

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 644**

51 Int. Cl.:

C12N 15/66 (2006.01)

C12Q 1/6855 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 19197131 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021 EP 3604544**

54 Título: **Procedimientos mejorados para el procesamiento de sustratos de ADN**

30 Prioridad:

31.01.2014 US 201461934515 P

11.11.2014 US 201462078309 P

11.11.2014 US 201462078313 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2022

73 Titular/es:

SWIFT BIOSCIENCES, INC. (100.0%)

**674 S. Wagner Road
Ann Arbor MI 48103, US**

72 Inventor/es:

**MAKAROV, VLADIMIR y
LALIBERTE, JULIE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 908 644 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

Procedimientos mejorados para el procesamiento de sustratos de ADN

5 Todas las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) disponibles en el mercado requieren la preparación de bibliotecas, en las que se ligan un par de secuencias de adaptador específicas a los extremos de los fragmentos de ADN para permitir la secuenciación por el instrumento. La mayoría de los adaptadores NGS comprenden tres dominios funcionales: (1) secuencias únicas de fusión de cebadores PCR para la amplificación de bibliotecas y clones, (2) secuencias únicas de fusión de cebadores de secuenciación y (3) secuencias únicas de indexación de muestras. Actualmente, la mayoría de las plataformas utilizan la amplificación clonal para hacer cientos de copias de cada molécula individual de la biblioteca de ADN. Esto se consigue mediante la amplificación en puente o la PCR en emulsión con el fin de amplificar la señal generada para el modo particular de detección de la secuencia para cada molécula de la biblioteca (por ejemplo, fluorescencia o pH). Para la secuenciación por síntesis, los dominios de fusión para los cebadores de secuenciación están yuxtapuestos a las uniones adaptador-inserto; para permitir la secuenciación de extremos emparejados, cada adaptador posee una secuencia única para la fusión del cebador. Las secuencias índice de la muestra se componen de secuencias cortas y únicas, normalmente de 6-8 bases, que cuando se secuencian identifican la fuente de la muestra de una determinada lectura de la secuencia, lo que permite multiplexar o cosecuenciar las muestras. Existen tecnologías de secuenciación de una sola molécula, tanto existentes como emergentes, que no dependen de la amplificación clonal para la detección de la señal, pero que siguen necesitando la unión de secuencias de adaptador a sus extremos para otros fines, tal como la adición de un bucle terminal de hebra a los dúplex de ADN para permitir la secuenciación de ambas cadenas como una sola molécula o la introducción de una secuencia líder para la entrada de nanoporos.

La secuenciación dirigida de nueva generación está englobada en dos tecnologías líderes: la secuenciación de amplicones y el enriquecimiento por hibridación-captura de objetivos a partir de bibliotecas de genoma completo. La secuenciación de amplicones es el procedimiento preferido por su rapidez, dado el reducido número de pasos, para cuando se desean paneles de loci objetivo significativamente más pequeños que los exomas completos, y por el significativo ahorro de costes globales tanto en reactivos preparatorios como en profundidad de secuenciación. La secuenciación de amplicones está representada por una variedad de técnicas disponibles. Algunos ejemplos son: 1. PCR multiplex utilizando cebadores degradables específicos-objetivo para eliminar los dímeros de los cebadores, seguido de pulido y ligadura del adaptador NGS, donde los objetivos superpuestos se dividen en tubos separados (Ion Torrent AmpliSeq) 2. Reacciones de extensión ligadura múltiple que incorporan adaptadores NGS en los extremos de cada par de oligonucleótidos específicos-objetivo, seguido de una amplificación por PCR mediada por el adaptador NGS, que evita por completo la PCR múltiple; sin embargo, la PCR mediada por ligadura requiere una mayor cantidad de ADN de entrada (Illumina TSCA) 3. PCR multiplex en células de microfluidos que separan los pares de cebadores para evitar la formación de dímeros de cebadores y permitir la superposición de los loci objetivo; las reacciones separadas requieren una mayor cantidad de ADN de entrada (conjunto de acceso de Fluidigm) PCR multiplex mediante PCR digital de gota que también separa los pares de cebadores para evitar la formación de dímeros de cebadores y permitir la superposición de los loci objetivo; también requiere una mayor cantidad de ADN de entrada (Raindance). Cada tecnología está diseñada para eliminar los dímeros de los cebadores o evitar su formación durante el procedimiento de amplificación multiplexada, para evitar que estos artefactos dominen la biblioteca de amplicones NGS resultante. Los inconvenientes de los procedimientos existentes son: A. el elevado coste de los instrumentos y consumibles microfluídicos o digitales de gota, B. los mayores requisitos de cantidad de entrada; y C. la necesidad de separar las reacciones multiplexadas cuando se desea una cobertura superpuesta o contigua, lo que aumenta aún más los requisitos de cantidad de entrada. Una alternativa a estas opciones cuando se desea una cobertura contigua es realizar una PCR de largo alcance. Sin embargo, la PCR de largo alcance es difícil de multiplexar y la subsiguiente fragmentación requerida para la mayoría de las plataformas de secuenciación, seguida de la preparación de bibliotecas NGS por separado, requiere mucho tiempo y es más costosa. Lo que se necesita en la técnica es un procedimiento sencillo de generación de amplicones que permita entradas bajas de aproximadamente 10 nanogramos (ng) de ADN, que no requiera más instrumentación que un termociclador y que sea independiente de si los objetivos son loci de puntos calientes separados o si los objetivos son regiones del genoma que se superponen cuando se requiere una cobertura contigua. Las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento proporcionan una solución a esta necesidad.

55 Típicamente, la preparación de una biblioteca de ADN NGS implica 5 pasos: (1) fragmentación del ADN, (2) pulido, (3) ligadura de adaptadores, (4) selección de tamaño, y (5) amplificación de la biblioteca (véanse las Figuras 1 y 2).

(1) Fragmentación: La fragmentación del ADN puede lograrse mediante digestión enzimática o procedimientos físicos como la sonicación, la nebulización o el cizallamiento hidrodinámico. Cada procedimiento de fragmentación tiene sus ventajas y limitaciones. La digestión enzimática produce extremos de ADN que pueden ser pulidos y ligados eficazmente a secuencias de adaptador. Sin embargo, es difícil controlar la reacción enzimática y producir fragmentos de longitud predecible. Además, la fragmentación enzimática suele ser específica de base, lo que introduce un sesgo de representación en el análisis de la secuencia. Los procedimientos físicos para fragmentar el ADN son más aleatorios y la distribución del tamaño del ADN puede controlarse más fácilmente, pero los extremos del ADN producidos por la fragmentación física están dañados y la reacción de pulido convencional es insuficiente para generar amplios extremos compatibles con la ligadura.

(2) Pulido: Las mezclas típicas de pulido contienen T4 ADN polimerasa y T4 polinucleótido quinasa (PNK). Las actividades 5'-3' polimerasa y 3'-5' exonucleasa de la T4 ADN polimerasa extirpan los salientes 3' y rellenan los extremos empotrados 3', lo que da lugar a la escisión de las bases 3' dañadas, así como al pulido (creación de extremos romos) del ADN. La T4 polinucleótido quinasa de la mezcla de pulido añade un fosfato a los extremos 5' de los fragmentos de ADN que puedan carecer de éste, haciéndolos así compatibles con la ligadura a los adaptadores NGS.

Lo que ha permanecido desconocido en la técnica es que un número significativo de extremos 5' producidos por la fragmentación física son dañados de una manera no identificada y no son fosforilados por la PNK. No hay ninguna enzima en una mezcla de pulido convencional que pueda recortar una base terminal dañada de 5'. Como resultado, una fracción sustancial de los fragmentos de ADN en la preparación no se convierten en moléculas de biblioteca NGS porque siguen siendo incompatibles con la ligadura en sus extremos 5' con los adaptadores NGS. Aunque se sabe en la técnica que la ligadura de adaptadores es ineficiente, la ligadura se realiza típicamente en ambas cadenas simultáneamente, por lo que se ha mantenido la incógnita de cuál es la cadena limitante. Se separaron las reacciones en ligaduras específicas de la cadena para comprobar la eficacia de cada una, respectivamente. A través de este análisis, se pudo señalar el paso limitante de la tasa en el procedimiento global a los extremos 5' que, para una fracción significativa de los fragmentos de ADN, son sustratos pobres para la PNK y, como resultado, la ligadura del adaptador.

(3) Ligadura del adaptador: Otro factor que contribuye al bajo rendimiento de las bibliotecas NGS, además de la falta de grupos fosfato 5', es la propia reacción de ligadura. Antes de la ligadura, a menudo se realiza la adenilación del ADN reparado utilizando una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'-5' para minimizar la formación de quimeras y productos de ligadura adaptador-adaptador (dímero). En estos procedimientos, los fragmentos de ADN saliente en 3' A se ligan a adaptadores salientes en T 5', mientras que los fragmentos salientes en A y los adaptadores salientes en T tienen extremos cohesivos incompatibles para la autoligadura. Sin embargo, la reacción de adenilación es incompleta y genera productos secundarios inespecíficos, reduciendo aún más el número de moléculas disponibles para la ligadura, lo que reduce el rendimiento de la biblioteca. En el presente documento se presenta un enfoque alternativo más eficiente para minimizar la formación de concatámeros.

(4) Selección de tamaño: El procedimiento de selección del tamaño también influye en el rendimiento de la biblioteca. Durante la selección de tamaño, los fragmentos de tamaño no deseado se eliminan de la biblioteca mediante una selección con base en geles o perlas con el fin de optimizar el tamaño de inserción de la biblioteca para la longitud de lectura de secuenciación deseada. Esto maximiza la salida de datos de secuencias al minimizar el solapamiento de la secuenciación de extremos emparejados que se produce a partir de inserciones de bibliotecas de ADN cortas. En el caso de las muestras con cantidades de entrada extremadamente limitadas, este paso puede omitirse y, a cambio de un mayor grado de superposición de los extremos pareados, se secuencian más fragmentos raros.

(5) Amplificación: El problema del bajo rendimiento de las bibliotecas se traduce en la necesidad de amplificar las bibliotecas por PCR antes del análisis NGS, lo que conlleva la pérdida de complejidad de las bibliotecas y la introducción de un sesgo en la composición de las bases. La única solución actual para evitar este problema es una mayor cantidad de ADN de entrada para la preparación de bibliotecas, pero hasta 20 % de las muestras clínicas enviadas para el análisis NGS tienen una cantidad de ADN insuficiente, por lo que en su lugar se aplican ciclos de PCR adicionales para superar la entrada de ADN insuficiente. Esto da lugar a una reducción de los datos de la secuencia por la presencia de un porcentaje inaceptable de duplicados de la PCR.

El documento US 2010/129874 A1 divulga un procedimiento para la reacción en cadena de la polimerasa con parche de ácido nucleico multiplexado. El documento WO 2013/081864 A1 divulga procedimientos y composiciones para la PCR multiplex.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se define en las reivindicaciones. Para abordar algunos de los problemas existentes descritos anteriormente que causan bajos rendimientos para la construcción de bibliotecas NGS, se divulga en el presente documento un procedimiento mejorado de ligadura de adaptadores. Este novedoso procedimiento supera la necesidad de añadir un grupo fosfato a los extremos 5' de los fragmentos de ADN (lo que se requiere para la ligadura convencional de adaptadores; véanse las Figuras 1 y 2). En cambio, se eliminan las bases terminales 5' que están dañadas como resultado de la fragmentación física del ADN. Al eliminar la base dañada, se expone una base compatible con la ligadura con un fosfato 5' y se restablece la eficacia de la ligadura del adaptador, lo que conduce a un aumento significativo del rendimiento de la biblioteca y a la capacidad de construir bibliotecas a partir de cantidades reducidas de ADN de entrada. Además, se introduce una alternativa a la ligadura de adenilación/TA para la prevención de inserciones quiméricas en la biblioteca (formación de concatámeros durante la ligadura) y la formación de productos de ligadura de dímeros adaptadores, lo que también contribuye a un mayor rendimiento en la preparación de la biblioteca. En cualquier aspecto de un procedimiento descrito en el presente documento, el procesamiento comprende la conversión del extremo 5' y/o 3' de una molécula de sustrato a uno que sea compatible con la ligadura.

Este procedimiento, en su forma ejemplar, consta de cuatro incubaciones separadas (véanse las Figuras 3, 4 y 5) para generar una molécula de sustrato procesada. En la primera incubación, el ADN fragmentado de doble cadena se

combina con una enzima fosfatasa y, bajo las condiciones de reacción adecuadas, la enzima elimina los grupos fosfato de los extremos de los fragmentos de ADN. Esto evita que se generen insertos de bibliotecas químicas al impedir la formación de concatámeros de fragmentos de ADN en las reacciones de ligadura posteriores.

En la segunda incubación, los fragmentos de ADN desfosforilados se combinan con una polimerasa o un cóctel de polimerasas que poseen actividad exonucleasa 3'-5'. Bajo condiciones de reacción apropiadas y en presencia de los dNTP, se recortan las bases 3' dañadas y se consigue el pulido de los fragmentos de ADN de doble cadena mediante la escisión de los salientes 3' y el relleno de los extremos 3' empotrados que se generaron durante la fragmentación física. Al finalizar este paso, los fragmentos de ADN poseen extremos romos con terminaciones 3' compatibles con la ligadura y terminaciones 5' que carecen de grupos fosfato, lo que hace que los fragmentos de ADN sean incapaces de autoligarse.

En la tercera incubación, los fragmentos de ADN de doble cadena con extremos romos se combinan con una ADN ligasa y un primer adaptador NGS de doble cadena con extremos romos (adaptador 3') que comprende un fosfato 5' y que es capaz de ligarse a los extremos 3' de los fragmentos de ADN (véase la Figura 3). La característica especial de este adaptador 3' es que la cadena de ADN adaptador que típicamente se ligaría simultáneamente al extremo 5' de los fragmentos de ADN tiene una modificación del extremo 3' que impide la ligadura, y por lo tanto queda una muesca en la unión del extremo 5' de cada fragmento de ADN y el extremo 3' del adaptador 3' después de la reacción de ligadura, incluso en presencia del fosfato 5'. La misma modificación 3' que impide la ligadura a los extremos 5' de los fragmentos de ADN también impide que se formen productos de ligadura adaptador-adaptador, aunque estarían compuestos por una única secuencia adaptadora que no sería un dímero adaptador funcional (los dímeros funcionales están compuestos por ambos adaptadores). El producto de este paso son fragmentos de ADN de doble cadena con un único adaptador NGS ligado a una sola cadena en ambos extremos 3'.

En la cuarta incubación, la cadena del adaptador 3' que permanece sin ligar a los fragmentos de ADN (debido a la modificación 3') es también desplazable o degradable debido a la incorporación de bases degradables durante la síntesis del oligo. En presencia de una enzima opcional y apropiada durante la cuarta incubación, la cadena del adaptador 3' se degrada o es desplazada por un nuevo adaptador de cadena única que comprende la segunda secuencia del adaptador NGS que también está presente en la reacción (adaptador 5', véase la Figura 3), y a través de una secuencia complementaria al adaptador 3' en la unión del adaptador-inserto, el adaptador 5' de cadena única se fusiona a la porción complementaria del adaptador 3' que se liga a los extremos 3' de los fragmentos de ADN de doble cadena, lo que da lugar al restablecimiento de una muesca o brecha. Además, en la reacción hay una ADN polimerasa que posee actividad exonucleasa 5'-3', y en presencia de los dNTP, una ligasa y las condiciones de reacción apropiadas, se inicia la traducción por muesca en la muesca o brecha que reside en la unión del adaptador 5' y los extremos 5' de los fragmentos de ADN. La traducción por muesca da lugar a la sustitución de la base terminal 5' dañada (y de una o más bases adicionales internas al extremo 5') y expone un grupo fosfato terminal 5' compatible con la ligadura. Posteriormente, la ligadura eficiente del adaptador 5' a la molécula de sustrato de ADN se produce cuando la ligasa sella la muesca que se traslada una o más bases (véase la Figura 4). Al finalizar este novedoso procedimiento de ligadura de adaptadores, ambos extremos de cada fragmento de ADN de doble cadena están flanqueados por dos adaptadores NGS diferentes de cadena única que comparten una corta secuencia de adaptador complementaria en la unión adaptador-inserto.

Alternativamente, la eliminación de la base terminal 5' y la ligadura del adaptador 5' puede lograrse sin polimerización, mediante la fusión del adaptador 5' de cadena única con una o más bases aleatorias adicionales en su extremo 3' que se superponen con la(s) base(s) 5' dañada(s) de la molécula de sustrato, y en ausencia de los dNTP, tras el desplazamiento se produce la escisión de la base desplazada en el extremo 5' de las moléculas de sustrato de ADN por parte de una nucleasa específica de la aleta 5', lo que da lugar a una ligadura eficaz del segundo adaptador NGS con el fosfato 5' expuesto en los extremos de las moléculas de sustrato de ADN escindidas (véase la Figura 5).

En otra alternativa, la eliminación de la base terminal 5' y la ligadura del adaptador 5' pueden lograrse mediante una extensión de una sola base dideoxi desde la cadena degradable o desplazable del adaptador 3' que es seguida por la escisión de la base terminal 5' de los fragmentos de ADN por la actividad endonucleasa de aleta 5' de la polimerasa. A continuación, la cadena se degrada o es desplazada por el adaptador 5' y, en presencia de una ligasa, el adaptador 5' se liga eficazmente al fosfato 5' expuesto en los fragmentos de ADN. A continuación, se presentan formas de realización alternativas de este paso y de los pasos precedentes.

En consecuencia, en un aspecto la divulgación proporciona un procedimiento para producir una molécula de sustrato procesada, comprendiendo el procedimiento (i) ligar un primer polinucleótido a un extremo 3' de una molécula de sustrato que es al menos parcialmente de doble cadena; (ii) fusionar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido bajo condiciones que promueven el recocido; (iii) escisión de al menos un nucleótido del extremo 5' de la molécula de sustrato; y luego (iv) ligar el segundo polinucleótido al extremo 5' de la molécula de sustrato de doble cadena para producir la molécula de sustrato procesada. En una realización, el procedimiento comprende además el paso, previo al paso (i), de poner en contacto la molécula de sustrato con una enzima fosfatasa. En otra realización, el procedimiento comprende además el paso de hacer que la molécula de sustrato sea roma poniéndose en contacto con la molécula de sustrato con una enzima polimerasa que posea actividad exonucleasa 3'-5'. En otra realización, el

procedimiento comprende además el paso de poner en contacto la molécula de sustrato con una polimerasa independiente de la plantilla para adenilar el extremo 3' de la molécula de sustrato.

En cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento, se contempla que la molécula de sustrato sea de origen natural o que la molécula de sustrato sea sintética. En una realización, la molécula de sustrato es de origen natural. En otra realización, la molécula de sustrato es ADN genómico, y en otras realizaciones el ADN genómico es eucariota o procariota. En las realizaciones en las que la molécula de sustrato es ADN genómico, la divulgación contempla que el ADN genómico se fragmente *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la fragmentación *in vitro* se lleva a cabo mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en el cizallamiento, la escisión con una endonucleasa, la sonicación, el calentamiento, la irradiación utilizando una fuente alfa, beta o gamma, la escisión química en presencia de iones metálicos, la escisión radical y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la fragmentación *in vivo* se produce mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en la apoptosis, la radiación y la exposición al amianto.

La divulgación también contempla realizaciones en las que la molécula de sustrato es sintética y se selecciona del grupo que consiste en ADNc, ADN producido por amplificación de todo el genoma, productos de extensión de cebadores que comprenden al menos un extremo de doble cadena y un amplicón de PCR.

En cualquiera de los aspectos o realizaciones de la divulgación, se contempla que el primer polinucleótido es al menos parcialmente de doble cadena y comprende el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido se rectifica con el oligonucleótido 1, y en otras realizaciones, el rectificado da lugar a una muesca, una brecha o una base superpuesta entre el segundo polinucleótido y la molécula de sustrato. En algunas realizaciones, la fusión da lugar a la deshibridación del oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2.

El segundo polinucleótido, en diversas realizaciones, se pone en contacto con una polimerasa, lo que resulta en la degradación del oligonucleótido 2.

También se contemplan en la divulgación realizaciones en las que el oligonucleótido 2 comprende una base que es susceptible de degradación, y la divulgación también proporciona realizaciones en las que el oligonucleótido 2 comprende un grupo bloqueador en su extremo 3' que impide la ligadura. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido comprende una base modificada.

En otras realizaciones, un procedimiento de la divulgación comprende además (i) ligar un tercer polinucleótido a un extremo 3' de una molécula de sustrato adicional que es al menos parcialmente de doble cadena; (ii) fusionar un cuarto polinucleótido al tercer polinucleótido en condiciones que promueven la fusión; (iii) escindir al menos un nucleótido del extremo 5' de la molécula de sustrato adicional; y luego (iv) ligar el cuarto polinucleótido al extremo 5' de la molécula de sustrato adicional de doble cadena para producir una molécula de sustrato adicional procesada. En algunas realizaciones, el primer polinucleótido y el tercer polinucleótido son el mismo. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido y el cuarto polinucleótido son el mismo.

El procedimiento de construcción de bibliotecas NGS de amplicones dirigidos comprende dos pasos separados: el enriquecimiento de objetivos por PCR multiplex seguido de un paso de ligadura de adaptadores NGS (véase la Figura 39). Son posibles dos opciones de flujo de trabajo: una PCR de dos pasos seguida de la ligadura del adaptador o una PCR de un paso seguida de la ligadura.

En el paso de PCR múltiplex utilizando cualquiera de los dos procedimientos, los pares de cebadores específicos-objetivo se diseñan para los loci objetivo deseados y comprenden una secuencia adaptadora universal truncada de NGS en sus extremos 5' (véanse las Figuras 40 y 41, Tabla 2). Los primeros ciclos de PCR tienen tiempos de ciclado alargados para permitir que la alta complejidad de los pares de cebadores, cada uno de los cuales está a una baja concentración, cree amplicones universales marcados con adaptadores NGS a partir de sus secuencias objetivo. Estos cebadores poseen opcionalmente etiquetas de secuencia degenerada únicas para identificar amplicones individuales (UI= identificador único), donde cada UI se encuentra entre la secuencia adaptadora universal NGS en el extremo 5' y la porción específica-objetivo en el extremo 3' de cada cebador (y se representa como un tramo de bases NNNN, Figuras 40, 41). Si se utilizan secuencias UI, los ciclos de PCR múltiplex alargados se limitan a 2 para evitar la incorporación de secuencias UI adicionales en las copias de los amplicones generados previamente; si no se utilizan secuencias UI, los ciclos de PCR múltiplex alargados pueden realizarse durante más de 2 ciclos. Cuanto más limitado sea el número de ciclos específicos del objetivo que se realicen, menos productos de dímero del cebador se acumularán, por lo que deberá realizarse el mínimo número de ciclos multiplexados factibles para la cantidad de muestra de entrada. Después de los ciclos multiplex (2 o más), la PCR continúa con tiempos de elongación más cortos para una segunda fase de amplificación utilizando un único cebador universal que corresponde al adaptador universal truncado NGS que flanquea cada amplicón objetivo. El cebador universal se utiliza a una concentración relativamente alta en comparación con los cebadores específicos-objetivo, y el número total de ciclos viene determinado por el rendimiento deseado de la biblioteca. La concentración de los cebadores específicos-objetivo no es suficiente para amplificar los objetivos, por lo que el cebador universal, que no puede autointeractuar, se encarga de la reacción de amplificación con la ausencia de formación de dímeros de cebadores adicionales. Además, los dímeros del cebador que se acumulan durante los ciclos limitados de multiplexación serán más cortos en longitud que los amplicones

deseados y estarán sujetos a una estructura secundaria estable que resulta en una amplificación menos eficiente por el cebador universal único. Si se utilizan secuencias UI, se requiere un paso de purificación o la digestión con exonucleasa I de los cebadores multiplex antes de añadir el cebador universal, para evitar que las secuencias UI adicionales etiqueten las copias posteriores de los amplicones generados previamente. Si no se utilizan secuencias UI, el cebador universal puede añadirse al principio de la reacción con los cebadores multiplex y será funcional una vez que se generen los amplicones marcados con el adaptador universal.

Una característica adicional del cebador universal es que opcionalmente comprende bases escindibles para permitir la ligadura del adaptador corriente abajo. Sin limitación, las bases escindibles pueden estar compuestas por desoxiuridina, ARN o desoxiinosina. Alternativamente, el cebador universal no comprende bases escindibles y esta secuencia es posteriormente extirpada usando una exonucleasa 5' para permitir la ligadura del adaptador (véase la Figura 42). Además, tanto los cebadores específicos-objetivo como el cebador universal comprenden opcionalmente modificaciones resistentes a las nucleasas en sus extremos 3'; éstas incluyen enlaces de fosforotioato, modificaciones de 2'O-metilo o metilfosfonato. Esto permite un cebado más específico y eficiente cuando se utiliza una polimerasa con verificación de prueba que posee actividad exonucleasa de 3' a 5'. También limita la digestión de la exonucleasa 5' si esta enzima se utiliza para eliminar la secuencia del adaptador universal de los amplicones antes de la ligadura del adaptador. Después de la PCR, es necesario un paso de purificación para eliminar los reactivos y la polimerasa no utilizados.

