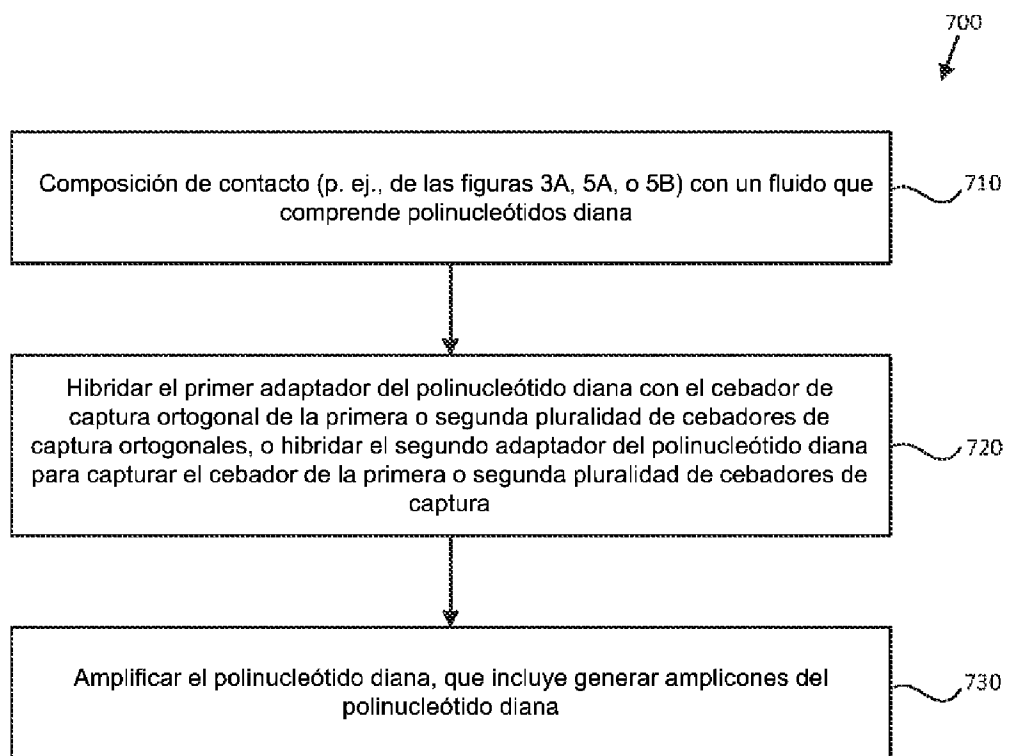


Fig. 7