Para el paso final de la ligadura del adaptador (véase la Figura 42), la porción de cada amplicón derivada del cebador universal es digerida debido a la incorporación de bases degradables en el cebador y al uso de endonucleasas específicas de modificación. Alternativamente, para los cebadores que contienen bases resistentes a las nucleasas en su extremo 3', la porción 5' de cada amplicón puede recortarse mediante la digestión de la exonucleasa 5'. En este caso, la digestión con exonucleasas de los extremos 5' de los amplicones terminará en la posición de la base resistente a la nucleasa. La reacción de digestión del cebador crea un saliente de 3' de cadena única en ambos extremos de cada amplicón. También está presente en la reacción un adaptador B de cadena única de longitud completa que comprende una segunda secuencia de adaptador NGS, y a través de una secuencia complementaria al adaptador universal en la unión del adaptador-objetivo, el segundo adaptador B de cadena única se anuda a la porción complementaria del adaptador universal que se encuentra en los salientes 3' de cada amplicón, donde la fusión del adaptador da lugar a la formación de una muesca o brecha. Además, en la reacción hay una ADN polimerasa que posee actividad exonucleasa 5'-3', y en presencia de los NTPs, una ligasa y las condiciones de reacción apropiadas, se inicia la traducción por muesca en la muesca o brecha que reside en la unión del adaptador B y los extremos 5' de los amplicones. La traducción por muesca da lugar a la sustitución de una o más bases internas del extremo 5' y expone un grupo fosfato terminal 5' compatible con la ligadura. Posteriormente, la ligadura eficiente del adaptador B al amplicón del sustrato de ADN se produce cuando la ligasa sella la muesca que se traslada una o más bases. Alternativamente, la ligadura del adaptador B se lleva a cabo mediante una reacción de escisión de desplazamiento utilizando una polimerasa con actividad de endonucleasa de aleta y adicionalmente una ligasa. En este caso, no se requieren los NTPs, sólo una superposición de varias bases entre el extremo 3' del adaptador B y el extremo 5' de la porción del adaptador universal que queda en cada amplicón. Para completar el procedimiento de ligadura del adaptador, se realiza simultáneamente una ligadura mediada por el enlazador para completar el 1^{er} adaptador (A) en la secuencia restante del adaptador universal en el extremo 3' de cada amplicón. El oligonucleótido enlazador es complementario al extremo 3' del adaptador universal restante en cada amplicón y complementario al oligonucleótido que comprende el resto del 1^{er} adaptador. Gracias a su complementariedad con ambas secuencias, el oligonucleótido enlazador se hibrida tanto con el resto 3' del 1^{er} adaptador como con el adaptador universal restante presente en cada amplicón, permitiendo que se produzca la ligadura. Al finalizar este novedoso procedimiento de ligadura de adaptadores, ambos extremos de cada amplicón están flanqueados por dos adaptadores NGS de cadena única diferentes (A y B) que comparten una corta secuencia de adaptador complementaria en la unión adaptador-objetivo. A continuación, se realiza un último paso de purificación antes de la cuantificación y secuenciación de la biblioteca.

Una característica adicional del procedimiento divulgado es la elección de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación PCR multiplexada. La tasa de error durante la amplificación puede mejorarse cuando se utiliza la ADN polimerasa de alta fidelidad *Pfu*, la ADN polimerasa Phusion, la ADN polimerasa KAPA HiFi, la ADN polimerasa Q5 o sus derivados y análogos. Además, dado que el cebador universal utilizado en la segunda fase de la reacción de amplificación comprende opcionalmente bases escindibles, también es deseable una ADN polimerasa de alta fidelidad que sea tolerante a las bases uracilo, ARN o inosina. Esto incluye, entre otras, la polimerasa KAPA HiFi U+, la Thermo Phusion U y la Enzymatics VeraSeq ULtra, todas ellas diseñadas para tolerar sustratos que contienen uracilo. Dado el uso de enzimas de alta fidelidad que poseen actividad exonucleasa de 3' a 5' en la reacción de amplificación, todos los cebadores específicos-objetivo, así como el cebador universal, comprenden enlaces resistentes a las nucleasas en sus extremos 3' para aumentar la fidelidad y la eficiencia de la extensión del cebador. Esto incluye, pero no se limita, a un enlace fosforotioato u otra fracción resistente a las nucleasas.

Además, como se mencionó anteriormente, se desean procedimientos para la PCR multiplexada para bibliotecas NGS dirigidas que sean capaces de amplificar objetivos superpuestos para una cobertura contigua en un formato de tubo único. El procedimiento divulgado en el presente documento es capaz de lograr este efecto (Figuras 43 y 44). En el caso de dos pares de cebadores que tienen regiones objetivo superpuestas, se pueden generar 4 amplicones posibles: un amplicón específico para cada uno de los dos pares de cebadores, un maxiamplicón resultante de la amplificación

de los dos cebadores distales y un miniamplicón resultante de la amplificación de los dos cebadores proximales. Para evitar que el miniamplicón domine la reacción de PCR multiplexada (los amplicones cortos como éste y los dímeros de cebadores suelen dominar las reacciones de amplificación debido a su corta longitud y a su facilidad de amplificación), la mayoría de los procedimientos separan los pares de cebadores que se solapan en dos tubos, lo cual es eficaz, pero duplica la carga de trabajo y la cantidad de ADN necesaria. El procedimiento divulgado en el presente documento permite crear amplicones superpuestos en un solo tubo, ya que, debido a la presencia de la secuencia universal en cada terminación, el miniamplicón corto estará sujeto a una estructura secundaria estable que resulta en una amplificación menos eficiente por el único cebador universal. Por lo tanto, aunque el miniamplicón se produzca durante los ciclos iniciales de PCR específicos-objetivo, no se amplificará eficazmente. Como resultado, utilizando los procedimientos divulgados en el presente documento, sólo se producen los amplicones específicos de cada par de cebadores y el maxiamplicón a partir de un ADN de entrada de alta calidad y alto peso molecular. Cuando se utiliza ADN FFPE entrecruzado o ADN fragmentado (en particular, ADN libre de células circulantes que se encuentra en el intervalo de 165 pb), se suprime la formación del maxiamplicón, ya que la longitud o la integridad de la plantilla no puede soportar un amplicón de este tamaño, y sólo se producen los amplicones específicos de cada par de cebadores.

En cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento, se contempla que la muestra de ADN de entrada es de origen natural. En una realización, el ADN de entrada es ADN genómico, ya sea ADN intacto de alto peso molecular o ADN fragmentado libre de células circulantes, y en otras realizaciones, el ADN genómico es de origen eucariota, procariota, mitocondrial o viral. En otras realizaciones, el ADN de entrada es de cadena única o de cadena doble o es sintético y es el resultado de una amplificación previa de todo el genoma o el resultado de una transcripción inversa de ARN aleatoria o cebada de otro modo.

En otros aspectos de la divulgación, se proporciona una composición que comprende una ligasa y un primer polinucleótido que es al menos parcialmente de cadena doble y comprende el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2; en el que el oligonucleótido 1 comprende un fosfato 5' y un grupo bloqueador en su extremo 3'; y en el que el oligonucleótido 2 (i) comprende una base susceptible de degradación y/o (ii) puede ser desplazada por una condición térmica no desnaturizante y comprende además un grupo bloqueador en su extremo 3', dicho grupo bloqueador impide la ligadura del extremo 3' pero permite la ligadura del extremo 5' del oligonucleótido 1.

En algunas realizaciones, el grupo bloqueador 3' del oligonucleótido 2 es 3' desoximidina, 3' desoxiadenina, 3' desoxiguanina, 3' desoxicitosina o un dideoxi nucleótido. En otras realizaciones, la base susceptible de degradación es la desoxiuridina, un ribonucleótido, la desoxiinosina o la inosina. La condición de calor no desnaturizante, en diversas realizaciones, es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 85 °C.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido 2 comprende una modificación de la base que reduce la estabilidad de unión del oligonucleótido 2, en el que la modificación de la base es desoxiinosina, inosina o una base universal.

La divulgación también proporciona, en algunos aspectos, una composición que comprende un producto de ligadura resultante de la incubación de un sustrato de cadena doble con una composición de la divulgación; una ligasa, una polimerasa de ADN que tiene actividad de traducción por muesca, una endonucleasa que reconoce una base que es susceptible de degradación, y un segundo polinucleótido que es de cadena única y comprende un dominio 3' que es suficientemente complementario a la porción 5' del oligonucleótido 1 del polinucleótido 2 para anudarse bajo condiciones apropiadas cuando el oligonucleótido 2 del polinucleótido 1 se degrada o se desplaza.

En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido tiene una longitud suficiente para desplazar el oligonucleótido 2 del primer polinucleótido o el segundo polinucleótido comprende una modificación de base que aumenta su estabilidad de unión. En otras realizaciones, la endonucleasa se selecciona del grupo que consiste en la UDG más la endonucleasa VIII, la RNasa HI, la RNasa H2 y la endonucleasa V. En otras realizaciones, la ligasa es la ADN ligasa de *E. coli* o la T4 ADN ligasa. La modificación de la base que aumenta su estabilidad de unión es, en diversas realizaciones, un ácido nucleico bloqueado (LNA).

En otros aspectos de la divulgación, se proporciona una composición que comprende un producto de ligadura resultante de la incubación de un sustrato de cadena doble con una composición de la divulgación; una ligasa; una endonucleasa de aleta; una endonucleasa que reconoce una base susceptible de degradación un segundo polinucleótido que comprende un oligonucleótido de cadena única que comprende un dominio 3' que es suficientemente complementario a la porción 5' del oligonucleótido 1 del polinucleótido 2 para fusionarse bajo condiciones apropiadas cuando el oligonucleótido 2 del polinucleótido 1 es degradado o desplazado, en el que el segundo polinucleótido tiene una longitud suficiente para desplazar al oligonucleótido 2 del primer polinucleótido o el segundo polinucleótido comprende una modificación de base que aumenta su estabilidad de unión, y en el que el segundo polinucleótido comprende además una base degenerada terminal 3'.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una molécula de sustrato procesada, comprendiendo el procedimiento: (i) ligar un primer polinucleótido a un extremo 3' de una molécula de sustrato que es, al menos parcialmente, de cadena doble; (ii) fusionar un segundo polinucleótido al primer polinucleótido bajo condiciones que promuevan la fusión; (iii) extirpar al menos un nucleótido del extremo 5' de la molécula de sustrato; y luego (iv) ligar el segundo polinucleótido al extremo 5' de la molécula de sustrato de doble cadena para producir la

molécula de sustrato procesada. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además un paso, previa al paso (i), de contacto de la molécula de sustrato con una enzima fosfatasa.

En algunas realizaciones, la enzima fosfatasa es fosfatasa intestinal de ternera o fosfatasa de camarón.

5 En otras realizaciones, el procedimiento comprende además un paso para hacer que la molécula de sustrato sea roma poniéndose en contacto con la molécula de sustrato con una enzima polimerasa que posea actividad exonucleasa 3'-5'.

10 En algunas realizaciones, la enzima polimerasa se selecciona del grupo que consiste en la T4 ADN ligasa, el fragmento de Klenow, la T7 polimerasa y una combinación de las mismas. En otras realizaciones, el procedimiento comprende además un paso de contacto de la molécula de sustrato con una polimerasa independiente de la plantilla para adenilar el extremo 3' de la molécula de sustrato.

15 En diversas realizaciones, la molécula de sustrato es de origen natural o la molécula de sustrato es sintética. Así, en algunas realizaciones, la molécula de sustrato es de origen natural. En otras realizaciones, la molécula de sustrato es ADN genómico. En otras realizaciones, el ADN genómico es eucariota o procariota, y en otras realizaciones, el ADN genómico se fragmenta *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la molécula de sustrato es ADN libre de células circulantes.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende, además, antes del paso (i), ajustar la temperatura entre aproximadamente 50 °C a aproximadamente 85 °C. En algunas realizaciones, la temperatura es 65 °C.

25 En otras realizaciones, la fragmentación *in vitro* se lleva a cabo mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en el cizallamiento, la escisión con una endonucleasa, la sonicación, el calentamiento, la irradiación utilizando una fuente alfa, beta o gamma, la escisión química en presencia de iones metálicos, la escisión radical y una combinación de los mismos. En otras realizaciones, la fragmentación *in vivo* se produce mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en la apoptosis, la radiación y la exposición al amianto.

30 La molécula de sustrato, en otras realizaciones, es sintética y se selecciona del grupo que consiste en ADNc, ADN producido por amplificación de todo el genoma, productos de extensión de cebadores que comprenden al menos un extremo de doble cadena y un amplicón de PCR.

35 En algunas realizaciones, el primer polinucleótido es al menos parcialmente de doble cadena y comprende el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2. En diversas realizaciones, el segundo polinucleótido se anuda al oligonucleótido 1. El recocido, en algunas realizaciones, da lugar a una muesca, una brecha o una base superpuesta entre el segundo polinucleótido y la molécula de sustrato.

40 El segundo polinucleótido, en diversas realizaciones, se pone en contacto con una polimerasa, lo que resulta en la degradación del oligonucleótido 2.

45 En algunas realizaciones, el oligonucleótido 2 comprende una base susceptible de degradación. En otras realizaciones, la base susceptible de degradación se selecciona del grupo que consiste en desoxiuridina, ARN, desoxiinosina e inosina. En otras realizaciones, el oligonucleótido 2 comprende un grupo bloqueador en su extremo 3' que impide la ligadura. El grupo bloqueador, en diversas realizaciones, es un desoxinucleótido 3' o un dideoxinucleótido.

En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido comprende una base modificada.

50 En otras realizaciones, el recocido da lugar a la deshibridación del oligonucleótido 1 y del oligonucleótido 2.

55 En otras realizaciones, el procedimiento comprende además: (i) ligar un tercer polinucleótido a un extremo 3' de una molécula de sustrato adicional que es al menos parcialmente de doble cadena; (ii) fusionar un cuarto polinucleótido al tercer polinucleótido en condiciones que promuevan la fusión; (iii) escisión de al menos un nucleótido del extremo 5' de la molécula de sustrato adicional; y luego (iv) ligar el cuarto polinucleótido al extremo 5' de la molécula de sustrato adicional de cadena doble para producir una molécula de sustrato adicional procesada.

60 En algunas realizaciones, el primer polinucleótido y el tercer polinucleótido son el mismo. En otras realizaciones, el segundo polinucleótido y el cuarto polinucleótido son el mismo.

65 En otros aspectos, la divulgación proporciona una composición que comprende un cebador universal y una pluralidad de pares de cebadores de oligonucleótidos específicos-objetivo; en la que cada cebador específico-objetivo de la pluralidad de pares de cebadores comprende una secuencia específica-objetivo y una secuencia terminal 5' que no es complementaria a una molécula de sustrato objetivo; en la que el cebador universal comprende la secuencia terminal 5' y una base escindible o una modificación resistente a la nucleasa; en el que cada cebador específico-objetivo de la pluralidad de pares de cebadores y el cebador universal comprenden cada uno una modificación

resistente a la nucleasa en sus extremos 3'; una polimerasa de alta fidelidad que es tolerante a la base escindible incorporada en el cebador universal; en el que los pares de cebadores específicos-objetivo y el cebador universal se fusionan con sus moléculas de sustrato objetivo a la misma temperatura; y en el que la relación molar de cebadores específicos-objetivo con respecto al cebador universal es al menos de aproximadamente 1:100.

5 En algunas realizaciones, la base escindible es desoxiuridina, ARN, desoxiinosina o inosina. En otras realizaciones, la modificación resistente a la nucleasa es fosforotioato.

10 En otras realizaciones, al menos un cebador específico-objetivo comprende además una etiqueta de identificación molecular entre la secuencia específica-objetivo y la secuencia terminal 5'.

En diversas realizaciones de la divulgación, la relación molar de cebador específico-objetivo con respecto al cebador universal es al menos aproximadamente 1:200, o al menos aproximadamente 1:300, o al menos aproximadamente 1:400, o al menos aproximadamente 1:500, o al menos aproximadamente 1:1.000, o al menos aproximadamente 1:2.000, o al menos aproximadamente 1:3.000, o al menos aproximadamente 1:5.000, o al menos aproximadamente 1:10.000 o mayor.

En diversas realizaciones, la composición comprende además una molécula de sustrato.

20 En algunos aspectos, se proporciona una composición que comprende un producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) generado por un cebador universal, en el que el producto comprende al menos una base escindible incorporada a través del cebador universal; una endonucleasa que puede escindir la base escindible; (i) al menos un nucleótido y una ADN polimerasa que posee actividad de traducción por muesca, o (ii) una enzima que posee actividad de endonucleasa de aleta; una ADN ligasa; un adaptador 5' que comprende (i) una secuencia 3' que es complementaria a la porción 5' del complemento inverso del cebador universal expuesta por la escisión de la endonucleasa del cebador universal y (ii) una porción 5' que no es complementaria al complemento inverso del cebador universal; y en la que la porción 3' del complemento inverso del cebador universal se fusiona a un adaptador 3' parcialmente truncado de cadena doble.

30 En algunas realizaciones, la endonucleasa se selecciona del grupo que consiste en UDG + Endonucleasa VIII, RNasa HI, RNasa H2 y Endonucleasa V. En otras realizaciones, la ADN ligasa es la ADN ligasa de *E. coli* o la T4 ADN ligasa.

En otros aspectos, la divulgación proporciona una composición que comprende un producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) generado por un cebador universal, en el que el producto comprende al menos una modificación resistente a las nucleasas incorporada a través del cebador universal; una exonucleasa 5' que no es capaz de digerir el producto de la PCR más allá de la modificación resistente a las nucleasas; (i) al menos un nucleótido y una ADN polimerasa que posee actividad de traducción por muesca, o (ii) una enzima que posee actividad de endonucleasa de aleta; una ADN ligasa; un adaptador 5' que comprende (i) una secuencia 3' que es complementaria a la porción 5' del complemento inverso del cebador universal expuesta por la escisión de la endonucleasa del cebador universal y (ii) una porción 5' que no es complementaria al complemento inverso del cebador universal; y en la que la porción 3' del complemento inverso del cebador universal se fusiona a una molécula adaptadora 3' parcialmente truncada de cadena doble.

45 En otros aspectos, se proporciona un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende poner en contacto una molécula de sustrato con: (i) un par de cebadores específicos-objetivo, donde cada cebador comprende una secuencia 5' que no es complementaria a la molécula de sustrato y que incorpora un adaptador universal único en los extremos del amplicón resultante y (ii) un cebador único que comprende la secuencia de adaptador universal único y que además comprende una base escindible o una modificación resistente a las nucleasas, donde bajo condiciones de reacción apropiadas utilizando una temperatura de recocido constante para cada ciclo de PCR pero variando el tiempo de recocido, en presencia de una ADN polimerasa de alta fidelidad y nucleótidos, en que la relación molar de cada cebador específico-objetivo: cebador universal es al menos de aproximadamente 1:100, los amplicones específicos-objetivo se generan durante los primeros dos o más ciclos de PCR que tienen tiempos de fusión de 5 minutos o más, seguido de la amplificación de los amplicones resultantes durante los ciclos de PCR restantes que comprenden cada uno de ellos tiempos de fusión de 1 minuto o menos, en los que se consigue la amplificación del amplicón específico-objetivo por el cebador universal único de mayor concentración.

En aspectos adicionales, se proporciona un procedimiento de PCR multiplexada que comprende poner en contacto una molécula de sustrato con (i) una pluralidad de pares de cebadores específicos-objetivo, en los que cada cebador comprende una secuencia 5' que no es complementaria al sustrato y que incorpora un único adaptador universal en los extremos del amplicón resultante, y (ii) un único cebador que comprende la secuencia única de adaptador universal y que además comprende una base escindible o una modificación resistente a las nucleasas, donde bajo condiciones de reacción apropiadas utilizando una temperatura de recocido constante para cada ciclo de PCR pero variando el tiempo de recocido, en presencia de una ADN polimerasa de alta fidelidad y nucleótidos, en lo que la relación molar de cada cebador específico-objetivo: cebador universal es al menos de aproximadamente 1:100, los amplicones específicos-objetivo se generan durante los primeros dos o más ciclos de PCR que tienen tiempos de fusión de cinco

minutos o más, seguido de la amplificación de los amplicones resultantes durante los ciclos de PCR restantes que comprenden cada uno un tiempo de fusión de un minuto o menos, en los que se consigue la amplificación multiplexada de los amplicones específicos-objetivo por el cebador universal único de mayor concentración.

5 En algunos aspectos, se proporciona un procedimiento de conversión de un producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que comprende una única secuencia adaptadora universal en cada extremo en un producto que comprende adaptadores asimétricos 5' y 3' en cada extremo, que comprende: (a) digerir el extremo 5' del producto de PCR en el que se introdujo una base escindible o una modificación resistente a las nucleasas, seguido de (b) fusionar y (i) ligar por traducción por muesca o (ii) ligar por endonucleasa de aleta de un adaptador 5' que es complementario a la porción 5' del complemento inverso del adaptador universal que fue expuesto por la digestión, y (c) en el que un adaptador 3' parcialmente truncado de cadena doble se fusiona y liga a la porción 3' del complemento inverso del adaptador universal, convirtiendo así el producto de PCR en un producto que comprende adaptadores asimétricos en cada extremo.

15 En algunas realizaciones, el producto de PCR es un producto de amplificación del genoma completo (WGA).

En cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento, se contempla que los loci objetivo elegidos para la amplificación multiplexada correspondan a cualquiera de una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, objetivos específicos de oncología, objetivos específicos de resistencia a fármacos, objetivos de enfermedades hereditarias, objetivos de patógenos infecciosos, objetivos de anfitriones de patógenos, objetivos específicos de especies y cualquier objetivo clínicamente procesable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Fig. 1 Adaptadores NGS actuales

- Adaptador de relleno (con extremo romo o con saliente en T) con 3' y 5' hidroxilos
- Adaptador en Y (con saliente en T) con 3' hidroxilo y 5' fosfato
- Adaptador en forma de tallo (con extremo romo o en forma de T) con 3' hidroxilo y 5' hidroxilo o fosfato

Fig. 2, A y B. Químicas convencionales de ligadura de adaptadores

35 Fig. 3 Características de los adaptadores de 3' y 5'

Fig. 4 Ligadura del adaptador 5' por traducción por muesca
Los pasos incluyen:

- - desfosforilación de la molécula de sustrato
- - pulido de la molécula del sustrato/generación de extremos romos
- - ligadura del adaptador 3'
- - degradación parcial del adaptador 3' y fusión del adaptador 5'
- - extensión de la polimerasa del adaptador 5' por traducción por muesca
- - ligadura del adaptador 5' extendido al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN

Fig. 5 Ligadura del adaptador 5' por escisión de desplazamiento
Los pasos incluyen:

- 1 - desfosforilación de la molécula de sustrato
- 2 - pulido del extremo de la molécula de sustrato/generación del extremo romo
- 3- ligadura del adaptador 3'
- 4 - Degradación parcial del adaptador 3' y fusión del adaptador 5'
- 5 - Desplazamiento de la(s) base(s) 5' del fragmento de ADN y fusión de la(s) base(s) 3' del adaptador 5'

- 6 - Corte de la(s) base(s) 5' del ADN desplazada(s) por una endonucleasa de aleta 5'
- 7 - ligadura del extremo 3' del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del ADN sustrato

5 Fig. 6 La ligadura del adaptador se consigue con dos incubaciones

- el acoplamiento del adaptador 5' por fusión-traducción por muesca-ligadura acoplada se consigue en 2 incubaciones donde la 1ra incubación es un acoplamiento del adaptador 3' y la 2da incubación combina 3 reacciones que ocurren secuencialmente: (1) fusión del adaptador 5', (2) extensión del adaptador 5' por parte de la ADN polimerasa con actividad de traducción por muesca (escisión del extremo 5' dañado del ADN sustrato), y (3) ligadura del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del ADN sustrato.
- el acoplamiento del adaptador 5' por fusión-escisión-base-ligadura acoplada se consigue en 2 incubaciones donde la 1ra incubación es un acoplamiento del adaptador 3', y la 2da incubación combina 3 reacciones que ocurren secuencialmente: (1) fusión del adaptador 5' con una o varias bases aleatorias en el extremo 3' y desplazamiento de una o varias bases 5' terminales del ADN sustrato, (2) escisión de las bases 5' desplazadas por la endonucleasa de aleta 5' (escisión del extremo 5' dañado del ADN sustrato), y (3) ligadura del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del ADN sustrato.

20 Fig.7 Generación de un saliente de 3' de cadena única

- Se puede añadir enzimáticamente una secuencia de saliente de adaptador 3' mediante al menos 4 procedimientos diferentes:
 - por ligadura convencional utilizando la T4 ADN ligasa
 - por la ligasa de ADN (ARN) de cadena única
 - mediante la cola de homopolímero convencional con transferasa terminal
 - mediante la cola controlada y la ligadura simultánea del adaptador utilizando la transferasa terminal, la ADN ligasa y la molécula atenuadora-adaptadora. Véase el documento WO 2013/138536, presentado el 13 de marzo de 2013.
- Alternativamente, la fragmentación del ADN u otro tipo de procesamiento puede dar lugar a extremos de ADN preexistentes con salientes de 3' suficientes para la fusión del adaptador 5'.

35 Fig. 8 procedimientos de fusión del adaptador 5'. La Figura 8A representa los pasos (i)-(iii); la Figura 8B representa los pasos (iv)-(v).

- i) por la unión tras la degradación del 2^{do} oligonucleótido que se ha fusionado previamente al adaptador 3'
- ii) por desplazamiento competitivo del 2^{do} oligonucleótido que fue previamente reconocido al adaptador 3'
- iii) mediante la unión a la región corriente arriba del adaptador 3' (seguida de una traducción por muesca limitada y de la degradación del 2^{do} oligonucleótido que se ha unido previamente al adaptador 3')
- iv) haciendo que el adaptador 5' sea prefusioando a la región corriente arriba del adaptador 3' (seguido de una traducción por muesca limitada y de la degradación del 2 oligonucleótido que fue previamente fusionado al adaptador 3')
- v) al tener el adaptador 5' bloqueado en lugar del 2^{do} oligonucleótido que se activa por escisión

50 Fig. 9 A-D. ligadura del adaptador 5' mediante extensión de una sola base

Fig. 10 Síntesis de la biblioteca NGS de Illumina I

La síntesis de la biblioteca I se realiza en 5 o 6 pasos:

55 Figura 10a:

- 1 - desfosforilación y pulido de la molécula de sustrato
- 2 - ligadura del adaptador 3' con la secuencia Illumina P7 (a) o P5' (b)

- 3 - degradación parcial del adaptador 3' y recocido del adaptador 5' complementario con la secuencia Illumina P5 (a) o P7' (b)
- 5 • 4 - extensión de la polimerasa del adaptador 5' por traducción por muesca, y
- 5 - ligadura del extremo 3' del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN
- 10 • o, alternativamente, en la figura 10b:
- 4 - desplazamiento de la(s) base(s) 5' del sustrato de ADN y fusión de la(s) base(s) 3' del adaptador 5'
- 5 - la escisión de la(s) base(s) 5' desplazada(s) del sustrato de ADN por parte de una endonucleasa de aleta 5', y
- 15 • 6 - ligadura del extremo 3' del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN

La biblioteca se amplifica por PCR utilizando los cebadores P5 y P7'

20 Fig. 11 Síntesis de una biblioteca NGS de Illumina II
La síntesis de la biblioteca II se realiza en 4 pasos:

- 1 - Síntesis de la biblioteca NGS con el adaptador truncado P7 mediante uno de los dos procedimientos descritos en la Fig. 6
- 25 □ 2 - Amplificación de la biblioteca con el cebador P7 degradable truncado o de longitud completa*

- 3 - Degradación del cebador P7 incorporado* seguido por la fusión y la ligadura del adaptador 5' P5
- 4 - Si un cebador P7 degradable truncado * se utilizó en el segundo paso, se realizó una ligadura puente del adaptador P7* al adaptador P7*truncado para completar el adaptador P7 de longitud completa

Fig. 12 A y B. Síntesis de una biblioteca Ion Torrent La síntesis de la biblioteca se realiza mediante:

- 30 • 1 - Desfosforilación y pulido del sustrato de ADN
- 2 - ligadura del adaptador 3' con la secuencia A1'-P1' (a) o A' (b)
- 3 - ligadura de traducción por muesca o ligadura de base del extremo 3' del adaptador 5' con la secuencia A (a) o la secuencia P1-A1 (b) al extremo 5' del ADN recortado
- 4 - amplificación de la biblioteca por PCR utilizando los cebadores A y P1

35 Fig. 13 Síntesis de una biblioteca Ion Torrent con 96 secuencias combinatorias de códigos de barras utilizando sólo 20 secuencias de adaptador
Pasos de la síntesis de la biblioteca:

- 40 • 1 - Desfosforilación y pulido del extremo del ADN (no se muestra)
- 2 - ligadura del adaptador 3' (romo) P1_n con secuencia T'_n-L'-P1' y grupo fosfato 5' y oligonucleótido complementario bloqueado 3'-con secuencia P1_{tr}-L-T_n
- 45 • 3 - degradación del oligonucleótido complementario bloqueado 3'P1_{tr}-L-T_n
- 4 - recocido del adaptador 5' A_m con la secuencia A-t_m-L a la región enlazadora L'
- 5 - extensión del adaptador 5' A_m por polimerización de traducción por muesca y ligadura del extremo 3' del adaptador 5' A_m extendido al extremo 5' del ADN
- 50 □ 6 - amplificación de la biblioteca por PCR utilizando los cebadores A y P1

Los adaptadores con códigos de barras combinados incluyen 8 adaptadores P1_n que contienen secuencias de códigos de barras T₁, T₂, ..., T₈ y 12 adaptadores A_m que contienen secuencias de códigos de barras t₁, t₂, ..., t₁₂
55 La biblioteca creada tiene una secuencia combinatoria de códigos de barras t_m-L-T_n con hasta 96 combinaciones de códigos de barras.

Fig. 14 El enriquecimiento de fragmentos de restricción seleccionados mediante ligadura de adaptador 5' se selecciona un fragmento de ADN de restricción mediante ligadura de adaptador 5' seguida de amplificación por PCR. La selección se produce mediante dos adaptadores-selectores 5' A y B que contienen secuencias **a** y **b** idénticas a las secuencias terminales 5' del fragmento de restricción. El procedimiento de enriquecimiento implica:

1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción;
2. ligadura del adaptador 3';
3. degradación parcial del adaptador 3' y recocido de los adaptadores-selectores 5';
4. invasión de los adaptadores-selectores 5' en las secuencias terminales **a** y **b** del fragmento de restricción;
5. escisión de las secuencias terminales desplazadas **a** y **b** por una endonucleasa de aleta 5';
6. ligadura de los adaptadores-selectores 5' a los extremos del fragmento de restricción;
7. amplificación del fragmento de restricción seleccionado mediante PCR.

Los pasos 1, 2 y también los pasos 3 - 6 pueden combinarse en una sola reacción de incubación.

Fig. 15 Enriquecimiento objetivo mediante enriquecimiento de extensión de cebadores se realiza mediante la fijación del adaptador 5', donde el saliente 3' se crea mediante la extensión de un cebador complementario a una región de ADN objetivo en una biblioteca con adaptadores A y B y la digestión parcial del dominio 5' del adaptador A. El adaptador 5' biotinilado se anuda al saliente 3' del adaptador A y luego se liga al extremo 5' del adaptador A, ya sea después de recortarlo mediante una reacción de traducción por muesca limitada (a) o de invasión-escisión(b). A continuación, los fragmentos de la biblioteca que contienen la región de ADN objetivo se aíslan mediante captura por afinidad utilizando perlas magnéticas de estreptavidina, se amplifican mediante PCR y se analizan mediante secuenciación.

Fig. 16 Construcción alternativa de la biblioteca I

La construcción de la biblioteca puede realizarse con un único adaptador en 6 o 7 pasos:

- 1 - desfosforilación de la molécula de sustrato
- 2 - pulido del extremo de la molécula de sustrato/generación del extremo romo
- 3 - ligadura del adaptador 3' con la secuencia A'
- 4 - degradación parcial del adaptador 3' y recocido del adaptador 5' complementario con la secuencia A
- 5 - extensión de la polimerasa del adaptador 5' por traducción por muesca, y
- 6 - ligadura del extremo 3' del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN o, alternativamente, por
- 5 - desplazamiento de la(s) base(s) 5' del ADN y recocido de la(s) base(s) 3' del adaptador 5'
- 6 - la escisión de la(s) base(s) 5' desplazada(s) del ADN por una endonucleasa de aleta 5', y
- 7 - ligadura del extremo 3' del adaptador 5' al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN

La biblioteca puede ser amplificada por PCR utilizando el cebador único A

Fig. 17 Construcción alternativa de bibliotecas II

La fijación de adaptadores puede crear una biblioteca de fragmentos de ADN de doble cadena con extremos de ADN 3' y 5' unidos covalentemente. La construcción de la biblioteca es realizada por:

- 1 - desfosforilación de la molécula de sustrato (no se muestra)
- 2 - pulido del extremo de la molécula de sustrato/generación del extremo romo (no se muestra)
- 3 - ligadura del adaptador romo de la hebra con el extremo 5' fosforilado y el extremo 3' bloqueado (opcionalmente)

4 - degradación parcial del adaptador de hebra para crear un extremo 3' extensible

5 5 - traducción por muesca del extremo 3' del adaptador de la hebra y su ligadura al fosfato 5' expuesto del sustrato de ADN

Fig. 18 Construcción alternativa de bibliotecas III

Se puede construir una biblioteca NGS circularizada siguiendo los siguientes pasos:

10 1 - desfosforilación de la molécula de sustrato (no se muestra)

2 - pulido del extremo de la molécula de sustrato/generación del extremo romo (no se muestra)

15 3 - ligadura de adaptadores con un extremo 5' fosforilado y un extremo 3' bloqueado y secuencias X y X' mutuamente complementarias

4 - degradación de las cadenas de adaptador no ligadas para crear salientes 3' de cadena única

20 5 - circularización no covalente del ADN por recocido de las secuencias terminales X y X' (realizada a baja concentración de ADN)

6 - Circularización covalente del ADN por reacción de ligadura de traducción por muesca

25 Fig. 19 Comparación de la ligadura de adaptador convencional con la ligadura de adaptador 3' utilizando sustratos de oligonucleótidos marcados con FAM (Ejemplo 1)

Fig. 20 Comparación de la ligadura de adaptador convencional con la ligadura de adaptador 3' utilizando sustrato de ADN genómico cizallado y de tamaño seleccionado (Ejemplo 2)

30 Fig. 21 A y B. Optimización de la temperatura para la ligadura del adaptador 5' utilizando un sustrato de oligonucleótidos marcado con FAM (Ejemplo 3)

Fig. 22 Análisis de los efectos de la composición de los dNTP en la ligadura del adaptador 5' (Ejemplo 4)

35 Fig. 23 A y B. Reacción de traducción por muesca-ligadura acoplada con enzimas termoestables (Ejemplo 5)

Fig. 24 Reacción acoplada de escisión de desplazamiento-ligadura (Ejemplo 6)

40 Fig. 25 Reacción acoplada de escisión de desplazamiento-ligadura con adaptador en 5' específico del sustrato "N" universal/degenerado o "T" saliente en 3' (Ejemplo 7)

Fig. 26 Reacción de traducción por muesca-ligadura acoplada utilizando la ADN polimerasa I (Ejemplo 8)

45 Fig. 27 El pulido es necesario para la ligadura roma del ADN cizallado físicamente y la desfosforilación impide la formación de productos de ligadura quiméricos (Ejemplo 9)

Fig. 28 A y B. Las bibliotecas NGS tienen un mayor rendimiento cuando se preparan utilizando el recorte de bases 5' acoplado a la reacción de ligadura del adaptador (Ejemplo 10)

50 Fig. 29 A, B y C. Análisis de la secuencia de las bibliotecas NGS preparadas utilizando el recorte de bases 5' acoplado a la ligadura del adaptador (Ejemplo 11)

Figura 30 representa la estructura de los adaptadores, los sustratos modelo y las construcciones de oligonucleótidos descritas en el Ejemplo 1.

55 Fig. 31 muestra las moléculas de sustrato de FAM (véase el Ejemplo 1).

Fig. 32 - Representa la estructura de los adaptadores como se describe en el Ejemplo 2

60 Fig. 33 - Representa el sistema de construcción de oligonucleótidos como se describe en los Ejemplos 3, 4, 5 y 8.

Fig. 34 - Representa el sistema de construcción de oligonucleótidos descrito en el Ejemplo 6.

65 Fig. 35 - Representa el sistema de construcción de oligonucleótidos descrito en el Ejemplo 7.

Fig. 36 - Representa el sistema de construcción de oligonucleótidos descrito en el Ejemplo 7.

Fig. 37 - Representa la estructura de los adaptadores P7 y P5 como se describe en el Ejemplo 10.

5 Fig. 38 - Representa la estructura de los adaptadores P7 y P5 como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 39. muestra dos flujos de trabajo para el procedimiento de construcción de bibliotecas NGS de amplicones.

10 Figura 40. representa el primer flujo de trabajo donde la PCR multiplexada se divide por un paso de purificación.

Figura 41. representa el segundo flujo de trabajo en el que la PCR multiplexada se realiza como un solo paso.

Figura 42. representa el paso final de la ligadura simultánea del adaptador A y B a cada amplicón.

15 Figura 43. compara el flujo de trabajo de un tubo con el de dos tubos.

Figuras 44A y 44B muestran los productos de amplicón generados a partir de regiones objetivo de pares de cebadores superpuestos.

20 Figura 45. Ejemplo 1: gráfico de la cobertura de amplicones sobre los exones codificantes de TP53.

Figura 46. Ejemplo 1: identificación de una mutación somática en el exón 8 de TP53.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 En un aspecto, la divulgación describe un procedimiento altamente eficiente de ligadura de adaptadores a los extremos de moléculas de ADN de doble cadena fragmentadas. Dichas moléculas de ADN se denominan en el presente documento "moléculas de sustrato". En un aspecto, el procedimiento comprende una única incubación que incluye (1) la fusión de un adaptador 5' a un saliente 3' preexistente en una molécula de sustrato, preferentemente un adaptador 3', (2) la eliminación de una base dañada de los extremos 5' de las moléculas de sustrato, lo que permite (3) la ligadura eficiente del adaptador 5' al fosfato 5'-expuesto de las moléculas de sustrato. En otro aspecto, el procedimiento comprende dos incubaciones, donde en la primera incubación se liga un adaptador 3' a la molécula de sustrato, y en la segunda incubación se liga el adaptador 5' a la molécula de sustrato, tal como se ha descrito anteriormente (véase la Figura 6). En diversas realizaciones, la divulgación proporciona además procedimientos que comprenden pasos adicionales que ocurren antes de uno o dos pasos de ligadura, incluyendo: (i) una reacción de desfosforilación, (ii) una reacción de pulido para extirpar los extremos 3' dañados y generar un extremo romo, y (iii) una reacción de adenilación; la divulgación contempla diversas combinaciones de los pasos, que se discuten con más detalle a continuación.

40 En otro aspecto, la divulgación describe un procedimiento altamente eficiente de preparación de bibliotecas NGS de amplicones múltiples. En un aspecto, el procedimiento permite la síntesis y amplificación de múltiples amplicones superpuestos en un solo tubo. En otro aspecto, describe un procedimiento novedoso y altamente eficiente de ligadura de adaptadores a los extremos de amplicones de PCR que está libre de amplicones quiméricos y adaptadores-dímeros. En un aspecto, permite la incorporación de etiquetas de secuencia degenerada únicas para identificar amplicones individuales. En otro aspecto, el procedimiento comprende una única incubación que incluye la degradación de los extremos 5' de los amplicones, seguida de la ligadura simultánea del segundo adaptador B y la ligadura mediada por el enlazador del resto del 1er adaptador A los amplicones del sustrato. En diversas realizaciones, la divulgación proporciona además procedimientos que comprenden pasos adicionales que ocurren antes del paso de ligadura, incluyendo: (i) una reacción de PCR multiplexada (ii) un paso de purificación, y (iii) un paso de amplificación universal con un solo cebador. Alternativamente, los pasos adicionales que ocurren antes del paso de ligadura incluyen: (i) una reacción combinada de PCR múltiple con amplificación universal de cebador único, seguida de (ii) un paso de purificación. La divulgación contempla diversas opciones de pasos, que se discuten con más detalle a continuación.

55 El término "condiciones de reacción" o "condiciones de reacción estándar", tal y como se utiliza en el presente documento, indica condiciones de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se entiende que todas las enzimas divulgadas en el presente documento se utilizan bajo condiciones de reacción estándar, a menos que se indique lo contrario. El término "primer polinucleótido", tal y como se utiliza en el presente documento, se usa indistintamente con "adaptador 3'", "primer adaptador" o "Adaptador A" y el término "segundo polinucleótido", tal y como se utiliza en el presente documento, se usa indistintamente con "adaptador 5'", "segundo adaptador" o "Adaptador B". En ciertos casos, cuando el Adaptador A se utiliza en referencia a la tecnología IonTorrent™, *por ejemplo*, las Figuras 12-13, se refiere al Adaptador A tal como lo proporciona el fabricante para el procedimiento IonTorrent™, y no al "Adaptador A" tal como se define en el presente documento.

65 Un "adaptador 3'", tal como se utiliza en el presente documento, se liga a un extremo 3' de una molécula de sustrato, y un "adaptador 5'" se liga a un extremo 5' de una molécula de sustrato. Tal y como se utiliza en el presente documento, un extremo 5' "dañado" es aquel que carece de un fosfato 5'.

Tal y como se utiliza en el presente documento, una molécula de sustrato "procesada" es aquella a la que se ha unido un adaptador 5'.

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, una "polimerasa de alta fidelidad" es aquella que posee actividad exonucleasa 3'-5' (es *decir*, con verificación de prueba).

El término "tolerante", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una propiedad de una polimerasa que puede extenderse a través de una plantilla que contiene una base escindible (por ejemplo, uracilo, inosina y ARN).

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "asimétrico" se refiere a una molécula de cadena doble con ambos adaptadores en ambos extremos en lugar de un único adaptador en ambos extremos. Así, la asimetría surge del hecho de que ambos adaptadores son en gran medida no complementarios entre sí y tienen porciones de una sola cadena.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, un "cebador universal" es un oligonucleótido utilizado en una reacción de amplificación para incorporar una secuencia adaptadora universal. Un "adaptador universal", tal como se utiliza en el presente documento, es una porción del producto de amplificación que corresponde a la secuencia del cebador universal y su complemento inverso.

20 Se entenderá que una modificación que disminuye la estabilidad de unión de dos ácidos nucleicos incluye, pero no se limita a un desajuste de nucleótidos, una desoxiinosina, una inosina o una base universal.

25 También se entenderá que una modificación que aumenta la estabilidad de unión de dos ácidos nucleicos incluye, pero no se limita a un ácido nucleico bloqueado (LNA), espermina y espermidina u otras poliaminas, y la metilación de citosina.

30 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "base universal" es aquella que puede formar un par de bases con las cuatro bases naturales sin enlace de hidrógeno y es menos desestabilizante que un desajuste, e incluye, pero no se limita, al nitroindol 5'.

Una "etiqueta de identificación molecular", tal como se utiliza en el presente documento, tiene una longitud de entre 4 y 16 bases, donde la longitud óptima es de entre 8 y 12 bases N degeneradas.

35 **Molécula de sustrato**

Se contempla que una molécula de sustrato se obtenga de una fuente natural o puede ser sintética. Las fuentes naturales incluyen, pero no se limita a, el ADN genómico, el ADNc, el ADN producido por amplificación del genoma completo, los productos de extensión de los cebadores que comprenden al menos una terminación de doble cadena y un amplicón de PCR. La fuente natural es, en diversas realizaciones, una fuente procariota o una fuente eucariota. Por ejemplo y sin limitación, la fuente puede ser un humano, un ratón, un virus, una planta o una bacteria o una mezcla que comprenda una pluralidad de genomas.

45 Tal y como se utiliza en el presente documento, se entiende que un "amplicón" es una porción de un polinucleótido que se ha sintetizado mediante técnicas de amplificación.

Si la fuente de la molécula de sustrato es ADN genómico, se contempla que en algunas realizaciones el ADN genómico esté fragmentado. La fragmentación del ADN genómico es un procedimiento general conocido por los expertos en la técnica y se lleva a cabo, por ejemplo y sin limitación, in vitro, mediante el cizallamiento (nebulización) del ADN, la escisión del ADN con una endonucleasa, la sonicación del ADN, el calentamiento del ADN, la irradiación del ADN utilizando fuentes alfa, beta, gamma u otras fuentes radiactivas, la luz, la escisión química del ADN en presencia de iones metálicos, la escisión radical y combinaciones de las mismas. La fragmentación del ADN genómico también puede producirse in vivo, por ejemplo y sin limitación, debido a la apoptosis, la radiación y/o la exposición al amianto. De acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, no se requiere que una población de moléculas de sustrato sea de un tamaño uniforme. Así, los procedimientos de la divulgación son eficaces para su uso con una población de fragmentos de polinucleótidos de sustrato de tamaño diferente.

La molécula de sustrato, tal como se divulga en el presente documento, es al menos parcialmente de cadena doble y comprende un saliente 3' (véase la Figura 7a), un extremo romo, un extremo empotrado 3' o un grupo hidroxilo 3' libre. La longitud de un saliente o extremo empotrado de un polinucleótido de sustrato puede variar. En diversos aspectos, la longitud de un saliente o extremo empotrado de una molécula de sustrato es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la longitud de un extremo saliente o empotrado de una molécula de sustrato es de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, la longitud de un saliente o extremo empotrado de una molécula de sustrato es de aproximadamente 1 a

aproximadamente 5, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Una población de moléculas de sustrato, en diversos aspectos, incluye aquellas en las que más de uno de los tipos de moléculas de sustrato mencionados anteriormente están presentes en una sola reacción. La divulgación también contempla que la molécula de sustrato sea al menos parcialmente de cadena única. Los aspectos de la divulgación en los que la molécula de sustrato es de cadena única implican el uso de una enzima ligasa de cadena única.

Algunas aplicaciones de la presente divulgación implican la unión de secuencias de adaptador no a moléculas de sustrato de ADN de cadena doble originales o nativas, sino a un ADN de cadena doble producido por síntesis de extensión de cebadores. Un ejemplo de dicha aplicación es una biblioteca de ADN producida por (a) la unión de un oligonucleótido que comprende una secuencia de unión a cebador al extremo 3' de ADN de cadena única o de cadena doble para permitir la extensión del cebador, (b) la extensión del cebador fusionado al oligonucleótido, y (c) la unión de los adaptadores 3' y 5' a los extremos de ADN de cadena doble producidos por la extensión del cebador.

Se contempla que la longitud de una porción de cadena doble o de una porción de cadena única de una molécula de sustrato esté entre aproximadamente 3 y aproximadamente 1×10^6 nucleótidos. En algunos aspectos, la longitud de la molécula de sustrato está entre aproximadamente 10 y aproximadamente 3.000 nucleótidos, o entre aproximadamente 40 y aproximadamente 2.000 nucleótidos, o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1.000 nucleótidos, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 500 nucleótidos, o entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 5.000 nucleótidos, o entre aproximadamente 10.000 y 50.000 nucleótidos, o entre aproximadamente 100.000 y 1×10^6 nucleótidos. En otros aspectos, la longitud de la molécula de sustrato es de al menos 3 y hasta aproximadamente 50, 100 o 1.000 nucleótidos; o al menos 10 y hasta aproximadamente 50, 100 o 1.000 nucleótidos; o al menos 100 y hasta aproximadamente 1.000, 5.000 o 1.0000 nucleótidos o al menos 1000 y hasta aproximadamente 10.000, 20.000 y 50.000; o al menos 10.000 y hasta aproximadamente 20.000, 50.000 y 100.000 nucleótidos; o al menos 20.000 y hasta aproximadamente 100.000, 200.000 o 500.000 nucleótidos; o al menos 200.000 y hasta aproximadamente 500.000, 700.000 o 1.000.000 nucleótidos. En diversos aspectos, la longitud de la molécula de sustrato es aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 51, aproximadamente 52, aproximadamente 53, aproximadamente 54, aproximadamente 55, aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58, aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67, aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74, aproximadamente 75, aproximadamente 76, aproximadamente 77, aproximadamente 78, aproximadamente 79, aproximadamente 80, aproximadamente 81, aproximadamente 82, aproximadamente 83, aproximadamente 84, aproximadamente 85, aproximadamente 86, aproximadamente 87, aproximadamente 88, aproximadamente 89, aproximadamente 90, aproximadamente 91, aproximadamente 92, aproximadamente 93, aproximadamente 94, aproximadamente 95, aproximadamente 96, aproximadamente 97, aproximadamente 98, aproximadamente 99, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 260, aproximadamente 270, aproximadamente 280, aproximadamente 290, aproximadamente 300, aproximadamente 310, aproximadamente 320, aproximadamente 330, aproximadamente 340, aproximadamente 350, aproximadamente 360, aproximadamente 370, aproximadamente 380, aproximadamente 390, aproximadamente 400, aproximadamente 410 aproximadamente 420, aproximadamente 430, aproximadamente 440, aproximadamente 450, aproximadamente 460, aproximadamente 470, aproximadamente 480, aproximadamente 490, aproximadamente 500, aproximadamente 510, aproximadamente 520, aproximadamente 530, aproximadamente 540, aproximadamente 550, aproximadamente 560, aproximadamente 570, aproximadamente 580, aproximadamente 590, aproximadamente 600, aproximadamente 610, aproximadamente 620, aproximadamente 630, aproximadamente 640, aproximadamente 650, aproximadamente 660, aproximadamente 670, aproximadamente 680, aproximadamente 690, aproximadamente 700, aproximadamente 710, aproximadamente 720, aproximadamente 730, aproximadamente 740, aproximadamente 750, aproximadamente 760, aproximadamente 770, aproximadamente 780, aproximadamente 790, aproximadamente 800, aproximadamente 810, aproximadamente 820, aproximadamente 830, aproximadamente 840, aproximadamente 850, aproximadamente 860, aproximadamente 870, aproximadamente 880, aproximadamente 890, aproximadamente 900, aproximadamente 910, aproximadamente 920, aproximadamente 930, aproximadamente 940, aproximadamente 950, aproximadamente 960, aproximadamente 970, aproximadamente 980, aproximadamente 990, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.100, aproximadamente 1.200, aproximadamente 1.300, aproximadamente 1.400, aproximadamente 1.500, aproximadamente 1.600, aproximadamente 1.700, aproximadamente 1.800, aproximadamente 1.900, aproximadamente 2.000, aproximadamente 2.100,

aproximadamente 2.200, aproximadamente 2.300, aproximadamente 2.400, aproximadamente 2.500,
aproximadamente 2.600, aproximadamente 2.700, aproximadamente 2.800, aproximadamente 2.900,
aproximadamente 3.000, aproximadamente 3.100, aproximadamente 3.200, aproximadamente 3.300,
aproximadamente 3.400, aproximadamente 3.500, aproximadamente 3.600, aproximadamente 3.700,
5 aproximadamente 3.800, aproximadamente 3.900, aproximadamente 4.000, aproximadamente 4.100,
aproximadamente 4.200, aproximadamente 4.300, aproximadamente 4.400, aproximadamente 4.500,
aproximadamente 4.600, aproximadamente 4.700, aproximadamente 4.800, aproximadamente 4.900,
aproximadamente 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 50.000, 100.000, 150.000, 200.000, 250.000, 300.000, 350.000,
400.000, 450.000, 500.000, 550.000, 600.000, 650.000, 700.000, 750.000, 800.000, 850.000, 900.000, 950.000,
10 1.000.000 de nucleótidos o más.

Moléculas de amplicón

Tal y como se utiliza en el presente documento, se entiende que un "amplicón" es una porción de un polinucleótido que se ha sintetizado mediante técnicas de amplificación.