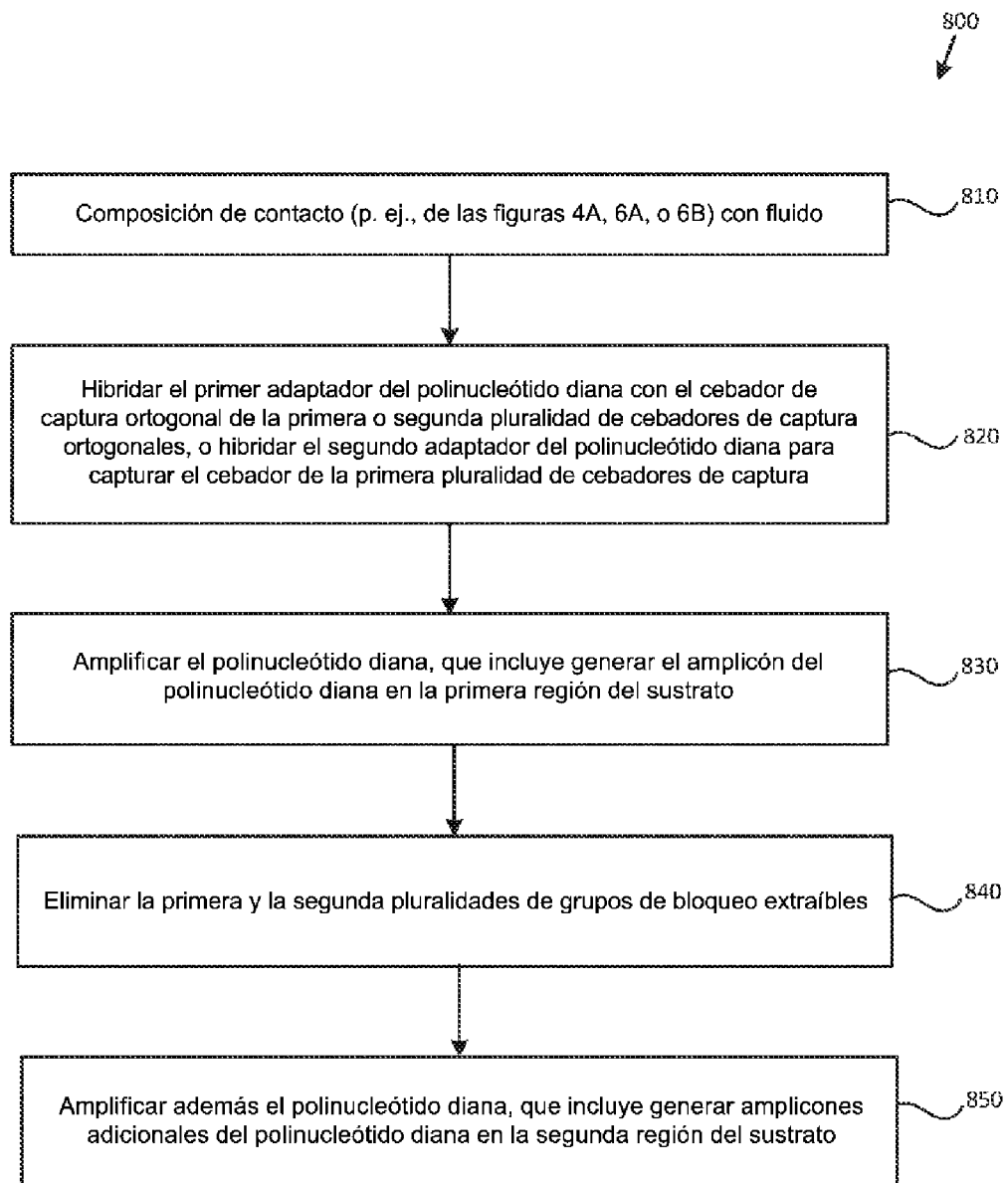


Fig. 8

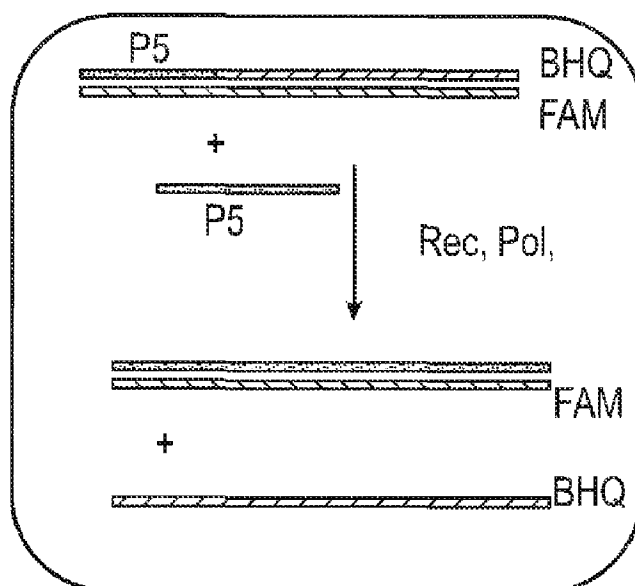