Se contempla que la longitud de un amplicón esté entre aproximadamente 10 pb y 175 pb, donde el tamaño del amplicón deseado es significativamente más corto que los fragmentos de ADN libre de células circulantes (~165 pb) y lo suficientemente pequeño en tamaño como para no abarcar el ADN entrecruzado inducido por formalina de las muestras conservadas, idealmente < 150 pb de longitud. Se contempla que el amplicón puede ser de 15 pb, 20 pb, 25 pb, 30 pb, 35 pb, 40 pb, 45 pb, 50 pb, 51 pb, 52 pb, 53 pb, 54 pb, 55 pb, 56 pb, 57 pb, 58 pb, 59 pb, 60 pb, 61 pb, 62 pb, 63 pb, 64 pb, 65 pb, 66 pb, 67 pb, 68 pb, 69 pb, 70 pb, 71 pb, 72 pb, 73 pb, 74 pb, 75 pb, 76 pb, 77 pb, 78 pb, 79 pb, 80 pb, 81 pb, 82 pb, 83 pb, 84 pb, 85 pb, 86 pb, 87 pb, 88 pb, 89 pb, 90 pb, 91 pb, 92 pb, 93 pb, 94 pb, 95 pb, 96 pb, 97 pb, 98 pb, 99 pb, 100 pb, 101 pb, 102 pb, 103 pb, 104 pb, 105 pb, 106 pb, 107 pb, 108 pb, 109 pb, 110 pb, 111 pb, 112 pb, 113 pb, 114 pb, 115 pb, 116 pb, 117 pb, 118 pb, 119 pb, 120 pb, 121 pb, 122 pb, 123 pb, 124 pb, 125 pb, 126 pb, 127 pb, 128 pb, 129 pb, 130 pb, 131 pb, 132 pb, 133 pb, 134 pb, 135 pb, 136 pb, 137 pb, 138 pb, 139 pb, 140 pb, 141 pb, 142 pb, 143 pb, 144 pb, 145 pb, 146 pb, 147 pb, 148 pb, 149 pb, 150 pb, 151 pb, 152 pb, 153 pb, 154 pb, 155 pb, 156 pb, 157 pb, 158 pb, 159 pb, 160 pb, 161 pb, 162 pb, 163 pb, 164 pb, 165 pb, 166 pb, 167 pb, 168 pb, 169 pb, 170 pb, 171 pb, 172 pb, 173 pb, 174 pb, 175 pb o más.

Alternativamente, para lecturas más largas, particularmente para tecnologías de secuencias de lectura larga capaces de proporcionar lecturas de múltiples kilobases que proporcionan información de haplotipación o abarcan secuencias repetitivas u otras difíciles (PacBio), se contempla que la longitud del amplicón esté entre 150 pb y 150.000 pb o más de longitud, cuando se utiliza ADN de alto peso molecular como ADN de entrada para la reacción de amplificación. Se contempla que el amplicón puede ser de 150 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1.000 pb, 2.000 pb, 3.000 pb, 4.000 pb, 5.000 pb, 6.000 pb, 7.000 pb, 8.000 pb, 9.000 pb, 10.000 pb, 11.000 pb, 12.000 pb, 13.000 pb, 14.000 pb, 15.000 pb, 16.000 pb, 17.000 pb, 18.000 pb, 19.000 pb, 20.000 pb, 30.000 pb, 40.000 pb, 50.000 pb, 100.000 pb, 150.000 pb o más de longitud.

En cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento, se contempla que los loci objetivo elegidos para la amplificación multiplexada correspondan a cualquiera de una variedad de aplicaciones, incluyendo pero sin limitarse a objetivos específicos de oncología, objetivos específicos de resistencia a fármacos, objetivos de metabolismo y absorción de fármacos (por ejemplo, CYP2D6), objetivos para enfermedades hereditarias (por ejemplo, el gen CFTR de la fibrosis quística, los genes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 y EPCAM del síndrome de Lynch), objetivos de patógenos infecciosos, objetivos de loci de hospedadores de patógenos, objetivos específicos de especies y cualquier objetivo clínicamente procesable. En un aspecto, los loci objetivo se eligen entre un conjunto de objetivos oncológicos que incluyen, pero no se limitan a BRAF, KRAS, EGFR, KIT, HRAS, NRAS, MET, RET, GNA11, GNAQ, NOTCH1, ALK, PIK3CA, JAK2, AKT1, DNMT3A, IDH2, ERBB2 y TP53. En otro aspecto, los objetivos oncológicos incluyen 400-600 genes, incluyendo pero no limitándose al siguiente subconjunto de genes: ACURL1, AKT1, APC, APEX1, AR, ATM, ATP11B, BAP1, BCL2L1, BCL9, BIRC2, BIRC3, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCNE1, CD274, CD44, CDH1, CDK4, CDK6, CDKN2A, CSNK2A1, DCON1D1, EGFR, ERBB2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GAS6, GATA3, IGF1R, IL6, KIT, KRAS, MCL1, MDM2, MET, MSH2, MYC, MYCL, MYCN, MYO18A, NF1, NF2, NKX2-1, NKX2-8, NOTCH1, PDCD1LG2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PNP, PPARG, PTCH1, PTEN, RB1, RPS6KB1, SMAD4, SMARCB1, SOX2, STK11, TERT, TET2, TIAF1, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WT1 y ZNF217. En realizaciones adicionales, los loci objetivo se eligen de un subconjunto de genes que se sabe que tienen relevancia clínica en oncología, incluyendo, pero sin limitarse a, ABI1, ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, AKT1, AKT2, ALDH2, ALK, ALO17, AMER1, APC, ARHGEF12, ARHH, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATP1A1, ATP2B3, ATRX, AXIN1, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPR1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, C2orf44, CACNA1D, CALR, CAMTA1, CANT1, CARD11, CARS, CASP8, CBFA2T1, CBFA2T3, CBFB, CBL, CBLB, CBLC, CCDC6, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDC73, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2C, CDKN2a(p14), CDX2, CEBPA, CEP1, CEP89, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, CIITA, CLIP1, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, CNOT3, COL1A1, COL2A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC3, CSF3R, CTNNB1, CUX1, CYLD, D10S170, DAXX, DCTN1, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, DICER1, DNM2, DNMT3A, DUX4, EBF1, ECT2L, EGFR, EIF3E, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS15,

ERBB2, ERC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, EZR, FACL6, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FAS, FBXO11, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FH, FHIT, FIP1L1, FLI1, FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXA1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXO4, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, H3F3A, H3F3B, HCMOGT-1, HEAB, HERPUD1, HEY1, HIP1, HIST1H3B, HIST1H4I, HLA-A, HLF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH1, IGK, IGL, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIAA1598, KIF5B, KIT, KLF4, KLK2, KMT2D, KRAS, KTN1, LAF4, LASP1, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMNA, LMO1, LMO2, LPP, LRIG3, LSM14A, LYL1, MAF, MAFB, MALAT1, MALT1, MAML2, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLH1, MLL, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYO5A, MYST4, NAB2, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFATC2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NRG1, NSD1, NT5C2, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, NUTM2A, NUTM2B, NOLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PHF6, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PLCG1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNU1L1, POT1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPFIBP1, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1A, PSIP1, PTCH1, PTEN, PTPN11, PTPRB, PTPRC, PTPRK, PWWP2A, RAB5EP, RAC1, RAD21, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAP1GDS1, RARA, RB1, RBM15, RECQL4, REL, RET, RNF43, ROS1, RPL10, RPL22, RPL5, RPN1, RSPO2, RSPO3, RUNDC2A, RUNX1, RUNXBP2, SBDS, SDC4, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, 42253, SET, SETBP1, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH2B3, SH3GL1, SIL, SLC34A2, SLC45A3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMO, SOCS1, SOX2, SRGAP3, SRSF2, SS18, SS18L1, SSX1, SSX2, SSX4, STAG2, STAT3, STAT5B, STAT6, STK11, STL, SUFU, SUZ12, SYK, TAF15, TALI, TAL2, TBL1XR1, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TERT, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TFPT, TFRC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TOP1, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA, TRAF7, TRB, TRD, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, UBR5, USP6, VHL, VT1A, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WWTR1, XPA, XPC, XPO1, YWHAE, ZCCHC8, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9 y ZRSR2.

En otro aspecto, los objetivos son específicos para los loci de resistencia a los fármacos, incluyendo los loci que confieren resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa utilizados como agentes antitumorales dirigidos, otros loci dirigidos relacionados con agentes antitumorales dirigidos, loci de resistencia a los antibióticos y loci de resistencia antiviral.

En otro aspecto, se puede realizar la detección de patógenos entéricos, transmitidos por la sangre, del SNC, respiratorios, de transmisión sexual y del tracto urinario, incluyendo bacterias, hongos, levaduras, virus o parásitos. También podrían detectarse los patógenos que causan infecciones en el oído, la dermis o los ojos. Se podría realizar la diferenciación entre patógenos de bacterias o virus, así como los genes que promueven la resistencia a los antibióticos o que codifican toxinas.

Los tipos de lesiones genéticas que pueden detectarse a partir del análisis de la secuencia de los amplicones resultantes incluyen SNV (variantes de un solo nucleótido), mutaciones puntuales, transiciones, transversiones, mutaciones sin sentido, mutaciones sin sentido, inserciones y deleciones de una sola base, inserciones y deleciones más grandes que se mapean entre un par de cebadores, reordenamientos cromosómicos conocidos como translocaciones, fusiones de genes, deleciones, inserciones donde los pares de cebadores están diseñados para flanquear el punto de ruptura de dichos reordenamientos conocidos; variaciones del número de copias que incluyen eventos de amplificación, deleciones y pérdida de heterocigosidad (LOH), aneuploidía, disomías uniparentales y otras anomalías cromosómicas heredadas o adquiridas. Además, si la conversión a bisulfito se realiza antes de la PCR multiplexada y los cebadores se diseñan para el ADN convertido a bisulfito y, opcionalmente, no se solapan con los dinucleótidos CpG, que pueden dar lugar a diversos estados de secuencia modificados que dificultan el diseño de los cebadores, los cambios de metilación también pueden detectarse utilizando el procedimiento divulgado.

Para la amplificación de los loci objetivo, la longitud óptima de la porción 3' objetivo-específica del objetivo del cebador está entre 15 y 30 bases, pero no se limita a este intervalo, donde la porción objetivo-específica del cebador es de 5 a 50 bases o de 10 a 40 bases o cualquier longitud intermedia. La T_m deseada definida a 2,5mM de Mg^{2+} , 50 mM de NaCl y 0,25 μM de oligonucleótidos es de 63 °C, donde la variación de la T_m entre los cebadores multiplexados no es superior a $\pm 2,5$ °C para garantizar una amplificación uniforme bajo condiciones de reacción fijas. El contenido GC deseado de la parte objetivo-específica de los cebadores es idealmente 50 %, pero puede variar entre 30 % y 70 %. Los cebadores específicos-objetivo están diseñados para evitar el solapamiento con secuencias repetitivas, no únicas o polimorfismos SNP comunes o mutaciones conocidas para la condición que se está analizando, con el fin de garantizar una amplificación específica e imparcial de las muestras de ADN de diversos orígenes genéticos. Además, los objetivos objetivo-específica y los diseños de cebadores complementarios no deberían estar sujetos a la formación de estructuras secundarias, lo que reduciría el rendimiento.

El cebador universal comprende bases escindibles que incluyen, pero no se limitan a desoxiuridina, desoxiinosina o ARN, y puede contener una, dos, tres, cuatro, cinco o más bases escindibles. Además, los cebadores específicos-

objetivo y el cebador universal comprenden 1, 2, 3, 4 o más moléculas resistentes a las nucleasas en sus extremos 3'.

Molécula adaptadora

La divulgación contempla el uso de un adaptador 5' y un adaptador 3' (véase la Figura 3). De acuerdo con la divulgación, un adaptador 3' es opcionalmente de doble cadena, comprendiendo un "oligonucleótido 1" y un "oligonucleótido 2". Para dicha molécula de sustrato de cadena doble, se contempla cualquier longitud del oligonucleótido 1 y del oligonucleótido 2, siempre y cuando los dos oligonucleótidos sean capaces de recocido entre sí bajo condiciones de reacción estándar. Por lo tanto, la complementariedad entre el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2 es tal que pueden fusionar entre sí. En diversas realizaciones, la complementariedad es de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % a aproximadamente 100 %, o de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, a aproximadamente 95 %, o de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 % a aproximadamente 90 %. En realizaciones específicas, el grado de complementariedad entre el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2 es 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %. En otras realizaciones, el oligonucleótido 2 comprende un nucleótido susceptible de degradación/eliminación, tal como un nucleótido abásico o un ribonucleótido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido 1 y el oligonucleótido 2 tienen longitudes diferentes y el oligonucleótido 1 se hibrida en cualquier parte de la longitud del oligonucleótido 2.

En otras realizaciones, el adaptador 5' es de cadena única. En las realizaciones en las que el adaptador 5' se hibrida con el oligonucleótido 1 del adaptador 3', se contempla en otras realizaciones que dicho recocido da lugar a una muesca, a una brecha o a una base o bases superpuestas entre el adaptador 5' y la molécula de sustrato (véase la Figura 8). En diversas realizaciones, la brecha o el número de bases superpuestas es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 bases de longitud. En otra realización en la que el adaptador 3' es de cadena doble, tras la fusión del adaptador 5' al adaptador 3', se añade una enzima para catalizar la "masticación hacia delante" del adaptador 5' mediante la traducción por muesca para eliminar el oligonucleótido 2. En algunas realizaciones, el adaptador 5' comprende además una base N aleatoria simple, doble o más en su extremo 3' que no es complementaria al oligonucleótido 1 y que puede fusionar a la(s) primera(s) base(s) de la molécula de sustrato si sus bases 5' están desplazadas. En otras realizaciones, el adaptador 5' es un polinucleótido modificado. Los oligonucleótidos modificados que se contemplan para su uso se divulgan en Solicitud de Patente de los Estados Unidos Número de Publicación 2011/0129832. En una realización específica, el adaptador 5' comprende una modificación de base seleccionada del grupo que consiste en un ácido nucleico bloqueado (LNA) y un ácido nucleico peptídico (PNA). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido adaptador 5' se preanuncia al adaptador 3' (véase la Fig. 8).

La divulgación también contempla el uso de un adaptador universal incorporado por PCR, un adaptador 5' de cadena única y el resto de un adaptador 3' que se liga a una cadena del adaptador universal en sustratos de amplicones parcialmente procesados. De acuerdo con la divulgación, la ligadura del resto del adaptador 3' está mediada por un enlazador. Para la molécula enlazadora, se contempla cualquier longitud complementaria al adaptador universal y al resto del adaptador 3', siempre y cuando los tres oligonucleótidos sean capaces de fusionarse entre sí bajo condiciones de reacción estándar. Así, la complementariedad es tal que pueden fusionarse entre sí. En diversas realizaciones, la complementariedad es de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % a aproximadamente 100 %, o de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, a aproximadamente 95 %, o de aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 % a aproximadamente 90 %.

En otras realizaciones, el adaptador 5' es de cadena única. En las realizaciones en las que el adaptador 5' se hibrida con el saliente 3' del adaptador universal en los extremos del amplicón, se contempla en otras realizaciones que dicho recocido da lugar a una muesca o a una brecha entre el adaptador 5' y el sustrato del amplicón. En diversas realizaciones, la brecha es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 bases de longitud.

La longitud de un adaptador universal, del adaptador 5' B o del resto del adaptador 3' A se contempla entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 nucleótidos. En algunos aspectos, la longitud del adaptador universal, del adaptador 5' o del adaptador 3' está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 nucleótidos, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 150 nucleótidos, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 nucleótidos, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 nucleótidos, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 nucleótidos, o entre aproximadamente 10 y 200 nucleótidos, o entre aproximadamente 10 y 100 nucleótidos. En otros aspectos, la longitud del adaptador 5' o del adaptador 3' es de al menos 5 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos; o al menos 10 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos; o al menos 15 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos; o al menos 20 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos; o al menos 30 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos; o al menos 40 y hasta aproximadamente 50, 100 o 200 nucleótidos. En diversos aspectos, la longitud de la molécula de sustrato es de aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24,

	aproximadamente 25,	aproximadamente 26,	aproximadamente 27,	aproximadamente 28,	aproximadamente 29,
	aproximadamente 30,	aproximadamente 31,	aproximadamente 32,	aproximadamente 33,	aproximadamente 34,
	aproximadamente 35,	aproximadamente 36,	aproximadamente 37,	aproximadamente 38,	aproximadamente 39,
	aproximadamente 40,	aproximadamente 41,	aproximadamente 42,	aproximadamente 43,	aproximadamente 44,
5	aproximadamente 45,	aproximadamente 46,	aproximadamente 47,	aproximadamente 48,	aproximadamente 49,
	aproximadamente 50,	aproximadamente 51,	aproximadamente 52,	aproximadamente 53,	aproximadamente 54,
	aproximadamente 55,	aproximadamente 56,	aproximadamente 57,	aproximadamente 58,	aproximadamente 59,
	aproximadamente 60,	aproximadamente 61,	aproximadamente 62,	aproximadamente 63,	aproximadamente 64,
	aproximadamente 65,	aproximadamente 66,	aproximadamente 67,	aproximadamente 68,	aproximadamente 69,
10	aproximadamente 70,	aproximadamente 71,	aproximadamente 72,	aproximadamente 73,	aproximadamente 74,
	aproximadamente 75,	aproximadamente 76,	aproximadamente 77,	aproximadamente 78,	aproximadamente 79,
	aproximadamente 80,	aproximadamente 81,	aproximadamente 82,	aproximadamente 83,	aproximadamente 84,
	aproximadamente 85,	aproximadamente 86,	aproximadamente 87,	aproximadamente 88,	aproximadamente 89,
	aproximadamente 90,	aproximadamente 91,	aproximadamente 92,	aproximadamente 93,	aproximadamente 94,
15	aproximadamente 95,	aproximadamente 96,	aproximadamente 97,	aproximadamente 98,	aproximadamente 99,
	aproximadamente 100,	aproximadamente 110,	aproximadamente 120,	aproximadamente 130,	aproximadamente 140,
	aproximadamente 150,	aproximadamente 160,	aproximadamente 170,	aproximadamente 180,	aproximadamente 190,
	aproximadamente 200,	aproximadamente 300,	aproximadamente 400,	aproximadamente 500,	aproximadamente 600,
20	aproximadamente 700,	aproximadamente 800,	aproximadamente 900,	aproximadamente 1.000,	aproximadamente 1.100,
	aproximadamente 1.200,	aproximadamente 1.300,	aproximadamente 1.400,	aproximadamente 1.500,	aproximadamente 1.600,
	aproximadamente 1.700,	aproximadamente 1.800,	aproximadamente 1.900,	aproximadamente 2.000,	aproximadamente 2.100,
	aproximadamente 2.200,	aproximadamente 2.300,	aproximadamente 2.400,	aproximadamente 2.500,	aproximadamente 2.600,
	aproximadamente 2.700,	aproximadamente 2.800,	aproximadamente 2.900,	aproximadamente 3.000,	aproximadamente 3.100,
25	aproximadamente 3.200,	aproximadamente 3.300,	aproximadamente 3.400,	aproximadamente 3.500,	aproximadamente 3.600,
	aproximadamente 3.700,	aproximadamente 3.800,	aproximadamente 3.900,	aproximadamente 4.000,	aproximadamente 4.100,
	aproximadamente 4.200,	aproximadamente 4.300,	aproximadamente 4.400,	aproximadamente 4.500,	aproximadamente 4.600,
	aproximadamente 4.700,	aproximadamente 4.800,	aproximadamente 4.900,	aproximadamente 5.000,	aproximadamente 5.100,
30	aproximadamente 5.200,	aproximadamente 5.300,	aproximadamente 5.400,	aproximadamente 5.500,	aproximadamente 5.600,
	aproximadamente 5.700,	aproximadamente 5.800,	aproximadamente 5.900,	aproximadamente 6.000,	aproximadamente 6.100,
	aproximadamente 6.200,	aproximadamente 6.300,	aproximadamente 6.400,	aproximadamente 6.500,	aproximadamente 6.600,
	aproximadamente 6.700,	aproximadamente 6.800,	aproximadamente 6.900,	aproximadamente 7.000,	aproximadamente 7.100,
35	aproximadamente 7.200,	aproximadamente 7.300,	aproximadamente 7.400,	aproximadamente 7.500,	aproximadamente 7.600,
	aproximadamente 7.700,	aproximadamente 7.800,	aproximadamente 7.900,	aproximadamente 8.000,	aproximadamente 8.100,
	aproximadamente 8.200,	aproximadamente 8.300,	aproximadamente 8.400,	aproximadamente 8.500,	aproximadamente 8.600,
	aproximadamente 8.700,	aproximadamente 8.800,	aproximadamente 8.900,	aproximadamente 9.000,	aproximadamente 9.100,
40	aproximadamente 9.200,	aproximadamente 9.300,	aproximadamente 9.400,	aproximadamente 9.500,	aproximadamente 9.600,
	aproximadamente 9.700,	aproximadamente 9.800,	aproximadamente 9.900,	aproximadamente 10.000,	aproximadamente 10.500,
	aproximadamente 11.000,	aproximadamente 11.500,	aproximadamente 12.000,	aproximadamente 12.500,	aproximadamente 13.000,
	aproximadamente 13.500,	aproximadamente 14.000,	aproximadamente 14.500,	aproximadamente 15.000,	aproximadamente 15.500,
45	aproximadamente 16.000,	aproximadamente 16.500,	aproximadamente 17.000,	aproximadamente 17.500,	aproximadamente 18.000,
	aproximadamente 18.500,	aproximadamente 19.000,	aproximadamente 19.500,	aproximadamente 20.000,	aproximadamente 20.500,
	aproximadamente 21.000,	aproximadamente 21.500,	aproximadamente 22.000,	aproximadamente 22.500,	aproximadamente 23.000,
	aproximadamente 23.500,	aproximadamente 24.000,	aproximadamente 24.500,	aproximadamente 25.000,	aproximadamente 25.500,
50	aproximadamente 26.000,	aproximadamente 26.500,	aproximadamente 27.000,	aproximadamente 27.500,	aproximadamente 28.000,
	aproximadamente 28.500,	aproximadamente 29.000,	aproximadamente 29.500,	aproximadamente 30.000,	aproximadamente 30.500,
	aproximadamente 31.000,	aproximadamente 31.500,	aproximadamente 32.000,	aproximadamente 32.500,	aproximadamente 33.000,
	aproximadamente 33.500,	aproximadamente 34.000,	aproximadamente 34.500,	aproximadamente 35.000,	aproximadamente 35.500,
55	aproximadamente 36.000,	aproximadamente 36.500,	aproximadamente 37.000,	aproximadamente 37.500,	aproximadamente 38.000,
	aproximadamente 38.500,	aproximadamente 39.000,	aproximadamente 39.500,	aproximadamente 40.000,	aproximadamente 40.500,
	aproximadamente 41.000,	aproximadamente 41.500,	aproximadamente 42.000,	aproximadamente 42.500,	aproximadamente 43.000,
	aproximadamente 43.500,	aproximadamente 44.000,	aproximadamente 44.500,	aproximadamente 45.000,	aproximadamente 45.500,
60	aproximadamente 46.000,	aproximadamente 46.500,	aproximadamente 47.000,	aproximadamente 47.500,	aproximadamente 48.000,
	aproximadamente 48.500,	aproximadamente 49.000,	aproximadamente 49.500,	aproximadamente 50.000,	aproximadamente 60.000,
	aproximadamente 70.000,	aproximadamente 80.000,	aproximadamente 90.000,	aproximadamente 100.000 o más nucleótidos de longitud.	
65	Para completar la ligadura del adaptador NGS, el cebador adaptador universal comprende adicionalmente bases modificadas y/o enlaces que pueden ser destruidos enzimática, química o físicamente. Las modificaciones incluyen,				

pero no se limitan a, las bases dU, la desoxiinosina y las bases de ARN. La fusión del adaptador 5' de cadena única al saliente 3' de los amplicones se produce como resultado de la degradación de una cadena del adaptador universal que corresponde al cebador universal incorporado con bases escindibles. En algunas realizaciones, la degradación se logra enzimáticamente, más específicamente, mediante el uso de uracilo-ADN glicosilasa (UDG), o una combinación de UDG y endonucleasa apurínica/aprimidinica si el oligonucleótido contiene bases de desoxiuracilo, o por la endonucleasa V si el oligonucleótido contiene bases de desoxiinosina. La degradación también puede realizarse por incubación con RNasa H1 o RNasa H2 si el cebador incorporado contiene bases de ARN. En algunas aplicaciones, la degradación del cebador incorporada puede realizarse química o físicamente, por ejemplo, mediante la luz. Alternativamente, el saliente 3' del amplicón puede producirse mediante la digestión limitada de la exonucleasa del extremo 5' del amplicón. Dicha digestión limitada puede lograrse enzimáticamente, más concretamente, utilizando la exonucleasa T7 Gene 6 o la exonucleasa lambda 5'→3' si el oligonucleótido del cebador contiene base(s) resistente(s) a la nucleasa en el extremo 3', concretamente, una(s) base(s) con enlace fosforotioato. En este caso, la reacción de la exonucleasa se detiene en la base modificada y produce un saliente 3'.

Procedimiento - Pasos

Las tres primeras incubaciones del procedimiento son pasos de preligadura, e incluyen (i) la desfosforilación, (ii) el pulido y (iii) la adenilación opcional. Las 2 incubaciones restantes del procedimiento incluyen (1) la ligadura del adaptador 3', y (2) la ligadura del adaptador 5', que comprende (a) la fusión del adaptador 5', (b) la eliminación de la base 5' de la molécula de sustrato y (c) la ligadura del adaptador 5' (véanse las Figuras 4-6). En este aspecto, el procedimiento tiene hasta 3 pasos de preligadura y 2 pasos de ligadura. En otro aspecto, el procedimiento tiene un único paso de ligadura del adaptador 5' si la molécula de sustrato comprende un saliente 3' preexistente, que preferentemente sirve de adaptador 3' (véase la Figura 7a).

Dentro de la reacción de amplificación, el número de ciclos multiplexados se limita a un mínimo de 2 o puede realizarse como 3 ciclos, 4 ciclos, 5 ciclos o más, hasta N ciclos antes de cambiar a la amplificación de cebador único de adaptador universal no multiplexado. El número de ciclos universales puede variar desde 1 ciclo hasta 40 o más ciclos, dependiendo de la entrada de ADN y del rendimiento deseado de la biblioteca. Tras la amplificación por PCR multiplexada, se realiza un paso de purificación y, a continuación, se lleva a cabo el paso de ligadura simultánea de adaptadores.

Pasos previos a la ligadura:

(i) Desfosforilación

Antes de la ligadura del adaptador, los extremos del ADN son opcionalmente procesados para mejorar la eficiencia de la reacción de ligadura del adaptador. El procesamiento de los extremos del ADN en los procedimientos existentes suele utilizar dos reacciones enzimáticas: (a) incubación con una(s) polimerasa(s) de ADN con verificación de prueba para pulir los extremos del ADN eliminando los salientes 3' y rellenando los extremos 3' empotrados y (b) incubación con una polinucleótido quinasa para añadir un grupo fosfato a los extremos 5'. Cuando se procesan los extremos del ADN, algunos procedimientos también adenilan el ADN con extremo romo en el extremo 3' mediante la incubación del ADN pulido con una ADN polimerasa sin verificación de prueba. La adenilación ayuda a evitar la autoligadura del ADN y la formación de productos quiméricos. También minimiza la formación de adaptadores-dímeros debido a la presencia de dT en el extremo 3' de los adaptadores correspondientes. La divulgación actual aborda estas cuestiones de una manera completamente diferente. En lugar de añadir un grupo fosfato a los extremos 5' de los fragmentos de ADN, el procedimiento de la divulgación implementa una eliminación completa opcional del grupo fosfato de los extremos 5' de los fragmentos de ADN. La desfosforilación de los extremos del ADN se consigue mediante la incubación de fragmentos de ADN con una enzima capaz de eliminar un fosfato de un extremo del ADN. Los ejemplos de enzimas útiles en los procedimientos de la divulgación para eliminar un fosfato 5' o un fosfato 3' incluyen, pero no se limitan a, cualquier enzima fosfatasa, tal como la fosfatasa alcalina intestinal de ternera, la fosfatasa alcalina bacteriana, la fosfatasa alcalina de camarón, la fosfatasa Antartic y la fosfatasa alcalina placentaria, cada una de ellas utilizada de acuerdo con las condiciones estándar.

(ii) Pulido

Tras la eliminación de la fosfatasa alcalina o su inactivación por calor, las moléculas de sustrato de ADN se someten opcionalmente a incubación con una ADN polimerasa con verificación de prueba en presencia de los dNTP para crear extremos romos. Las reacciones se realizan de acuerdo con las condiciones estándar. Los fragmentos de ADN desfosforilados y pulidos son buenos sustratos para la fijación del adaptador 3', pero son malos sustratos para la ligadura de fragmentos de ADN concatámero y la formación de quimeras. También son sustratos pobres para la ligadura de un adaptador convencional.

En algunas aplicaciones de la presente divulgación, puede omitirse la desfosforilación del extremo 5' mediante una enzima fosfatasa, pero en este caso es preferible la adición de una enzima tal como la T4 polinucleótido quinasa a la mezcla de pulido del ADN para asegurar la eliminación del grupo fosfato de los extremos 3' antes del pulido del ADN. Alternativamente, las dos primeras reacciones de preligadura descritas anteriormente, la desfosforilación y el pulido,

pueden ejecutarse en cualquier orden y dar como resultado un ADN de cadena doble con extremos romos que carecen de grupos fosfato 5' en sus extremos.

(iii) Adenilación

La presente divulgación también contempla el uso de la adenilación del extremo 3' de los fragmentos de ADN de extremo romo utilizando polimerasas de ADN con actividad de polimerasa no de placa, incluyendo, pero no limitándose a la (exo) fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I, y la ADN polimerasa *Taq*. Tanto el tratamiento con fosfatasa alcalina como la adenilación reducen la propensión a la autoligadura de fragmentos de ADN y la formación de moléculas quiméricas de la biblioteca. En el caso de incluir un paso de adenilación, el adaptador 3' utilizado en el paso posterior requeriría un único saliente T.

Pasos de ligadura:

(1) Ligadura del adaptador 3', o, generación de un saliente 3' de cadena única en sustratos de ADN

Las opciones se representan en la Figura 7

Opción 1a: oligonucleótido 2 bloqueado en 3' como parte de un adaptador 3' de doble cadena (Figura 7a)

Los protocolos existentes de preparación de bibliotecas NGS se basan en la ligadura entre el grupo 3'OH del adaptador y el grupo fosfato 5' en los extremos de los fragmentos de ADN. Por esta razón, los adaptadores utilizados en los procedimientos convencionales suelen tener un extremo funcional de cadena doble con un grupo hidroxilo 3' y un grupo fosfato 5' opcional (véanse las Figuras 1 y 2). Por el contrario, la presente divulgación utiliza una reacción de ligadura entre el grupo fosfato 5' del adaptador 3' y el grupo 3'OH de los fragmentos de ADN, dejando una muesca entre el extremo 3' del adaptador 3' y el extremo 5' de los fragmentos de ADN (véase la Figura 3). El adaptador 3' tiene un extremo funcional de doble cadena con un grupo fosfato 5'y, en esta opción, un nucleótido 3' que no es competente para la ligadura (por ejemplo, compuesto por un análogo de base modificado con azúcar, como una base dideoxi 2',3' o una base deoxi 3'). El adaptador 3' está formado por la fusión de dos oligonucleótidos: el oligonucleótido 1 que tiene un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo bloqueador (tal como un espaciador C3) en el extremo 3', y el oligonucleótido 2 que carece de grupo fosfato en el extremo 5' y comprende una base no ligable en el extremo 3'. El oligonucleótido 2 comprende además bases modificadas y/o enlaces que pueden ser destruidos enzimática, química o físicamente. En la mayoría de las aplicaciones, el extremo del adaptador 3' que participa en la ligadura con la molécula de sustrato es un extremo romo. En las aplicaciones que implican la adenilación de fragmentos de ADN, el extremo ligable del adaptador 3' tiene un saliente 3' que contiene una base de dideoximidina 2',3' o desoximidina 3' (u otras modificaciones de la base de timina que bloquean su capacidad de formar un enlace covalente con la base adyacente). En otras aplicaciones, el extremo funcional del adaptador 3' podría tener un saliente 3' o 5' que contenga múltiples bases. Durante la incubación con una ADN ligasa, el fosfato 5' del adaptador 3' se liga al extremo 3' de las moléculas de sustrato de ADN, dejando una muesca entre el extremo 3' del adaptador 3' y el extremo 5' de las moléculas de sustrato de ADN. Una vez finalizada la reacción, el ADN ligado se somete a una purificación mediante columna de centrifugado o purificación con base en perlas SPRI para eliminar el exceso de adaptadores y otros componentes de la reacción de ligadura.

Opción 1b: el oligonucleótido 2 hidroxilo 3' como parte de un adaptador 3' de doble cadena (Figura 7a)

En un procedimiento alternativo, se puede utilizar un adaptador 3' que carece de una base bloqueada e inligable en el extremo 3' del oligonucleótido 2. La ligadura de un oligonucleótido 2 no bloqueado a la molécula de sustrato seguirá siendo impedida por la falta de fosfato 5' en la molécula de sustrato como resultado de la reacción de desfosforilación. La ventaja de utilizar un oligonucleótido 2 no bloqueado es que el extremo 3' del oligonucleótido 2 puede extenderse en una sola base utilizando una mezcla de dideoxi-nucleótidos y una ADN polimerasa capaz de sintetizar ADN de traducción por muesca. Esto permite un procedimiento alternativo para realizar la escisión de la base 5' de la molécula de sustrato, véanse los pasos posteriores descritos a continuación. La desventaja de utilizar un adaptador 3' no bloqueado es la creación de adaptadores-dímeros durante la reacción de ligadura, lo que reduce la concentración del adaptador y, como resultado, puede disminuir la eficiencia de la ligadura del adaptador. También para esta opción, el oligonucleótido 2 comprende adicionalmente bases y/o enlaces modificados que pueden ser destruidos enzimática, química o físicamente.

Opción 2: Adaptador 3' de una sola cadena (Figura 7a)

En presencia de una ligasa (ADN o ARN) capaz de unir covalentemente un adaptador de cadena única a una molécula de sustrato de cadena doble (o de cadena única), el oligonucleótido 2 puede ser omitido de la reacción.

Opción 3: Adaptador 3' homopolímero (Figura 7a)

En presencia de una polimerasa independiente de la plantilla, tal como la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), la poli(A) polimerasa, la poli(U) polimerasa o las ADN polimerasas que carecen de la actividad de verificación de

prueba de la exonucleasa 3' y que comprenden un nucleótido, se puede incorporar un homopolímero u otra cola en el extremo 3' de las moléculas de sustrato que puede servir como secuencia 3' adaptadora.

Opción 4: Cola controlada y ligadura simultánea del adaptador 3' (Figura 7a)

En presencia de una polimerasa independiente de la plantilla, tal como TdT, nucleótidos, y comprendiendo adicionalmente una ligasa y una molécula atenuadora-adaptadora, se puede incorporar una cola sintética y una secuencia adaptadora 3' definida en los extremos 3' de las moléculas de sustrato. Véase el documento WO 2013/138536, presentado el 13 de marzo de 2013.

Opción 5: Omitir el paso de ligadura del adaptador 3' (Figura 7b)

En el caso de las moléculas de sustrato que comprenden un saliente 3' preexistente que se produce naturalmente o que resulta de un tratamiento enzimático u otro, ya sea como una secuencia definida o aleatoria, no se requiere un paso de ligadura de adaptador 3' separado y puede omitirse, en el que el saliente 3' preexistente puede servir como adaptador 3'.

En una realización alternativa, una enzima fosfatasa con Zinc y otros componentes de la reacción pueden ser añadidos a la reacción de ligadura del adaptador 3' en su finalización. La realización de una reacción de fosfatasa después de la ligadura del adaptador 3' es un medio para hacer que cualquier molécula de adaptador 3' no ligada sea incapaz de realizar la ligadura posterior, lo que impide la formación de dímeros de adaptador en los pasos posteriores cuando el adaptador 5' está presente.

(2) Ligadura del adaptador 5', que consta de tres pasos que se producen en una sola incubación

(I) Fusión del adaptador 5'

En el caso de ligadura de adaptador 3' de cadena única (opción 2), adición de homopolímero (opción 3) o uso de un saliente 3' preexistente como adaptador 3' (opción 5), la fusión del adaptador 5' puede realizarse directamente sin otra consideración ya que no hay oligonucleótido 2 que degradar o desplazar.

Cuando se utiliza la ligadura de un adaptador 3' de cadena doble para crear un saliente 3' de cadena única en los extremos del ADN de doble cadena (opciones 1a, 1b y 4 anteriores), el adaptador 5' puede ser fusionado al adaptador 3' utilizando cualquiera de las cinco opciones diferentes, cada una de las cuales se discute a continuación y se representa en la Figura 8:

- i) tras la degradación del oligonucleótido 2 que se ha fusionado al adaptador 3'
- ii) por desplazamiento competitivo del oligonucleótido 2 que fue fusionado al adaptador 3'
- iii) fusionado el adaptador 5' aún más 3' en el oligonucleótido 1 en relación con el sitio de fusión del oligonucleótido 2, seguido de la traducción por muesca y la degradación del oligonucleótido 2
- iv) haciendo que el adaptador 5' se prefusione a la región 3' del oligonucleótido 1 del adaptador 3', seguido de la traducción por muesca y la degradación del oligonucleótido 2
- v) haciendo que el adaptador 5' con un grupo de bloqueo 3' se prefusione a la región 5' del oligonucleótido 1 del adaptador 3' (en lugar del oligonucleótido 2), seguido de la escisión enzimática del grupo de bloqueo 3'

Opción i:

El oligonucleótido 2 del adaptador 3' comprende además bases modificadas y/o enlaces que pueden ser destruidos enzimática, química o físicamente. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las bases dU, la desoxiinosina y las bases de ARN. La fusión del adaptador 5' de cadena única a la porción 5' del oligonucleótido 1 del adaptador 3' se produce como resultado de la degradación parcial del adaptador 3', específicamente, del oligonucleótido 2. En algunas realizaciones, la degradación del oligonucleótido 2 se logra enzimáticamente, más específicamente, mediante el uso de uracilo-ADN glicosilasa (UDG), o una combinación de UDG y endonucleasa apurínica/aprimidínica si el segundo oligonucleótido contiene bases de desoxiuracilo, o mediante la endonucleasa V si el segundo oligonucleótido contiene bases de desoxiinosina. La degradación del oligonucleótido 2 también puede realizarse por incubación con RNasa H1 o RNasa H2 si el segundo oligonucleótido contiene bases de ARN. En algunas aplicaciones, la degradación del segundo oligonucleótido puede hacerse química o físicamente, por ejemplo, mediante la luz.

Opción ii:

En algunas aplicaciones, la fusión del adaptador 5' al oligonucleótido 1 del adaptador 3' ocurre sin degradación del oligonucleótido 2. En este caso, la sustitución del oligonucleótido 2 por el adaptador 5' de cadena única puede verse facilitada por una mayor afinidad del adaptador 5' sobre el del oligonucleótido 2, ya sea debido a una mayor complementariedad entre el oligonucleótido 1 y la secuencia del adaptador 5' o debido a modificaciones de las bases dentro del adaptador 5' que aumentan su temperatura de fusión (por ejemplo, las bases LNA). Dependiendo del diseño del adaptador 5', la fusión del oligonucleótido 1 del adaptador 3' podría dar lugar a una muesca o brecha entre el

extremo de 3' del adaptador 5' y el extremo de 5' de la molécula de sustrato de ADN, o a una superposición de las bases 3' y 5' del adaptador 5' y de la molécula de sustrato de ADN, respectivamente.

Opción iii:

En este caso, no se utilizan modificaciones degradables ni desplazamiento competitivo del oligonucleótido 2. En su lugar, el adaptador 5' sustituye al oligonucleótido 2 mediante la fusión del adaptador 3' más allá de 3' en el oligonucleótido 1 en relación con el sitio de fusión del oligonucleótido 2, seguido de una traducción por muesca limitada "masticando hacia adelante" que resulta en la degradación o la degradación parcial del oligonucleótido 2.

Opciones iv y v:

En estos casos, el adaptador 5' constituye una parte del adaptador 3' y está presente durante la ligadura del adaptador 3' al sustrato de ADN. En la opción iv, el adaptador 5' se prefusiona con el adaptador 3' en el oligonucleótido 1 en relación con el sitio de fusión del oligonucleótido 2 (similar a la opción iii). En la opción v, el adaptador 5' tiene un grupo bloqueador en el extremo 3' y se prefusiona el adaptador 3' en lugar del oligonucleótido 2. Tras la ligadura del adaptador 3', el grupo de bloqueo en el extremo 3' del adaptador 5' se elimina enzimáticamente para permitir su extensión por una ADN polimerasa.

(II) Eliminación de la base 5' de la molécula de sustrato que da lugar a la exposición de un fosfato 5'

En este paso, la creación de un grupo fosfato terminal 5' compatible con la ligadura en la molécula de sustrato se logra mediante la eliminación de la base terminal 5' dañada de las moléculas de sustrato de ADN, ya sea por traducción por muesca del oligonucleótido adaptador 5' utilizando una ADN polimerasa y nucleótidos (opción i) mediante una reacción de desplazamiento y eliminación utilizando el adaptador 5' y una endonucleasa 5' en ausencia de nucleótidos (opción ii), o mediante la extensión de una única base dideoxi del oligonucleótido 2 seguida de escisión de desplazamiento utilizando una endonucleasa de aleta 5' en ausencia de nucleótidos (opción iii). En la tercera opción, la escisión de la base 5' de la molécula de sustrato se produce antes de la fusión del adaptador 5', porque se realiza alternativamente utilizando el oligonucleótido 2 fusionado en lugar del adaptador 5', pero se incluye en esta sección para simplificar la descripción del procedimiento (véase la Figura 9).

Opción i:

La síntesis de ADN de traducción por muesca se inicia en la muesca o brecha entre el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' y el extremo 5' de las moléculas de sustrato de ADN y se detiene cuando la reacción de ligadura sella la muesca (véanse Figuras 4 y 6a). La reacción de traducción por muesca puede ser realizada por, pero no se limita a, las ADN polimerasas tales como la ADN polimerasa I (holoenzima), la ADN polimerasa *Taq*, la ADN polimerasa *Tth* y la ADN polimerasa *Bst* (holoenzima). Las enzimas adicionales contempladas para su uso incluyen, sin limitación, polimerasas de ADN con actividad exonucleasa 5'-3', endonucleasa de aleta 5' y una combinación de una polimerasa de desplazamiento de cadena y una endonucleasa de aleta 5'.

Las condiciones de reacción contempladas para este paso incluyen aquellas en las que (i) están activas tanto una polimerasa con actividad exonucleasa 5' endógena como una ligasa; (ii) están activas una polimerasa de desplazamiento de cadena y una polimerasa endonucleasa de solapa y una ligasa; (iii) están activas una endonucleasa de aleta y una ligasa, (iv) se produce una actividad simultánea de tanto una enzima termoestable como una enzima termolábil; o (v) donde puede producirse la actividad de sólo las enzimas termoestables o sólo las termolábiles. En algunas realizaciones, las condiciones (i) y (ii) se llevan a cabo cada una con los dNTP para la traducción por muesca. En una realización específica, la *Taq* polimerasa y la *E. coli* ligasa se utilizan a una temperatura de reacción de 40 °C. Sin embargo, en diversas realizaciones se contempla un intervalo de temperaturas de reacción de 10 °C a 75 °C.

La reacción de traducción por muesca da lugar a la eliminación de una, dos o más bases del extremo 5' de las moléculas de sustrato de ADN antes de la reacción de ligadura que se produce entre el producto de extensión del adaptador 5' y la molécula de sustrato de ADN. La síntesis de traducción por muesca puede producirse en presencia de los cuatro nucleótidos dGTP, dCTP, dTTP y dATP o de sus combinaciones restringidas. Las combinaciones restringidas incluyen, entre otras, combinaciones de tres nucleótidos tales como dGTP, dCTP y dATP, o dGTP, dCTP y dTTP, o dGTP, dATP y dTTP, o dCTP, dATP y dTTP, combinación de dos nucleótidos tales como dGTP y dCTP, o dGTP y dATP, o dGTP y dTTP, o dCTP y dATP, o dCTP y dTTP, o dATP y dTTP o un solo nucleótido tal como dGTP, o dCTP, o dATP, o dTTP.

Opción ii:

La reacción de escisión de desplazamiento no requiere los dNTP pero requiere que la secuencia adaptadora 5' comprenda una, dos o más bases aleatorias en el extremo 3' para crear una superposición con la molécula de sustrato, y que comprenda una pluralidad de adaptadores 5' en la reacción (véanse Figuras 5 y 6b). La reacción de escisión de desplazamiento se inicia con la fusión de los adaptadores 5', el desplazamiento de las bases de ADN 5' de la molécula de sustrato de ADN que se superponen con las bases 3' de los adaptadores 5' y la escisión de las bases desplazadas

por una endonucleasa de aleta 5'. En algunas realizaciones, el adaptador 5' tiene una base aleatoria dN en el extremo 3'. En este caso, la superposición implica una base y sólo se eliminaría una única base 5' del extremo 5' de las moléculas de sustrato de ADN y se sustituiría por una base similar de la secuencia de adaptador 5'. La eficiencia de la reacción de desplazamiento y eliminación se incrementa al ciclar la temperatura de la reacción entre 40 °C y 65 °C para permitir que los adaptadores 5' se disocien y vuelvan a fusionarse si su base 3' terminal no coincide con la base 5' de la molécula de sustrato de ADN.

Opción iii:

Una realización alternativa a la participación del adaptador 5' en la escisión de la base 5' de las moléculas de sustrato es, en cambio, hacer que el oligonucleótido 2 del adaptador 3' participe en la escisión de la base 5' de las moléculas de sustrato (véase la Figura 9).

En una aproximación (Figura 9a y c), el oligonucleótido 2 del adaptador 3' comprende un extremo 3' extensible y en presencia de una mezcla de dideoxi-nucleótidos y una polimerasa bajo condiciones apropiadas, se produce una adición de una sola base dideoxi que conduce a una superposición de una sola base con el extremo 5' de las moléculas de sustrato, lo que induce el escisión de desplazamiento de una sola base por una endonucleasa de aleta apropiada o una polimerasa que posea actividad de endonucleasa de aleta 5'. Posteriormente, se utiliza un adaptador 5' con una base dN aleatoria en su extremo 3' (Figura 9a), donde se forma una muesca tras unirse al adaptador 3' unido al extremo del ADN de cadena doble. La muesca puede ser sellada por una ADN ligasa, lo que resulta en la unión covalente del adaptador 5' al extremo 5' de la molécula de ADN sustrato.

Alternativamente, se puede utilizar un oligonucleótido adaptador 5' que carece de una base dN aleatoria en su extremo 3' (Figura 9c), que forma una brecha de una sola base después de unirse al adaptador 3' unido al extremo de la molécula de sustrato de ADN de doble cadena. La brecha puede ser rellenada por una ADN polimerasa que carezca de actividad de desplazamiento de cadena (por ejemplo, la ADN polimerasa T7 o T4) para crear una muesca que puede ser a su vez sellada por una ADN ligasa, lo que resulta en la unión covalente del adaptador 5' al extremo 5' de la molécula de sustrato de ADN.

En otra alternativa (véanse las Figuras 9b y d), el oligonucleótido 2 que comprende un extremo 3' bloqueado se degrada parcialmente o se desplaza por un oligonucleótido cebador que se extiende con una sola dideoxibase por una polimerasa de ADN con actividad endonucleasa de aleta 5' que resulta en la escisión de una sola base del extremo 5' del ADN. A su vez, el oligonucleótido cebador se degrada o se desplaza por el adaptador 5' con una base dN aleatoria en su extremo 3' para crear una muesca que puede ser sellada por una ADN ligasa.

(III) Ligadura del adaptador 5'

La unión covalente del adaptador 5' a la molécula de sustrato implica la ligadura entre el adaptador 5' o su producto de extensión y el fosfato 5' expuesto de las moléculas de sustrato. Cuando la escisión de la(s) base(s) 5' de las moléculas de sustrato de ADN se logra mediante una reacción de traducción por muesca, la reacción de ligadura sella la muesca entre el adaptador 5' extendido por la polimerasa y el extremo 5' escindido de la molécula de sustrato de ADN. Cuando se consigue la escisión de la base 5' de las moléculas de sustrato de ADN a través de la reacción de escisión de desplazamiento, se produce la ligadura entre el oligonucleótido adaptador 5' original y el extremo 5' escindido de la molécula de sustrato de ADN. Las condiciones estándar con respecto a la reacción de ligadura en este paso comprenden, en diversas realizaciones, el uso de cualquier ADN ligasa que sea capaz de sellar muescas o brechas en el ADN. En una realización, la ligasa es la ADN ligasa de *E. coli* y la reacción se produce en el intervalo de temperatura entre 10 °C y 50 °C. En algunas realizaciones, la ligasa es una ADN ligasa termoestable tal como la *Taq* ADN ligasa, o *Ampl*Ligasa, y la reacción se produce en el intervalo de temperatura entre 30 °C y 75 °C.

En diversos aspectos de la presente divulgación, los tres pasos (I), (II) y (III) del paso de ligadura del adaptador 5' se realizan simultáneamente en una sola incubación mezclando e incubando el ADN de sustrato adaptado 3'-con (i) una endonucleasa de degradación opcional (por ejemplo, UDG, endonucleasa V, RNasa H, o su combinación); (ii) una ADN polimerasa de traducción por muesca o una endonucleasa de 5'; y (iii) una ADN ligasa (véase la Figura 6). La incubación se lleva a cabo a una temperatura constante o utilizando condiciones de ciclado de temperatura en el intervalo de 10 °C - 75 °C. En otras aplicaciones, la degradación parcial del adaptador 3' se realiza por separado de las reacciones posteriores.

Construcción de bibliotecas NGS

La síntesis de una biblioteca NGS de Illumina puede realizarse utilizando los procedimientos divulgados. Como se muestra en la Figura 10, una biblioteca de Illumina puede construirse utilizando el procedimiento de ligadura de traducción por muesca (lado izquierdo) o el procedimiento de ligadura por desplazamiento (lado derecho). El orden de fijación de los dos adaptadores de Illumina es flexible, donde en la Figura 10a, el adaptador de Illumina P7 es un adaptador 3' y el adaptador de Illumina P5 es un adaptador 5', mientras que en la Figura 10b, el adaptador de Illumina P5 es un adaptador 3' y el adaptador de Illumina P7 es un adaptador 5'. Las bibliotecas representadas en la Figura 10 pueden construirse sin PCR o pueden amplificarse por PCR, dependiendo de la cantidad de ADN de sustrato de

entrada. Alternativamente, la síntesis de bibliotecas NGS de Illumina puede realizarse utilizando los procedimientos divulgados en los que se requiere la amplificación por PCR, ya que el procedimiento utiliza secuencias de adaptador truncadas (véase la Figura 11). En este caso, se introduce P5 o P7 como adaptador truncado (sólo se muestra P7), y tras la amplificación utilizando un cebador de PCR que introduce la secuencia de adaptador de longitud completa, así como comprende bases degradables en su extremo 5', tras la degradación de las porciones 5' de los amplicones resultantes, se puede introducir P7 o P5 mediante fusión y ligadura. Si alternativamente se utiliza un cebador degradable truncado para la amplificación por PCR, se puede realizar una ligadura puente del resto del adaptador para completar la secuencia de longitud completa.