Fig. 9

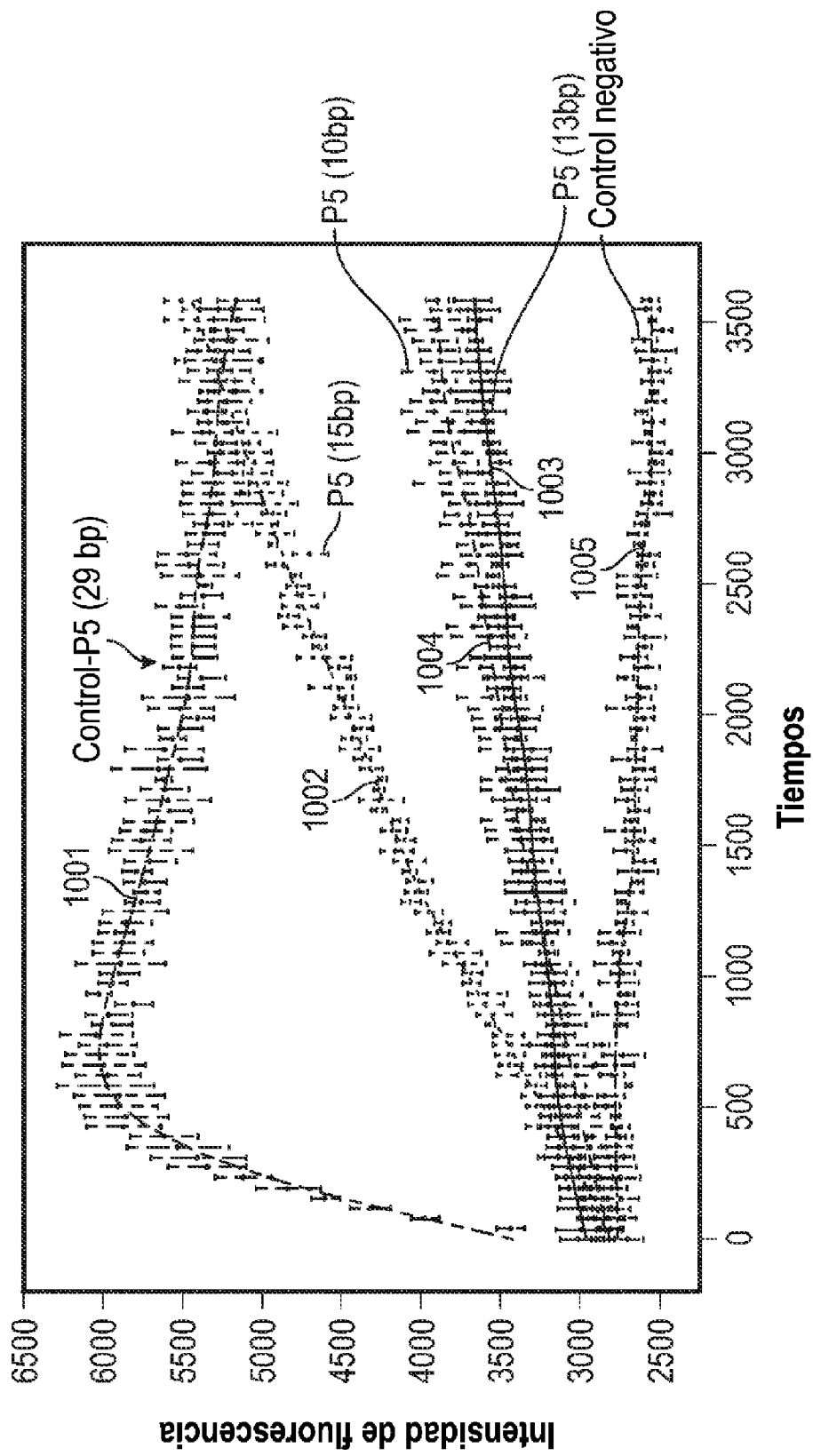


Fig. 10