Los procedimientos divulgados pueden utilizarse para construir bibliotecas NGS para una variedad de plataformas de secuenciación, y otro ejemplo se presenta en las Figuras 12 y 13 donde se representa la construcción de bibliotecas Ion Torrent. Como se muestra en la Figura 12, al introducir una duplicación parcial de la secuencia del adaptador A en el adaptador P1 en el sitio de unión del inserto, se puede producir la posterior fusión de un adaptador 5' después de la ligadura del adaptador 3'. El orden de ligadura es flexible, donde el adaptador P1 con una duplicación parcial del adaptador A puede ser introducido como adaptador 3' seguido de la ligadura del adaptador A como adaptador 5' utilizando la traducción por muesca o la escisión por desplazamiento (Figura 12a). Alternativamente, el adaptador A puede ser introducido como un adaptador 3' y el adaptador P1 con una duplicación parcial del adaptador A puede ser un adaptador 5' (Figura 12b). Dado que la secuenciación Ion Torrent se realiza como una sola lectura del adaptador A, debido a la longitud de la duplicación parcial del adaptador A en el adaptador P1, no interferirá con la fusión del cebador de secuenciación u otras funciones del adaptador.

Alternativamente, en la Figura 13, el código de barras combinatorio puede introducirse en las bibliotecas Ion Torrent utilizando el procedimiento divulgado. Durante el paso de ligadura del adaptador 3', se introduce la primera porción del código de barras combinatorio dual, adyacente a una región enlazadora L que es común a los 20 códigos de barras. Tras la degradación de la cadena 3' bloqueada que no se liga al sustrato de ADN, un adaptador 5' se fusiona a la región enlazadora común L, que incorpora la segunda porción del código de barras dual 5' adyacente a la región enlazadora L. Tras la ligadura de traducción por muesca, la biblioteca resultante puede amplificarse con cebadores PCR estándar de Ion Torrent, y cuando las moléculas de la biblioteca se secuencian desde el lado del adaptador A, la identificación de la muestra de cada esfera Ion se leerá al principio de la lectura, donde se pueden conseguir 96 combinaciones posibles.

Aplicaciones para bibliotecas NGS seleccionadas como objetivo

Los procedimientos divulgados pueden utilizarse para construir bibliotecas NGS en las que se pueden seleccionar y enriquecer objetivos específicos, como forma de reducir la complejidad y los requisitos de secuenciación en relación con la secuenciación del genoma completo. Un ejemplo de esta aplicación sería la unión del adaptador 3' y el adaptador 5' a sustratos de ADN fragmentados al azar, desnaturalizados y con cebador extendido, en los que el cebador o la pluralidad de cebadores fusiona las regiones de ADN objetivo conocidas. En este caso, sólo los loci seleccionados comprenderían una terminación de cadena doble, mientras que los loci no seleccionados permanecerían de una sola cadena y no se produciría la ligadura del adaptador en sus terminaciones.

En otras aplicaciones, el adaptador 5' de la presente divulgación puede utilizarse para seleccionar y enriquecer una pequeña fracción de fragmentos de ADN con secuencias terminales conocidas. Las secuencias de ADN preseleccionadas pueden contener una, dos, tres o más bases terminales de ADN. Para lograr dicha selección, la secuencia de adaptador 5' debe contener bases de invasión seleccionadas o combinaciones de bases en el extremo 3'. Como resultado, sólo los fragmentos de ADN con secuencias terminales seleccionadas se ligarán al adaptador 5' y se amplificarán. Como se muestra en la Figura 14, el uso de adaptadores 5' con extremos 3' complementarios a las secuencias terminales de los fragmentos de restricción seleccionados puede utilizarse para seleccionar los objetivos de los fragmentos de restricción a partir de una pluralidad de fragmentos de restricción. En otra realización, el uso de adaptadores 5' con extremos 3' que comprenden dinucleótidos CpG enriquecería los fragmentos que se originan en las islas CpG.

Alternativamente, la selección del objetivo se puede realizar después de la construcción de la biblioteca utilizando los procedimientos divulgados en el interior (véase la Figura 15). Si se construye una biblioteca de este tipo en la que un adaptador comprende bases degradables en su extremo 5', tras la extensión del cebador específico-objetivo y la digestión parcial de la porción degradable del adaptador, se puede fusionar un adaptador 5' biotinilado al saliente 3' resultante y utilizando la ligadura de traducción por muesca (Figura 15a) o la ligadura de escisión por desplazamiento (Figura 15b), el adaptador 5' biotinilado se une covalentemente sólo a los sustratos de ADN objetivo y puede ser capturado posteriormente utilizando perlas magnéticas de estreptavidina y luego amplificado por PCR para generar suficiente material para la secuenciación.

Diseños y aplicaciones de adaptadores alternativos

También se presentan diversos diseños alternativos de adaptadores y procedimientos de ligadura que utilizan los procedimientos divulgados. En la Figura 16, se construye una biblioteca utilizando una única secuencia de adaptador en lugar de un par de secuencias de adaptador. En este ejemplo, se utilizan los mismos pasos para el procesamiento

del sustrato antes de la ligadura y tanto la ligadura del adaptador 3' como la ligadura de traducción por muesca o la ligadura de escisión por desplazamiento del adaptador 5', y la biblioteca resultante puede amplificarse por PCR utilizando un único cebador.

En la Figura 17, se presenta un procedimiento para la ligadura de adaptadores de hebra de oligonucleótidos simples, en el que el extremo 5' del adaptador de hebra se utiliza para realizar la ligadura del adaptador 3' a la molécula de sustrato, y después de la degradación del extremo 3' bloqueado del adaptador de hebra, el extremo 3' truncado del adaptador de hebra se utiliza para la ligadura de traducción por muesca al fosfato 5' expuesto de la molécula de sustrato.

A veces es útil generar bibliotecas de ADN circular, tal como una estructura intermedia para la construcción de bibliotecas NGS de parejas-pares. Como se muestra en la Figura 18, dicha biblioteca puede construirse utilizando los procedimientos de la divulgación. En el primer paso, se realiza la ligadura del adaptador 3' utilizando adaptadores X y X' mutuamente complementarios. Tras la degradación de la cadena no ligada, puede producirse una circularización no covalente del ADN mediante la complementariedad de los salientes 3' X y X' en cada molécula de sustrato. Para favorecer la fusión unimolecular y reducir la formación de concatámeros, esta reacción de fusión se realiza a una concentración de ADN adecuadamente baja. Tras la fusión del saliente 3', se puede realizar la ligadura de traducción por muesca.

Enzimas

Las ligasas que pueden utilizarse de acuerdo con las condiciones de reacción estándar para practicar los procedimientos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, la ADN ligasa T4, la ARN ligasa T4, la ADN ligasa T3 o la ADN ligasa T7, la ADN ligasa *Taq*, la Ampligasa, la ADN ligasa de *E. coli* y la ARN ligasa de *E. coli*. La divulgación contempla, en diversas realizaciones, condiciones de reacción apropiadas para una ligadura de extremo romo o de extremo cohesivo ("pegajoso"). El extremo cohesivo, en algunas realizaciones, comprende un saliente 5' o un saliente 3'.

Los ejemplos de enzimas útiles en los procedimientos de la divulgación para eliminar un fosfato 5' o un fosfato 3' incluyen, pero no se limitan a, cualquier enzima fosfatasa, tal como la fosfatasa alcalina intestinal de ternera, la fosfatasa alcalina bacteriana, la fosfatasa alcalina de camarón, la fosfatasa Antartic y la fosfatasa alcalina placentaria, cada una de ellas utilizada según condiciones estándar. Además, la actividad fosfatasa de la polinucleótido quinasa T4 puede utilizarse para eliminar los grupos fosfato 3'.

Las enzimas polimerasas útiles en la práctica de la divulgación incluyen pero no se limitan a una ADN polimerasa (que puede incluir una ADN polimerasa termoestable, por ejemplo, una ADN polimerasa *Taq*), ARN polimerasa, ADN polimerasa I y transcriptasa inversa. Los ejemplos no limitantes de enzimas que se pueden usar para poner en práctica la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, KAPA HiFi y KAPA HiFi Uracil+, VeraSeq Ultra DNA Polymerase, VeraSeq 2.0 High Fidelity DNA Polymerase, Takara PrimeSTAR DNA Polymerase, Agilent Pfu Turbo CX Polymerase, Phusion U DNA Polymerase, Deep VentR™ DNA Polymerase, LongAmp™ *Taq* ADN polimerasa, Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, Kapa High-Fidelity DNA Polymerase, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, Platinum Pfx High-Fidelity Polymerase, Pfu High-Fidelity DNA Polymerase, Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polymerase, KOD High-Fidelity DNA Polymerase, iProof High-Fidelity Polymerase, High-Fidelity 2 DNA Polymerase, Velocity High-Fidelity DNA Polymerase, ProofStart High-Fidelity DNA Polymerase, Tigo High-Fidelity DNA Polymerase, Accuzyme High-Fidelity DNA Polymerase, VentR® DNA Polymerase, DyNAzyme™ II Hot Start DNA Polymerase, Phire™ Hot Start DNA Polymerase, Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, Crimson LongAmp™ *Taq* ADN polimerasa, DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase, LongAmp™ *Taq* ADN polimerasa, Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, *Taq* ADN polimerasa con Standard *Taq* (Mg-free) Buffer, *Taq* ADN polimerasa con Standard *Taq* Buffer, *Taq* ADN polimerasa con ThermoPol II (Mg-free) Buffer, *Taq* ADN polimerasa con ThermoPol Buffer, Crimson *Taq*™ DNA Polymerase, Crimson *Taq*™ DNA Polymerase con (libre de Mg) Buffer, Phire™ Hot Start DNA Polymerase, VentR® (exo-) DNA Polymerase, Hemo KlenTaq™, Deep VentR™ (exo-) DNA Polymerase, Deep VentR™ DNA Polymerase, DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase, Hemo KlenTaq™, LongAmp™ *Taq* ADN polimerasa, ProtoScript® AMV First Strand cDNA Synthesis Kit, ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit, Bst DNA Polymerase, Full Length, Bst DNA Polymerase, Large Fragment, 9°Nm DNA Polymerase, DyNAzyme™ II Hot Start DNA Polymerase, Hemo KlenTaq™, Sulfolobus ADN polimerasa IV, Terminator™ y DNA Polymerase, Terminator™ DNA Polymerase, Terminator™ II DNA Polymerase, Terminator™ III DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase, Large Fragment, ADN polimerasa I (*E. coli*), ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow), Klenow Fragment (3'→75' exo—), phi29 DNA Polymerase, T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase (sin modificar), Terminal Transferase, Reverse Transcriptases y RNA Polymerases, *E. coli* Poly(A) Polymerase, AMV Reverse Transcriptase, M-MuLV Reverse Transcriptase, phi6 RNA Polymerase (RdRP), Poly(U) Polymerase, SP6 RNA Polymerase, y T7 RNA Polymerase.

Las enzimas que poseen actividad de endonucleasa de solapa que son útiles en la divulgación incluyen, pero no se limitan a la endonucleasa de solapa 1 (FEN1), la exonucleasa T5, la *Taq* ADN polimerasa, la Bst polimerasa, la Tth polimerasa, la ADN polimerasa I y sus derivados.

EJEMPLOS**Ejemplo 1****5 Comparación de la ligadura del adaptador convencional con la ligadura del adaptador 3' con oligonucleótidos marcados con FAM**

Justificación: Utilizando un sistema de oligonucleótidos marcados con FAM, se probó la ligadura roma utilizando adaptadores de relleno (Figura 2A) o adaptadores 3' (Figura 3) en diferentes relaciones molares de sustrato a adaptador para examinar el efecto sobre la eficiencia de la ligadura y la formación de quimeras.

Materiales:

- El adaptador de relleno contiene los oligonucleótidos 12-900 y 13-426 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 1^{er} oligonucleótido 13-340 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 2^{da} opción de oligonucleótido 1 (con una base de desoximidina de bloqueo en el extremo 3') 13-559 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 2^{da} opción de oligonucleótido 2 (un grupo fosfato en el extremo 3') 13-558 (Tabla 1)
- Sustrato A de FAM compuesto por los oligonucleótidos 13-562 y 13-563, donde el grupo FAM marca la ligadura al fosfato 5' del sustrato (Tabla 1)
- Sustrato B de FAM compuesto por los oligonucleótidos 13-561 y 13-564, donde el grupo FAM marca la ligadura al OH 3' del sustrato y donde el correspondiente extremo 5' del sustrato tiene un fosfato (Tabla 1)
- Sustrato de FAM C compuesto por los oligonucleótidos 13-560 y 13-564, donde el grupo FAM marca la ligadura al OH 3' del sustrato y donde el correspondiente extremo 5' del sustrato carece de fosfato (Tabla 1)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, Cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, Cat# B6030)

Procedimiento:

Las reacciones de ligadura de adaptador convencional se ensamblaron en un volumen total de 10µl, que comprendía 1x Tampón de T4 ADN Ligasa, 10 pmoles de sustrato A de FAM, 20 o 200 pmoles de adaptador de relleno, 600 unidades de T4 ADN Ligasa (rápida) o ninguna ligasa.

Las reacciones de ligadura del adaptador 3' se ensamblaron en un volumen total de 10µl, conteniendo 1x tampón de T4 ADN Ligasa, 10 pmoles de sustrato de FAM B o 10 pmoles de sustrato de FAM C, 20 o 200 pmoles de la opción 1 del Adaptador 3' o 20 o 200 pmoles de la opción 2 del Adaptador 3' y 600 unidades de T4 ADN Ligasa (rápida) o ninguna T4 ADN Ligasa.

Todas las reacciones de ligadura se realizaron a 25 °C durante 30 minutos. El volumen total de la reacción de ligadura (10µl) se mezcló con 10µl de tampón de carga de formamida 2x (97 % de formamida, 10mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrió en un gel de poliacrilamida prefabricado al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C, se visualizó en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografió con una cámara digital. Posteriormente se tiñó el gel con la tinción de ácido nucleico SYBR® Gold (Invitrogen, Cat# S11494) (no se muestra).

Resultados:

El sustrato A de FAM se convirtió en el producto de ligadura en presencia del adaptador de relleno y la T4 ADN ligasa (Fig.19, carriles 1 -2). Esta ligadura de adaptador convencional mostró cierta formación de quimeras de sustrato A de FAM cuando se utilizó una proporción de sólo 2:1 adaptador: subestado (Fig.19, carril 1) en comparación con una proporción de 20:1 (carril 2). No se observó ningún producto de ligadura en ausencia de T4 ADN ligasa (Fig.19, carril 3).

Se probaron diferentes escenarios de ligadura del adaptador 3' en los carriles 4 a 12 (Fig.19). Los carriles 4 y 5 muestran las reacciones de ligadura entre el sustrato B de FAM y el Adaptador 3' opción 1. A una proporción de adaptador: subestado de 2:1 (carril 4) o 20:1 (carril 5), se formaron productos quiméricos de mayor peso molecular que pueden implicar o no al Adaptador 3'. Sin embargo, el producto de ligadura fue más abundante y su formación se vio favorecida en una relación de 20:1 adaptador: subestado (carril 5). Los carriles 6 y 7 muestran las reacciones de

ligadura entre el sustrato C de FAM y la opción 1 del adaptador 3'. La reacción se favoreció en una proporción de 20:1 adaptador: subestado (carril 7) y no se observaron productos quiméricos. Los carriles 8 y 9 muestran las reacciones de ligadura entre el sustrato B de FAM y el Adaptador 3' opción 2. No se observó ningún producto de ligadura, pero sí se detectaron productos quiméricos. Los carriles 10 y 11 muestran las reacciones de ligadura entre el sustrato C de FAM y la opción 2 del adaptador 3'. No se observó ningún producto de ligadura. No se observó ningún producto de ligadura en ausencia de T4 ADN ligasa (carril 12).

Conclusión:

La ligadura convencional de adaptadores requería un fosfato 5' en el sustrato de FAM que conducía a la formación de quimeras si los adaptadores de relleno no estaban en exceso. La ligadura del Adaptador 3' fue más eficiente y con menos quimeras cuando el sustrato de FAM tenía un grupo hidroxilo 5' y el Adaptador 3' tenía una base bloqueante de 3-deoxitimidina (opción 1) que impedía la ligadura entre moléculas de adaptador y favorecía la ligadura entre sustrato y adaptador. En ambos casos, la proporción de adaptador: subestado de 20:1 fue favorecida para la formación del producto de ligadura.

Ejemplo 2

Comparación de la ligadura de adaptadores convencionales con la ligadura de adaptadores 3' con ADN genómico cizallado y seleccionado por tamaño

Razonamiento

Este experimento se llevó a cabo para probar el efecto del pulido del ADN genómico cizallado físicamente sobre la eficiencia de la ligadura convencional o del adaptador 3'

Materiales:

- El adaptador de relleno contiene los oligonucleótidos 13-489 y 13-426 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 1er oligonucleótido 13-340 (Tabla 1) y 2do oligonucleótido opción 1 (que contiene una base de desoximidina 3' bloqueante en el extremo 3') 13-559 (Tabla 1)
- NEBuffer 2 (New England Biolabs, cat#B7002S)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Adenosina 5'-Trifosfato (ATP) (New England Biolabs, cat# P0756S)
- ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) (New England Biolabs, cat# M0210S)
- T4 ADN polimerasa (New England Biolabs, cat# M0203 S)
- T4 Polinucleótido Quinasa (New England Biolabs, cat# M0201S)
- Exonucleasa III (E. coli) (New England Biolabs, cat# M0293S)
- Fosfatasa Antartic (New England Biolabs, cat# M0289S)
- Tampón de reacción de Fosfatasa Antartic (New England Biolabs, cat# B0289S)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Cadena ATCC 11303 de ADN genómico de E. coli (Affymetrix, cat# 14380)
- Ultrasonicador enfocado M220, (Covaris, cat# PN 500295)
- Preparación de reinata (Sage Science)
- CDF2010 2 % de agarosa, sin colorantes con estándares internos (Sage Science)

- DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo research, cat#D4004)
- Marcador de tamaño de ADN en escalera de 25 pb (Invitrogen (Life technologies), cat# 10488-022)

5 Procedimiento:

El genoma de *E. coli* (ADNg) se resuspendió en tampón de suspensión de ADN (Teknova, cat#T0227) a una concentración de 100 ng/ul. El ADN se fragmentó con el Ultrasonicador enfocado M220 hasta un tamaño medio de 150 pares de bases. Posteriormente, se aisló una distribución de tamaño ajustada del ADN fragmentado de aproximadamente 150 pb a aproximadamente 185 pb en un gel de agarosa al 2 % utilizando Preparación de reinata.

200 ng del ADN seleccionado por tamaño fueron sometidos a la actividad de diferentes enzimas. Las reacciones se montaron en un volumen total de 30 µl, con una concentración final de 1× NEBuffer 2, 100µM de cada dNTP, 3 unidades de T4 ADN polimerasa o 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) o 3 unidades de T4 ADN polimerasa y 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) o 3 unidades de T4 ADN polimerasa y 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) y 1 unidad de Exonucleasa III. Se ensambló otra reacción en un volumen total de 30 µl que comprendía una concentración final de 1× NEBuffer 2, 1mM de ATP, 10 unidades de T4 Polinucleótido Quinasa. Se ensambló otra reacción en un volumen total de 30µl que comprendía una concentración final 1× de tampón de reacción Fosfatasa Antartic y 5 unidades de Fosfatasa Antartic. Se ensambló una reacción de control con 200 ng del ADN seleccionado por tamaño con 1× NEBuffer 2. Todas las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y el ADN se purificó utilizando las columnas DNA Clean & Concentrator-5. El ADN se eludió en 30µl de tampón de suspensión de ADN y se dividió en 2 tubos de 15 µl para la posterior ligadura con adaptador convencional o ligadura con adaptador 3'. Las ligaduras de adaptadores convencionales se ensambló en un volumen total de 30 µl que comprendía 1× T4 ADN Ligasa Buffer, adaptador de relleno que contenía los oligonucleótidos 13-489 (220pmoles) y 13-426 (440pmoles), y 1.200 unidades de T4 ADN Ligasa (Rapid). Las reacciones de ligadura del adaptador 3' se ensamblaron en un volumen total de 30 µl, que contenía 1x T4 ADN Ligasa Buffer, 220 pmoles del 1^{er} oligonucleótido Adaptador 3', 440 pmoles del 2^{do} oligonucleótido Adaptador 3' y 1.200 unidades de T4 ADN Ligasa (Rapid). Todas las reacciones se purificaron utilizando columnas DNA Clean & Concentrator-5-. El ADN se resuspendió en 10 µl de tampón de suspensión de ADN y se mezcló con 10µl de tampón de carga de formamida 2× (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente se corrió en un gel de poliacrilamida al 6 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C. El gel se tiñó con tinte de gel de ácido nucleico SYBR® Gold (Invitrogen, Cat# S 11494) y se visualizó en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografió con una cámara digital.

Resultados:

Las reacciones de ligadura de adaptadores convencionales (Fig.20, panel superior) que requieren un fosfato 5' en el sustrato de ADN cizallado mostraron una menor eficiencia que la ligadura de adaptadores 3' que no lo requiere (Fig.20, panel inferior). Las reacciones de ligadura fueron más eficientes después de tratar el ADN con la T4 ADN polimerasa sola (carril 3) o en combinación con Klenow (carril 7) o Klenow más Exonucleasa III (carril 8) para ambos tipos de ligaduras. El tratamiento con Klenow, T4 Polinucleótido Quinasa o Fosfatasa Antartic en solitario (carriles 4, 5 y 6, respectivamente) sólo mejoró moderadamente la ligadura roma en comparación con el ADN no tratado (carril 2). El ADN fragmentado de distribución estrecha se cargó en el carril 9.

Conclusión:

La ligadura de adaptadores romos a ADN cizallados depende en gran medida del pulido de este ADN. Las ADN polimerasas como la T4 ADN polimerasa, que presentan una fuerte actividad exonucleasa de 5' a 3' y una actividad polimerasa de 5' a 3', son muy adecuadas para este propósito. La reacción de ligadura del adaptador convencional depende de la presencia de un fosfato 5' intacto en el extremo romo del sustrato. Sin embargo, la ligadura del adaptador 3' no lo hace, ya que la ligadura se produce en el extremo hidroxilo 3' del ADN fragmentado. Dado que los extremos 5' del ADN cizallado no son sustratos enzimáticos para la T4 ADN polimerasa, esto explica por qué el adaptador 3' se ligó con más éxito que el adaptador de relleno (carril 3). La combinación de la T4 ADN polimerasa más la Klenow y la Exonucleasa III mejoró significativamente la ligadura roma. La actividad de la Exonucleasa III produjo los extremos romos necesarios para la ligadura de los adaptadores romos mediante la eliminación de los terminales hidroxilos 3' que podrían estar dañados en el extremo 3' del ADN. La Exonucleasa III también posee una actividad fosfatasa 3', que hace que el extremo 3' sea accesible a la actividad de pulido de la ADN polimerasa.

Ejemplo 3

Optimización de la temperatura para la ligadura del adaptador 5' utilizando un sustrato de oligonucleótidos marcado con FAM

Justificación: Este experimento evaluó la dependencia de la temperatura y la composición de los dNTP en la ligadura del adaptador 5' mediada por la traducción por muesca.

Materiales:

- Oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-144) (Tabla 1)
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
- Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- ADN ligasa de *E. coli* (New England BioLabs, cat# M0205S)
- 10X Tampón de reacción de ADN ligasa de *E. coli* (New England BioLabs)
- *Taq* ADN polimerasa, concentrada 25U/ul (Genscript, cat# E00012)
- Marcador de tamaño de ADN de 25 pb (Invitrogen (Life technologies), cat# 10488-022)

Procedimiento:

Se ensambló un primer conjunto de reacciones de traducción por muesca en un volumen total de 30µl, que comprendía una concentración final de 1x Tampón de ADN ligasa de *E. coli*, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido de FAM, 45 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótido, 200 µM de dTTP o una mezcla de 200 µM de cada dATP/dTTP/dGTP o 200µM de cada dATP/dTTP/dGTP y 2,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa o ninguna *Taq* ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron a 30 °C, 40 °C o 50 °C durante 30 minutos.

Un segundo conjunto de reacciones de traducción por muesca seguido de ligaduras se ensambló en 30ul que comprendía una concentración final de 1x Tampón de ADN ligasa de *E. coli*, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótidos de FAM, 45 pmoles de oligonucleótidos de adaptador 5' para la traducción por muesca y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótidos, 200µM de cada dATP/dTTP/dGTP, y 2,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron a 50 °C, 53 °C, 56 °C o 60 °C durante 30 minutos. Se tomaron 10µl de esas reacciones para el análisis del gel. Se añadieron 10 unidades de ligasa de *E. coli* a los 20µl restantes y se incubaron a 25 °C durante 15 minutos. Se montó una reacción de control adicional en 30 ul que comprendía una concentración final de 1x Tampón de ADN ligasa de *E. coli*, y 30 pmoles de sustrato de oligonucleótidos de FAM. Se mezclaron 10µl de esas reacciones con 10µl de 2x tampón de carga de formamida (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrieron en un gel de poliácridamida prefabricado al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, cat# S 11494) en un horno a 65 °C, se visualizaron en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografiaron con una cámara digital.

Resultados:

Como se muestra en la Fig.21, panel A, la *Taq* ADN polimerasa alargó el extremo hidroxilo 3' del oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca, eliminando nucleótidos en el sustrato de oligonucleótidos de FAM mediante su actividad endonucleasa de aleta 5'. La adición de dTTP solamente (Fig. 21, carriles 2, 5, 8, panel A) permitió sólo la adición de una base en el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca, la adición de dTTP/dGTP (Fig.21, carriles 3, 6, 9, panel A) permitió la adición de tres bases y la adición de dTTP/dGTP/dATP (Fig.21, carriles 4, 7, 10, panel A) permitió la adición de cuatro bases que fue proporcional al número de bases escindidas del sustrato oligonucleótido de FAM (Fig.21, panel A). El número de bases escindidas del sustrato de oligonucleótidos de FAM también dependió de la temperatura a la que se produjeron las reacciones. A 50 °C (Fig.21, carriles 2 a 4, panel A), la cantidad de bases escindidas del sustrato de oligonucleótidos de FAM fue mayor que las escindidas a 40 °C o 30 °C. La eficiencia de la traducción por muesca y la cantidad de sustrato de oligonucleótido de FAM escindido también dependió en gran medida de la temperatura de la reacción. A 40 °C o 30 °C, la adición de dTTP solamente (Fig.21, carriles 5, 8, panel A), no permitió ninguna escisión del sustrato oligonucleótido de FAM, como se observó a 50 °C (Fig.21, carril 2, panel A). La adición de dTTP/dGTP o dTTP/dGTP/dATP permitió una cierta escisión a 40 °C (carriles 6 y 7) o 30 °C (carriles 9 y 10) con una eficacia menor que a 50 °C (carriles 3 y 4). El carril 1 (Fig.21, panel A) muestra el sustrato de oligonucleótidos de FAM en ausencia de la *Taq* ADN polimerasa.

La eficiencia de la traducción por muesca y la cantidad de sustrato de oligonucleótido de FAM escindido dependieron en gran medida de la temperatura de la reacción. A 60 °C, el sustrato de oligonucleótidos de FAM se procesó casi por completo a especies más pequeñas (Fig.21, carril 4, panel B). El tamaño del producto de escisión del oligonucleótido de FAM también disminuyó al aumentar la temperatura de la reacción (Fig.21, carriles 1 a 4, panel B). El carril 5 (Fig.21, panel B) muestra el sustrato de oligonucleótidos de FAM en ausencia de la *Taq* ADN polimerasa. Durante la

reacción de traducción por muesca, la *Taq* ADN polimerasa escinde el extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM y genera un fosfato terminal 5' que es esencial para que la ligasa de *E. coli* una covalentemente el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' al extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM. La eficacia de la ligadura también dependió de la temperatura a la que se produjo la reacción. El producto de ligadura fue más abundante a 50 °C (carril 6) y casi ausente a 60 °C (carril 9), y se generó una cantidad intermedia de producto de ligadura a 53 °C y 56 °C.

Conclusión:

Durante la traducción por muesca, el número de bases escindidas del sustrato oligonucleótido de FAM dependía de los dNTP complementarios introducidos en la reacción y de la temperatura a la que se producían las reacciones. Durante la reacción de traducción por muesca, la *Taq* ADN polimerasa escinde el extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM y genera un fosfato terminal 5' que es esencial para que la ligasa de *E. coli* ligue dos fragmentos. Los sustratos de oligonucleótidos de FAM escindidos por traducción o muesca de nudos a temperaturas más elevadas eran sustratos pobres para la ligadura por parte de la ligasa de *E. coli*, debido a la brecha potencial que se forma entre el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' y el extremo 5' del sustrato de oligonucleótidos de FAM.

Ejemplo 4

Análisis de los efectos de la composición de los dNTP en la ligadura del adaptador 5'

Justificación: Este experimento se realizó para evaluar el grado de traducción por muesca que se produce en presencia de una composición variada de dNTP y el efecto sobre la reacción de ligadura acoplada.

Materiales:

- Oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-144) (Tabla 1)
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
- Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Marcador de tamaño de ADN de 25 pb (Invitrogen (Life technologies), cat# 10488-022)
- ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# L6090L)
- 10X Tampón de ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# B6090)
- *Taq*-B ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7250L)

Procedimiento:

Las reacciones se ensamblaron en un volumen total de 30µl, comprendiendo una concentración final de 1× Tampón de ADN ligasa de *E. coli*, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido de FAM, 45 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótido, 200µM de cada 4 dNTP o una mezcla de 200µM de cada uno: dCTP, dTTP, dGTP o dATP, dTTP, dGTP o dATP, dCTP, dGTP o dATP, dTTP, dCTP o ningún dNTP, 10 unidades de ligasa de *E. coli* y 10 unidades de *Taq*-B ADN polimerasa. Todas las reacciones se incubaron a 40 °C durante 30 minutos. Se mezclaron 10 µl de esas reacciones con 10 µl de 2× tampón de carga de formamida (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C, se visualizaron en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografiaron con una cámara digital (panel inferior). Posteriormente, el gel se tiñó con tinte de gel de ácido nucleico SYBR® Gold (Invitrogen, Cat# S11494), se visualizó en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografió con una cámara digital (panel superior).

Resultados:

Los dos primeros carriles de la Fig.22 muestran el oligonucleótido de control. En ausencia de la *Taq*-B ADN polimerasa, la ligasa de *E. coli* por sí sola no puede ligar el oligonucleótido adaptador 5' al sustrato de oligonucleótidos de FAM porque el sustrato de FAM carece de una modificación de fosfato 5' (Fig.22, carril 3). En presencia de la *Taq*-B ADN polimerasa y de los 4 dNTP, el oligonucleótido adaptador 5' se extendió, formando un nuevo producto de 58 bases y el oligonucleótido sustrato de FAM fue desplazado y degradado por la actividad endonucleasa de alea 5' de la *Taq*-B ADN (Fig.22, carril 4). En presencia de la ligasa de *E. coli*, de la *Taq*-B ADN polimerasa y de

dATP/dTTP/dGTP (Fig.22, carril 7) o de dCTP/dTTP/dGTP (Fig.22, carril 6) o de dATP/dTTP/dCTP (Fig.22, carril 9), la traducción por muesca se limitó a la adición de cuatro, tres o una bases, respectivamente. Con la extensión del adaptador 5', se formó una aleta en el extremo 5' del sustrato de oligonucleótidos de FAM. Esta aleta se convierte en un sustrato para la actividad endonucleasa de aleta *Taq-B* creando un fosfato 5' necesario para la ligadura. El adaptador 5' se ligó al sustrato oligonucleótido de FAM formando un producto de 69 bases. Una aleta de tres o cuatro bases (Fig.22, carril 6 y 7) soportó la ligadura de forma más eficiente que la aleta de una base (Fig.22, carril 9). En presencia de la ligasa de *E. coli*, la *Taq-B* ADN polimerasa y el dATP/dCTP/dGTP (Fig.22, carril 8), se observó una banda débil correspondiente al producto de ligadura. Una actividad de ligadura débil puede provenir de la incorporación de una base "no coincidente" (A C o G en lugar de T), lo que lleva a la formación de la aleta en algunos sustratos de oligonucleótidos de FAM. En presencia de la ligasa de *E. coli*, la *aq-B* ADN polimerasa y sin dNTP, no se observó ningún producto de ligadura. En presencia de la ligasa de *E. coli*, la *Taq-B* ADN polimerasa y los 4 dNTP, el adaptador 5' se ligó al sustrato de oligonucleótidos de FAM formando un producto de 69 bases (Fig.22, carril 5). Dado que el adaptador 5' y la plantilla de oligonucleótidos estaban en exceso en comparación con el sustrato de oligonucleótidos de FAM, también se observó un producto de traducción por muesca en 58 bases (Fig.22, carril 5, panel superior). Sin embargo, se observó la misma cantidad de producto de ligadura. El marcador de tamaño de ADN en escalera 25 pb se cargó en el carril M.

Conclusión:

La fosforilación del extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM es necesaria para la ligadura. La actividad polimerasa de la *Taq* ADN polimerasa en presencia de los dNTP es necesaria para realizar la extensión del adaptador 5', que crea una aleta en el extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM. Esta aleta es un buen sustrato para la actividad endonucleasa de aleta 5' de la *Taq* ADN polimerasa, generando un sustrato de fosfato 5' perfecto para la ligadura por la ligasa de *E. coli*. La ligadura se produce incluso si la aleta sólo está formada por una base. La ligadura también se produce cuando están presentes los cuatro dNTP, lo que no restringe la longitud de la aleta ni la extensión de la traducción por muesca, lo que sugiere que la ligadura se produce inmediatamente después de que se cree un fosfato 5' en el extremo 5' del sustrato del oligonucleótido de FAM.

Ejemplo 5

Reacción de traducción por muesca-ligadura acoplada con enzimas termoestables

Justificación: Este experimento se realizó para evaluar el efecto de la temperatura de reacción y el número de unidades de la enzima *Taq* ADN polimerasa en la reacción acoplada.

Materiales:

- Oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-144) (Tabla 1)
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
- Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs, cat# M0208S)
- 10X Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs)
- *Taq* ADN polimerasa, concentrada 25U/ul (Genscript, cat# E00012)

Procedimiento:

Las reacciones se ensamblaron en un volumen total de 30µl, que comprendía una concentración final de 1x Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido de FAM, 45 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótido, 200µM de cada uno: dATP, dTTP, dGTP o dTTP, 40 unidades de *Taq* ADN ligasa, o 80 unidades de *Taq* ADN ligasa, o 120 unidades de *Taq* ADN ligasa y 10 unidades de *Taq* ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron a 45 °C, 50 °C, 55 °C o 60 °C, durante 30 minutos. Se mezclaron 10µl de esas reacciones con 10µl de tampón de carga de formamida 2x (97 % de formamida, 10mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrieron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C, se visualizaron en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografiaron con una cámara digital.

Resultados:

La *Taq* ADN polimerasa alargó el extremo hidroxilo 3' del oligonucleótido adaptador 5', eliminando nucleótidos en el sustrato del oligonucleótido de FAM mediante su actividad endonucleasa de solapa 5'. La adición de dTTP/dGTP/dATP (Fig.23, carriles 2 a 5, panel A) o dTTP (Fig.23, carriles 6 a 9, panel A) permitió la adición de cuatro y una bases, respectivamente, en el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' y la posterior escisión del extremo 5' del

oligonucleótido sustrato de FAM. A 60°C la ligadura se vio afectada (Fig.23, carriles 5 y 9, panel A). La eficiencia de la ligadura no se vio afectada por la adición de dTTP/dGTP/dATP (Fig.23, carriles 2 a 5, panel A) o dTTP (Fig.23, carriles 6 a 9, panel A). La eficacia de la ligadura dependía de la cantidad de *Taq* ADN ligasa presente en la reacción. El producto de ligadura fue más abundante cuando se añadieron a la reacción 120 unidades de *Taq* ADN ligasa (Fig.23, carril 4, panel B) en comparación con 40 u 80 unidades (Fig.23, carril 2 y 3, panel B, respectivamente). El carril 1, panel A y el carril 1, panel B muestran oligonucleótidos de control sin enzimas.

Conclusión:

Durante la reacción de traducción por muesca, la *Taq* ADN polimerasa escinde el extremo 5' del sustrato oligonucleótido DE FAM y genera un extremo fosfatado 5' esencial para que la *Taq* ADN polimerasa pueda realizar la ligadura entre 45 °C y 60 °C. La ligadura se redujo a 60 °C. La concentración de *Taq* ADN polimerasa en la reacción también afectó a la eficacia de la ligadura, ya que se observó más producto en presencia de 120U de enzima en comparación con 80U y 40U.

Ejemplo 6

Reacción acoplada de escisión de desplazamiento-ligadura

Justificación: Este experimento se llevó a cabo para demostrar que la *Taq* ADN ligasa termoestable o la ligasa de *E. coli* termolábil pueden combinarse con la *Taq* ADN polimerasa en la reacción de ligadura de escisión de desplazamiento acoplada.

Materiales:

- Oligonucleótido adaptador 5' para la eliminación por desplazamiento (13-156) (Tabla 1)
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
- Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs, cat# M0208S)
- 10X Tampón de Reacción de *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs)
- *Taq* ADN polimerasa, concentrada 25U/ul (Genscript, cat# E00012)
- ADN ligasa *E. coli* (New England BioLabs, cat# M0205S)
- 10X Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa de *E. coli* (New England BioLabs)

Procedimientos:

Las reacciones se ensamblaron en un volumen total de 30µl, que comprendía una concentración final de 1x Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa de *E. coli* o 1x Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido FAM, 45 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para el escisión de desplazamiento y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótido, 10 unidades de ADN ligasa de *E. coli* o 40 unidades de *Taq* ADN ligasa, y 10 unidades de *Taq* ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron a 40°C o 45 °C durante 30 minutos. Se mezclaron 10µl de esas reacciones con 10µl de tampón de carga de formamida 2 x (97 % de formamida, 10mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrieron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C, se visualizaron en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografiaron con una cámara digital.

Resultados:

El oligonucleótido adaptador 5' para el escisión de desplazamiento tiene una base "T" extra coincidente en su extremo 3', que se solapa con el extremo 5' del sustrato del oligonucleótido FAM. Cuando el extremo 3' del oligonucleótido adaptador 5' desplaza el extremo 5' del sustrato de oligonucleótido FAM, la actividad endonucleasa de aleta 5' de la *Taq* ADN polimerasa escinde el extremo 5' del sustrato de oligonucleótido FAM para crear un fosfato 5' que es esencial para la ligadura con la ligasa de *E. coli* (Fig.24, carril 2, panel A) o la *Taq* ADN ligasa (Fig.24, carril 2, panel B). Los carriles 1 de los paneles A y B muestran controles de oligonucleótidos sin enzimas.

Conclusión:

En ausencia de los dNTP, no se produce la extensión del adaptador 5'. Sin embargo, la ADN polimerasa *Taq* puede escindir el extremo 5' del sustrato oligonucleótido FAM y genera un fosfato 5' terminal que es esencial para que la ADN ligasa *E. coli* o la *Taq* ADN ligasa realicen la ligadura.

5 **Ejemplo 7****Reacción acoplada de escisión de desplazamiento-ligadura con universal/degenerada "N" o saliente 3' del adaptador 5' sustrato-específico "T"**

10 **Justificación:** Este experimento demuestra que la ligadura del adaptador 5' utilizando una endonucleasa de aleta puede realizarse si el saliente terminal 3' del adaptador 5' es una coincidencia específica de secuencia o si está compuesto por una 'N' degenerada no específica de secuencia.

Materiales:

- 15
- oligonucleótido adaptador 5' para la eliminación por desplazamiento "T" (13-607) (Tabla 1)
 - oligonucleótido adaptador 5' para la eliminación por desplazamiento "N" (13-596) (Tabla 1)
- 20
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
 - Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- 25
- *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs, cat# M0208S)
 - 10X Tampón de Reacción de *Taq* ADN ligasa (New England BioLabs)
 - *Taq* ADN polimerasa, concentrada 25U/ul (Genscript, cat# E00012)
- 30
- ADN ligasa de *E. coli* (New England BioLabs, cat# M0205S)
 - 10X Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa de *E. coli* (New England BioLabs)

Procedimiento:

35 Las reacciones se ensamblaron en un volumen total de 30 µl, comprendiendo una concentración final de 1x Tampón de reacción de *Taq* ADN ligasa, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido de FAM 45 pmoles de "T" oligonucleótido adaptador 5' o 45 pmoles de "N" oligonucleótido adaptador 5' 1 o 180 pmoles de "N" oligonucleótido adaptador 5' o 450 pmoles de "N" oligonucleótido adaptador 5' y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótidos, 40 unidades de *Taq* ADN ligasa y 10 unidades de *Taq* ADN polimerasa. Las reacciones se incubaron a 45 °C o 50 °C o 55 °C durante 30 minutos o se ciclan 8 veces entre 45 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 15 segundos. Se mezclaron 10 µl de esas reacciones con 10µl de 2x tampón de carga de formamida (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y, posteriormente, se corrieron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 6 5°C, se visualizaron en una

40

45 caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografiaron con una cámara digital.

Resultados:

50 Cuando el oligonucleótido adaptador 5' para el escisión de desplazamiento tiene una "T" en su extremo 3' que coincide con la plantilla de oligonucleótidos (Fig.25, carriles 3, 5, 7, panel A), (que se superpone con la terminación 5' del sustrato de oligonucleótidos de FAM), la ligadura se produjo a una tasa más alta que cuando el oligonucleótido adaptador 5' tenía una base "N" degenerada, donde durante la síntesis del oligo, los cuatro nucleótidos estaban presentes en esta posición (Fig.25, carriles 2, 4, 6, panel A), que sólo es una coincidencia perfecta con la plantilla de oligonucleótidos una cuarta parte de las veces. Se probaron diferentes temperaturas de reacción (45 °C, 50 °C y 55 °C), sin mejorar la ligadura utilizando el "N" oligonucleótido adaptador 5' (Fig.25, carriles 2, 4, 6, panel A). También se probaron diferentes cantidades de "N" oligonucleótido adaptador 5' (45 pmoles, 180 pmoles y 450 pmoles), sin mejorar la reacción de ligadura (Fig.25, carriles 3 a 5, panel B). Sin embargo, los ciclos de temperatura de la reacción entre 45 °C y 65 °C permitieron que la ligadura se produjera a la mayor velocidad, que fue comparable a la del oligonucleótido adaptador 5' de base coincidente "T" (Fig.25, carril 6, panel B). Los carriles 1 de los paneles A y B muestran controles de oligonucleótidos sin enzimas.

60

Conclusión:

65 Para permitir una ligadura eficiente del adaptador 5' acoplada a la eliminación por desplazamiento utilizando el "N" oligonucleótido adaptador 5', fue crítico el ciclado entre una primera temperatura para que la *Taq* ADN ligasa operara y una segunda temperatura donde el dúplex entre la plantilla de oligonucleótidos y el "N" oligonucleótido adaptador 5'

podría disociarse. Las condiciones de ciclado permitieron múltiples asociaciones entre el "N" oligonucleótido adaptador 5' y la plantilla de oligonucleótidos, en las que la reacción de escisión de desplazamiento sólo se produjo si la base terminal 3' del oligonucleótido adaptador 5' coincide perfectamente con la plantilla y puede desplazar el extremo 5' del sustrato de oligonucleótidos de FAM.

Ejemplo 8

Reacción de traducción por muesca-ligadura acoplada utilizando la ADN polimerasa I

Justificación: Este experimento demuestra que la ADN Polimerasa I, que posee actividad exonucleasa 5'-3', también puede participar en el procedimiento de ligadura de adaptadores acoplados a la traducción por muesca.

Materiales:

- Oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-144) (Tabla 1)
- Sustrato de oligonucleótidos de FAM (13-581) (Tabla 1)
- Plantilla de oligonucleótidos (13-582) (Tabla 1)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Marcador de tamaño de ADN de 25 pb (Invitrogen (Life technologies), cat# 10488-022)
- ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# L6090L)
- 10X Tampón de ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# B6090)
- *Taq-B* ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7250L)
- ADN Polimerasa I (New England Biolabs, cat# M0209S)

Procedimiento:

Las reacciones se montaron en un volumen total de 30 µl, que comprendía una concentración final de 1× Tampón de ADN ligasa de *E. coli*, 30 pmoles de sustrato de oligonucleótido de FAM, 45 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca y 45 pmoles de plantilla de oligonucleótido, 200µM de cada uno de los 4 dNTP, 10 unidades de ligas de *E. coli* y 10 unidades de *Taq-B* ADN polimerasa o 5 unidades de ADN polimerasa I o 1 unidad de ADN Polimerasa I. Las reacciones se incubaron a 40 °C, 18 °C, 16 °C o 14 °C durante 30 minutos. Se mezclaron 10 µl de cada reacción con 10 µl de 2x tampón de carga de formamida (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0.01 % de xileno-cianol), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente se corrió en un gel prefabricado de poliácridamida al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S11494) en un horno a 65 °C, se visualizó en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) con y sin SYBR Gold (panel superior y panel inferior, respectivamente), y se fotografió con una cámara digital.

Resultados:

El primer carril de la Fig. 26 muestra el control sin enzima. En presencia de la *Taq-B* ADN polimerasa y la ligasa de *E. coli* (Fig.26, carril 2), el oligonucleótido adaptador 5' se ligó al sustrato de oligonucleótidos de FAM produciendo un producto de 69 bases (Fig.26, carril 2, paneles superior e inferior) o se extendió completamente formando un nuevo producto de 58 bases (Fig.26, carril 2, panel superior). El producto de 69 bases procedía de la extensión por la *Taq-B* ADN polimerasa y de la formación de una aleta en el extremo 5' del sustrato oligonucleótido de FAM. La actividad endonucleasa de aleta *Taq-B* 5' cortó la aleta y generó un fosfato 5' que fue utilizado por la ligasa de *E. coli* para completar la ligadura. El producto de 58 bases se obtuvo cuando el sustrato de oligonucleótidos de FAM se desplazó completamente durante la extensión y fue degradado por la actividad endonucleasa de aleta 5' de la *Taq-B* ADN polimerasa. Estos dos tipos de productos también se formaron cuando se sustituyó la *Taq-B* ADN polimerasa por la ADN Polimerasa I (Fig.26, carriles 3 a 8), que tiene una actividad exonucleasa 5'→3' que elimina los nucleótidos por delante de una cadena de ADN en crecimiento, uno a uno, y permite que se produzca la traducción por muesca. La reacción se realizó con 5 unidades de ADN Polimerasa I (Fig.26, carriles 3 a 5) o con 1 unidad de ADN Polimerasa I (Fig.26, carriles 6 a 8). La reacción con la *Taq-B* ADN polimerasa termófila se realizó a 40 °C (Fig.26, carril 2), mientras que las reacciones realizadas con la ADN Polimerasa I mesófila fueron a 18 °C (Fig.26, carriles 3 y 6), 16 °C (Fig.26, carriles 4 y 7) o 14 °C (Fig.26, carriles 5 y 8). El producto de ligadura de 69 bases se obtuvo en todos los casos, pero la adición de sólo 1 unidad de ADN Polimerasa I (Fig.26, carriles 6 a 8) fue más eficiente que con 5 unidades (Fig.26, carriles 3 a 5). Esto se explica por la fuerte actividad exonucleasa 5'→3' de la ADN polimerasa, que provoca la rápida

degradación parcial del sustrato oligonucleótido de FAM antes de que pueda ser ligado. Se observaron productos de degradación en la parte inferior del panel inferior (Fig.26, carriles 3 a 5). El marcador de tamaño de ADN en escalera 25 pb se cargó en el carril M.

5 Conclusión:

La *Taq-B* ADN polimerasa (polimerasa termofílica) y la ADN Polimerasa I (polimerasa mesofílica) pueden ser utilizadas para realizar la ligadura mediada por la traducción por muesca, pero requieren diferentes condiciones para ser completamente activas. Ambos generaron un producto de 69 bases que fue el resultado de la escisión del extremo 5' seguido de la ligadura, pero utilizan mecanismos diferentes. Mientras que la *Taq-B* creaba una aleta que se cortaba para producir el extremo fosforilado 5' necesario para la ligadura por parte de la ligasa de *E. coli*, la ADN Polimerasa I eliminaba nucleótidos uno a uno delante de la cadena en crecimiento y generaba el nucleótido fosforilado 5' que era el sustrato perfecto para que la ligasa de *E. coli* uniera los dos fragmentos. La ADN Polimerasa I puede utilizarse para realizar la ligadura del adaptador 5' mediada por la traducción por muesca.

Ejemplo 9

El pulido es necesario para la ligadura roma del ADN cizallado físicamente y la desfosforilación impide la formación de productos de ligadura quiméricos

Justificación: Este experimento demuestra la importancia del pulido de los extremos y de la desfosforilación para la ligadura roma de los adaptadores a sustratos de ADN cizallados físicamente.

Materiales:

- Tampón Azul (Enzymatics, cat# B0110)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Adenosina 5'-Trifosfato (ATP) (New England Biolabs, cat# P0756S)
- ADN polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) (New England Biolabs, cat# M0210S)
- T4 ADN polimerasa (New England Biolabs, cat# M0203 S)
- T4 Polinucleótido Quinasa (New England Biolabs, cat# M0201S)
- Fosfatasa alcalina de camarón (Affymetrix, cat# 78390)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Cadena ATCC 11303 de ADN genómico de *E. coli* (Affymetrix, cat# 14380)
- Ultrasonificador enfocado M220, (Covaris, cat# PN 500295)
- Preparación de reinata (Sage Science)
- DNA Clean & Concentrator-5 - (Zymo research, cat#D4004)
- CDF2010 Agarosa al 2 %, sin colorantes y con sustancias internas (Sage Science)

Procedimiento

El ADN_g de *E. coli* se resuspendió en tampón de suspensión de ADN (Teknova, cat#T0227) a una concentración de 100ng/ul. El ADN se fragmentó con el Ultrasonificador enfocado M220 hasta un tamaño medio de 150 pares de bases. Posteriormente, se seleccionó el tamaño de una distribución ajustada de ADN fragmentado de ~150 pb a ~185 pb a partir de un gel de agarosa al 2 % utilizando preparación de reinata.

En un conjunto de reacciones A, 100ng o 500ng del ADN seleccionado por tamaño se sometieron a la actividad de las enzimas de pulido. Las reacciones se ensamblaron en un volumen total de 30µl, que comprende una concentración final de 1× Tampón Azul, 100 µM de cada dNTP, 3 unidades de T4 ADN Polimerasa, 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow), 1mM de ATP, 10 unidades de T4 Polinucleótido Quinasa. Las reacciones se incubaron a 30 °C, durante 20 minutos. El ADN se purificó utilizando las columnas DNA Clean & Concentrator-5. El ADN se eluyó en 15µl de tampón de suspensión de ADN y se realizó una reacción de desfosforilación B seguida de la ligadura del adaptador o se colocaron directamente en la reacción de ligadura sin desfosforilación. Las reacciones de desfosforilación se montaron en un volumen final de 30µl, incluyendo el ADN procesado, el 1x Tampón Azul y 1 unidad de fosfatasa alcalina de camarón. Las reacciones se incubaron a 37 °C, durante 10 minutos. El ADN se purificó utilizando las columnas DNA Clean & Concentrator-5 y se eluyó en 15µl de tampón de suspensión de ADN.

En un conjunto de reacciones C, 100 ng del ADN seleccionado por tamaño se sometió a desfosforilación seguida de pulido o directamente a pulido en un conjunto de reacciones D. Las reacciones de desfosforilación se ensamblaron en un volumen final de 30µl, incluyendo el ADN procesado, 1x Tampón Azul y 1 unidad de fosfatasa alcalina de camarón. Las reacciones se incubaron a 37 °C, durante 10 minutos. El ADN se purificó utilizando las columnas DNA Clean & Concentrator-5 y se eluyó en 15µl de tampón de suspensión de ADN. Las reacciones de pulido D se montaron en un volumen total de 30µl, con una concentración final de 1× Tampón Azul, 100µM de cada dNTP, 3 unidades de T4 ADN polimerasa, 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow)), (carriles 6 a 7). El ADN se purificó utilizando las columnas DNA Clean & Concentrator-5 y se eluyó en 15µl de tampón de suspensión de ADN.

Tras la purificación, todas las reacciones anteriores se sometieron a reacciones de ligadura. Las reacciones se ensamblaron en un volumen final de 30 µl, compuesto por el ADN procesado, 1x Tampón de reacción de T4 ADN Ligasa y 1.200 unidades de T4 ADN Ligasa. Las reacciones se incubaron a 25 °C, durante 15 minutos. Se mezclaron 33 ng de ADN de cada ligadura con 2x tampón de carga de formamida (97 % de formamida, 10 mM de EDTA, 0,01 % de azul de bromofenol y 0,01 % de cianol de xileno), se calentó a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente se corrió en un gel prefabricado de poliacrilamida al 15 %, TBE-Urea (Invitrogen, Cat# S 11494) en un horno a 65 °C, se tiñó con SYBR Gold, se visualizó en una caja de luz Dark Reader (Clare Chemical Research) y se fotografió con una cámara digital.

Resultados:

Antes del pulido, el ADN cizallado físicamente no era un sustrato adecuado para la ligadura a adaptadores de terminación roma por parte de la T4 ADN Ligasa (Fig.27, carril 1). Tras el pulido con la T4 Polinucleótido Quinasa, T4 ADN polimerasa y fragmento Klenow, los extremos del ADN estaban romos, algunos terminales 5' estaban fosforilados y las moléculas podían concatenarse o ligarse entre sí, así como a los adaptadores romos (Fig.27, carriles 2 y 4). Las especies a ~325 bases, ~500 bases y más de 500 bases corresponden a la ligadura de 2 moléculas, 3 moléculas y 4 moléculas de ~175bases juntas, respectivamente (Fig.27, carriles 2 y 4). La concentración de ADN influyó en la formación de productos de ligadura. A mayor concentración de ADN, las especies quiméricas de ligadura de mayor peso molecular fueron más abundantes (Fig.27, carril 4). El tratamiento del ADN con fosfatasa alcalina de camarón después de la etapa de pulido impidió la formación de concatámeros entre las moléculas de ADN (Fig.27, carriles 3 y 5). El tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón también impidió la formación de concatámeros si se realizó antes del pulido del ADN fragmentado (Fig.27, carril 6). Los productos de ligadura observados tras el pulido con la T4 ADN polimerasa y el fragmento de Klenow (Fig.27, carril 7) no fueron tan abundantes en comparación con el pulido con la T4 ADN polimerasa, Klenow y la T4 Polinucleótido Quinasa (Fig.27, carril 2).

Conclusión:

La eficiencia de ligadura de ADN cizallado físicamente dependía del pulido de los extremos por parte de las ADN polimerasas. La ligadura también mejoró con la adición de T4 Polinucleótido Quinasa, que fosforiló el extremo 5' de los fragmentos de ADN y desfosforiló el extremo 3'. La concentración de ADN también influyó en la cantidad de ligadura y en la formación de productos quiméricos. A mayor concentración, es más probable que el ADN forme productos quiméricos en presencia de la T4 DNA ligase. Las fosfatasas alcalinas eliminan los fosfatos 5' (necesarios para la ligadura) e impiden la formación de productos de ligadura quiméricos (concatámeros).

Ejemplo 10

Las bibliotecas NGS tienen un mayor rendimiento cuando se preparan utilizando el recorte de bases 5' acoplado a la reacción de ligadura del adaptador

Justificación: Este experimento demuestra la utilidad de las reacciones presentadas en su aplicación ejemplar a la construcción de bibliotecas NGS, en particular el aumento del rendimiento de las bibliotecas que resulta de incluir el recorte de bases 5' acoplado a la ligadura de adaptadores 5'. Las bibliotecas se construyeron a partir de ADN cizallado de tamaño seleccionado para que los productos de la biblioteca pudieran visualizarse fácilmente mediante electroforesis en gel.

Materiales:

- Tampón Azul (Enzymatics, cat# B0110)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Adenosina 5'-Trifosfato (ATP) (New England Biolabs, cat# P0756S)
- Fragmento Klenow (Enzymatics, cat# P7060L)
- T4 ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7080L)
- T4 Polinucleótido Quinasa (Enzymatics, cat# Y904L)
- Fosfatasa alcalina de camarón (Affymetrix, cat# 78390)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Adaptador 3'; 1^{er} oligonucleótido 13-501 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 2^{do} oligonucleótido 13-712 (Tabla 1)
- Cadena ATCC 11303 de ADN genómico de *E. coli* (Affymetrix, cat# 14380)
- Ultrasonicador enfocado M220, (Covaris, cat# PN 500295)
- ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# L6090L)
- Tampón de ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# B6090)
- Uracilo-ADN glicosilasa (Enzymatics, cat# G5010L)
- *Taq-B* ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7250L)
- oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-489) (Tabla 1)
- oligonucleótido adaptador 5' para la eliminación por desplazamiento (13-595) (Tabla 1)
- *Taq* ADN ligasa (Enzymatics, cat# L6060L)
- SPRIselect (Beckman coulter, cat# B23419)

Procedimientos:

- El ADN genómico de *E. coli* se resuspendió en tampón de suspensión de ADN (Teknova, cat#T0227) a una concentración de 100 ng/μl. El ADN se fragmentó con el Ultrasonicador enfocado M220 hasta un tamaño medio de 150 pares de bases. Posteriormente, se seleccionó el tamaño de una distribución ajustada de ADN fragmentado de ~150bp a ~185bp en un gel de agarosa al 2 % utilizando Preparación de reinata.
- Se utilizaron 100 ng del ADN genómico de *E. coli* seleccionado por tamaño para preparar una biblioteca con el procedimiento de ligadura de adaptador mejorado. La reacción de pulido se ensambló en 30 μl, con una concentración final de 1x Tampón Azul, 100 μM de cada dNTP, 3 unidades de T4 ADN polimerasa, 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow), 10 unidades de T4 Polinucleótido Quinasa. La reacción se incubó a 37 °C durante 20 minutos. El ADN se purificó utilizando el DNA Clean & Concentrator-5 y se eluyó en 15μl con tampón de suspensión de ADN. La reacción de ligadura del Adaptador 3' se ensambló en 30μl incluyendo, 1x T4 ADN Ligasa buffer, 220 pmoles del 1er oligonucleótido Adaptador 3', 440 pmoles del 2do oligonucleótido Adaptador 3', los 15 μl de ADN purificado y 1.200 unidades de T4 DNA ligase. La reacción se incubó a 25 °C durante 15 minutos. El ADN se llevó a un volumen de 50 μl y se purificó y seleccionó por tamaño utilizando 70 μl de perlas SPRIselect (relación 1,4x). El

ADN se eludió en 15 µl de tampón de resuspensión de ADN. La degradación parcial del adaptador 3', el recocido del adaptador 5', el recorte del extremo 5' y la ligadura del adaptador 5' tuvieron lugar en la siguiente reacción que se ensambló en un volumen final de 30 µl que contenía 1× *E. coli* DNA ligase buffer o 1× Tampón de *Taq* ADN ligasa, 200µM de cada uno de los dNTP o 200µM de cada uno de los dATP, dTTP, dGTP o sin dNTP, 200 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca o de oligonucleótido adaptador 5' para el escisión de desplazamiento, 10 unidades de ligasa de *E. coli* o 40 unidades de *Taq* ADN ligasa, 2 unidades de uracilo-ADN glicosilasa, 10 unidades de *Taq*-B ADN polimerasa y 15µl del ADN purificado tras la reacción de ligadura del adaptador 3'. La reacción se incubó a 40 °C o 45 °C durante 10 minutos o con 30 ciclos de (45 °C durante 45 segundos - 65 °C durante 5 segundos) (biblioteca 5). El ADN se llevó a un volumen de 50 µl y se purificó y seleccionó por tamaño utilizando 40 µl de perlas SPRIselect (relación 0,8x). El ADN se eludió en 20 µl y se cuantificó por qPCR utilizando el Kapa Library Quantification Kit - Illumina/Universal (cat# KK4824).

Resultados:

Las concentraciones de las bibliotecas fueron reportadas en el gráfico (Fig.28, panel A) y las bibliotecas fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida al 6 % por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig.28, panel B). El ADN de entrada migró entre ~150 bases y ~185 bases (Fig.28, carril I, panel B). Se tomó una alícuota después del paso de ligadura del adaptador 3' y se cargó en el gel. Este producto migró entre ~225 y ~250 bases, lo que corresponde a la adición de las 64 bases del Adaptador 3' (Fig.28, carril L, panel B). La contribución de la *Taq*-B ADN polimerasa en la eliminación de una o más bases y la exposición de un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ADN antes de la ligadura del adaptador 5' se demostró en la biblioteca 1 frente a la 2 (Fig.28, carriles 1 y 2, paneles A y B). La concentración de la biblioteca 1 realizada sin *Taq*-B (2,6nM) es tres veces inferior a la de la biblioteca 2 realizada con *Taq*-B ADN polimerasa (7,9 nM). Incluso tras el tratamiento con la polinucleótido quinasa T4, el 75 % del ADN fragmentado requirió el procesamiento de sus extremos 5' para ser compatible con la ligadura. Las bibliotecas terminadas también se cargaron en el gel (Fig.28, carriles 1 y 2, panel B). Estas bibliotecas migraron entre ~275 bases y ~300 bases, que corresponden a la adición de las 58 bases del oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca o del oligonucleótido adaptador 5' para el escisión de desplazamiento y las 64 bases del adaptador 3'. El producto de la biblioteca 1 estaba presente en una intensidad menor que las bandas de la biblioteca 2 (Fig.28, panel B). Las bibliotecas 3 y 4 se realizaron con dATP, dTTP, dGTP y ligasa de *E. coli* o *Taq* ADN ligasa, respectivamente, durante el paso de degradación parcial del adaptador 3', la fusión del adaptador 5', el recorte del extremo 5' y la ligadura del adaptador 5'. La concentración de la biblioteca 3 (4,8nM) fue aproximadamente 60 % de la biblioteca 2 (7,9 nM). Esta pérdida de 30 % en el rendimiento está relacionada con el porcentaje de citosina "C" en el genoma de *E. coli* (25 %). Cada vez que el extremo 5' del sustrato de ADN es una citosina, el oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca no puede ser extendido por *Taq* y el extremo 5' no puede ser recortado. También hay 6,25 % y 1,5 % de probabilidad adicional de tener dos y tres citosinas consecutivas, respectivamente, en el extremo 5' del sustrato de ADN. La ligadura a 45°C con la *Taq* ADN ligasa (biblioteca 4) dio un rendimiento similar (4,8 nM) en comparación con la ligasa de *E. coli* a 40 °C (5,2 nM) (biblioteca 3). La biblioteca 5, realizada con el oligonucleótido adaptador 5' para el desplazamiento-traducción, (4,2 nM) fue menos eficiente que la biblioteca 2 realizada con el oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (7,9nM).

Conclusión:

Las bibliotecas se hicieron con éxito con el procedimiento de ligadura de adaptadores divulgado. El recorte del extremo 5' del ADN por la *Taq* ADN polimerasa permite triplicar el rendimiento del producto de ligadura del adaptador 5' en comparación con las bibliotecas que no tienen un paso de procesamiento del extremo 5' (bibliotecas 1 vs 2). Tanto la *Taq* ADN ligasa (biblioteca 4) como la ligasa de *E. coli* (biblioteca 3) ligaron eficazmente el adaptador 5' después de la traducción por muesca. La *Taq* ADN ligasa también ligó el adaptador 5' después del escisión de desplazamiento (biblioteca 5). El uso de 4 dNTP (biblioteca 2) en lugar de 3 (bibliotecas 3 y 4) durante la traducción por muesca puede permitir la ligadura de más sustrato de ADN al adaptador 5'.

Ejemplo 11

Análisis de secuencias de bibliotecas NGS preparadas mediante el recorte de bases 5' acoplado a la ligadura de adaptadores

Justificación: Este experimento demuestra la utilidad de las reacciones presentadas en su aplicación ejemplar a la construcción de bibliotecas NGS. Se construyeron bibliotecas a partir de ADN de *E. coli* escindido y luego se secuenciaron para demostrar la superioridad de la cobertura obtenida en una amplia composición de bases del genoma.

Materiales:

- Tampón Azul (Enzymatics, cat# B0110)

- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- 5 • Conjunto de 100 mM de 2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), PCR Grade (Invitrogen (Life technologies), cat#10297-018)
- Adenosina 5'-Trifosfato (ATP) (New England Biolabs, cat# P0756S)
- 10 • Fragmento Klenow (Enzymatics, cat# P7060L)
- T4 ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7080L)
- T4 Polinucleótido Quinasa (Enzymatics, cat# Y904L)
- 15 • Fosfatasa alcalina de camarón (Affymetrix, cat# 78390)
- T4 ADN Ligasa (Rapid) (Enzymatics, cat# L6030-HC-L)
- 20 • 10X Tampón de T4 ADN Ligasa (Enzymatics, cat# B6030)
- Adaptador 3'; 1^{er} oligonucleótido 13-510 (Tabla 1)
- Adaptador 3'; 2^{do} oligonucleótido 13-712 (Tabla 1)
- 25 • Cadena ATCC 11303 de ADN genómico de *E. coli* (Affymetrix, cat# 14380)
- Ultrasonificador enfocado M220, (Covaris, cat# PN 500295)
- 30 • ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# L6090L)
- Tampón de ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# B6090)
- Uracilo-ADN glicosilasa (Enzymatics, cat# G5010L)
- 35 • *Taq-B* ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7250L)
- Oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca (13-489)
- 40 • SPRIselect (Beckman coulter, cat# B23419)

Procedimiento:

- El ADN genómico de *E. coli* se resuspendió en tampón de suspensión de ADN (Teknova, cat#T0227) a una
- 45 concentración de 100 ng/μl. El ADN se fragmentó con el Ultrasonificador enfocado M220 hasta un tamaño medio de 150 pares de bases. Se utilizaron 100 de ADN genómico de *E. coli* covaris para preparar una biblioteca. Se ensambló una primera reacción de desfosforilación en un volumen total de 15 μl, que comprendía una concentración final de 1x Tampón Azul, 100ng de ADN genómico de *E. coli* fragmentado y 1 unidad de fosfatasa alcalina de camarón. La reacción se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La fosfatasa alcalina de camarón se inactivó 5 minutos a 65 °C. La
- 50 reacción de pulido se ensambló en 30 μl, con una concentración final de 1x Tampón Azul, 100 μM de cada dNTP, 3 unidades de T4 ADN polimerasa, 5 unidades de ADN Polimerasa I, Fragmento Grande (Klenow) y 15 μl de la reacción de desfosforilación. La reacción se incubó a 20 °C durante 30 minutos. El ADN se purificó utilizando el DNA Clean & Concentrator-5. El ADN se eludió en 15μl con tampón de suspensión de ADN. La reacción de ligadura del Adaptador 3' se ensambló en 30 μl incluyendo, 1x T4 ADN Ligasa buffer, 220 pmoles del 1er oligonucleótido Adaptador 3', 440
- 55 pmoles del 2º oligonucleótido Adaptador 3', los 15 μl de ADN purificado después del pulido y 1.200 unidades de T4 DNA ligase. La reacción se incubó a 25 °C durante 15 minutos. Después de ajustar el volumen a 50 μl, el ADN se purificó y se seleccionó por tamaño utilizando perlas SPRIselect de 45 μl (relación 0,9x). El ADN se eludió en 15 μl de tampón de resuspensión de ADN. La degradación parcial del adaptador 3', el recocido del adaptador 5', el recorte del
- 60 extremo 5' del ADN y la ligadura del adaptador 5' tuvieron lugar en la siguiente reacción que se ensambló en un volumen final de 30 μl que contenía 1x *E. coli* DNA ligase, 200μM de cada uno de los dNTP, 200 pmoles de oligonucleótido adaptador 5' para la traducción por muesca, 10 unidades de *E. coli* ligase, 2 unidades de uracilo-ADN glicosilasa, 10 unidades de *Taq-B* DNA polimerasa y 15 μl del ADN purificado tras la reacción de ligadura del Adaptador 3'. La reacción se incubó a 40 °C durante 10 minutos. Tras ajustar el volumen a 50μl, el ADN se purificó utilizando 70 μl de perlas SPRIselect (relación 1,4x). El ADN se eludió en 20 μl y se cuantificó por qPCR utilizando el

Kapa Library Quantification Kit - Illumina/Universal (cat# KK4824). El ADN se desnaturalizó 5 minutos con una concentración final de 0,1 mM de hidróxido de sodio y se cargaron 600 µl de la biblioteca de 10pM en un MiSeq (Illumina).

5 Resultados:

La concentración de la biblioteca cuantificada por qPCR fue 2,8 nM. Se generaron lecturas de pares de 76 bases con la química v2 del Illumina MiSeq. Se generaron grupos de 928K/mm² y la puntuación Q30 fue 97,8 % y 96,9 % para la primera y segunda lectura, respectivamente. La calidad de los datos de la secuencia se evaluó mediante el informe FastQC (Babraham Bioinformatics). Un resumen del análisis mostró 9 marcas de verificación verdes, 2 signos de exclamación amarillos (advertencia), pero no se observó ninguna X roja (fallo) (Fig.29, panel A). El %GC global de todas las bases en todas las secuencias fue 50 %, como se esperaba para el genoma de *E. coli* (marcas de verificación verdes, Fig.29, panel B). La calidad de la secuencia fue excelente en cada lectura a lo largo de las 76 bases analizadas (marca de verificación verde, Fig.29, panel C). El porcentaje de cada base se representó en el panel D. La cantidad de G/C y A/T tenía una diferencia de <10 % en cualquier lectura (marca de verificación verde, Fig.29, panel D). El contenido de GC fue similar en las 76 bases analizadas (marca de verificación verde, Fig.29, panel E). El contenido de GC por lectura a lo largo de cada secuencia se comparó con una distribución teórica (signo de exclamación amarillo, Fig. 29, panel F). Se emitió una advertencia porque la suma de las desviaciones de la distribución normal se encontró en más de 15 % de las lecturas (signo de exclamación amarillo, Fig.29, panel F). No se han producido advertencias sobre el contenido de N por base ni sobre la Distribución de la Longitud de la Secuencia (resumen, Fig.29, panel A). El nivel de duplicación de la secuencia fue 35,85 % (Fig. 29, panel G). Se emitió una advertencia amarilla porque las secuencias no únicas representan más de 20 % del total, debido al alto nivel de cobertura 135x (signo de exclamación amarillo, Fig.29, panel G). No se han registrado secuencias o kmer sobrerrepresentados (resumen, Fig.29, panel A). Prácticamente, no se observó ningún dímero adaptador (0,02 %, datos no mostrados). También se evaluó el sesgo de la CG mediante el Picard CollectGcBiasMetrics. La uniformidad de la cobertura se mantuvo en una amplia gama de composición de la base. Sólo se observaron desviaciones en la cobertura con un contenido de GC inferior a 10 % o superior a 80 %. La calidad de la base fue superior a Q25, lo que corresponde a una precisión de 99,8 % en la llamada de la base. Una vez más, la menor calidad sólo se observó con un contenido de GC extremadamente bajo y alto.

Conclusión:

Se realizó con éxito una biblioteca utilizando ADN genómico de *E. coli* fragmentado. La secuenciación demostró una alta calidad de los datos y la ausencia de sesgo en la cobertura en toda la gama de contenido de GC.

Ejemplo 12

Panel de puntos calientes oncológicos combinado con una amplia cobertura del gen TP53

Justificación: Se diseñó un total de 51 amplicones para cubrir toda la región codificante del gen TP53, así como 30 loci de puntos calientes que representan mutaciones clínicamente procesables en oncología.

Justificación: Este panel de amplicones proporciona una prueba de concepto para el procedimiento divulgado, donde los 51 amplicones tienen un solapamiento significativo para demostrar la ausencia del miniamplicón que domina la reacción, así como la uniformidad de la cobertura entre los amplicones que puede lograrse utilizando un número limitado de ciclos multiplex. Además, el alto porcentaje de lecturas en el objetivo demuestra la especificidad del cebado debido a que los dímeros del cebador y los productos de amplificación no específicos fuera del objetivo no aparecen en la biblioteca secuenciada.

50 Materiales:

- ADN genómico del HapMap humano (Instituto Coriell, NA12878)
- KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix (KAPA Biosystems, cat# KK2802)
- 102 Cebadores específicos-objetivo (Tabla 2)
- Cebador universal que contiene una secuencia truncada de oligonucleótidos adaptadores 3' y bases escindibles 14-882 (Tabla 2)
- Tampón de ligasa de ADN de *E. coli* (Enzymatics, cat# B6090)
- Oligonucleótido adaptador 5' para el paso de ligadura del adaptador (14-571)
- Parte 5' del oligonucleótido adaptador 3' para el paso de ligadura del adaptador (14-877)

- Oligonucleótido enlazador para el paso de ligadura del adaptador 14-382 (Tabla 2)
- ADN ligasa de *E. coli* (Enzymatics, cat# L6090L)
- 5 □ Uracilo-ADN glicosilasa (Enzymatics, cat# G5010L)
- Endonucleasa VIII (Enzymatics, cat# Y9080L)
- 10 □ *Taq-B* ADN polimerasa (Enzymatics, cat# P7250L)
- SPRIselect (Beckman coulter, cat# B23419)
- Solución al 20 % de PEG-8000/2,5M de NaCl para los pasos de purificación

15 Procedimiento:

El ADN genómico humano se diluyó en tampón de suspensión de ADN (Teknova, cat#T0227) a una concentración de 2ng/μl. El ADN se ha sometido a un ligero cizallamiento mediante un vórtex durante 2 minutos. Se utilizaron 10ng de este ADN genómico esquilado para preparar una biblioteca. Se montó una primera reacción de amplificación en un volumen total de 30μl, que comprendía una concentración final de 1× KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix, 10ng de ADN genómico humano esquilado, 300 pmol del cebador universal y una concentración final de 0,85 uM de una mezcla de los 102 cebadores específicos-objetivo presentes en diferentes proporciones. El siguiente programa de ciclismo se ejecutó en esta reacción: 3 minutos a 95 °C seguidos de 4 ciclos de 20 segundos a 98 °C, 5 minutos a 63 °C y 1 minuto a 72 °C para generar amplicones específicos-objetivo y terminados con 23 ciclos de 20 segundos a 98 °C y 1 minuto a 64 °C para producir múltiples copias de los amplicones específicos-objetivo. Tras ajustar el volumen a 50μl, el producto de ADN se purificó utilizando 60 μl de perlas SPRIselect (relación 1,2x). Las perlas se resuspendieron en 50 μl de una mezcla de 1× reacción que contenía 1× tampón de ligasa de *E. coli* , 100 pmol del oligonucleótido enlazador, 10 unidades de ligasa de *E. coli* , 10 unidades de endonucleasa VIII, 2 unidades de uracilo-ADN glicosilasa, 20 unidades de *Taq-B* ADN polimerasa, 100 pmol del oligonucleótido adaptador 5' y 100 pmol de la parte 5' del oligonucleótido adaptador 3'. La reacción se incubó a 37 °C durante 10 minutos y luego se purificó añadiendo 42,5 μl de una solución de PEG-8000/2,5M NaCl al 20 % (relación 0,85x). El ADN se eluyó en 20 μl y se cuantificó por qPCR utilizando el Kapa Library Quantification Kit - Illumina/Universal (cat# KK4824). El ADN se desnaturalizó 5 minutos con una concentración final de 0,1 mM de hidróxido de sodio y se cargaron 600 μl de la biblioteca de 10pM en un MiSeq (Illumina).

35 Resultados:

La concentración de la biblioteca cuantificada por qPCR fue de 19,1 nM. Se generaron lecturas de extremo emparejado de 101 bases mediante la química v2 de Illumina MiSeq. Antes del análisis de los datos, se realiza un recorte específico de la secuencia del extremo 5' tanto de la lectura 1 como de la lectura 2 para eliminar las secuencias de cebadores sintéticos utilizando el programa Cutadapt. La alineación de las lecturas emparejadas con el genoma humano y con las regiones objetivo utilizando la herramienta BWA-MEM mostró datos de calidad excepcional, con 98 % de alineación con las regiones objetivo. Los datos de cobertura también se obtuvieron utilizando BEDtools. La uniformidad de la cobertura fue 100 %, lo que significa que cada uno de los 51 amplicones estaba representado en la biblioteca final. También se calculó la cobertura de cada base individual en cada amplicón y fue superior a 20 % de la cobertura media por base, lo que significa que ninguno de los 51 amplicones estaba infrarrepresentado en el producto final. La Figura 45 muestra la cobertura obtenida para los amplicones superpuestos que cubren los exones codificantes del gen TP53. La Figura 46 muestra una llamada de variante con una frecuencia de 18 % que se obtuvo mediante el análisis de la secuencia utilizando VarScan y SAMtools.

50 Conclusión:

Se realizó con éxito una biblioteca de amplicones dirigida utilizando ADN genómico humano. La secuenciación demostró datos de alta calidad.

Tabla 1.

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia
12-900	1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC ACGACGCTCTTCCGATCT
13-426	2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAG/3SpC3/
13-340	3	/5PHOS/AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGTGTA GATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT/3SpC3/
13-559	4	ACACGACGCTCTTCCGATCddT
13-558	5	ACACGACGCTCTTCCGATCT/3PHOS/
13-562	6	/5PHOS/TGTACCTCACTTCTCATCACTGCT/3FAM/
13-563	7	AGCAGTGATGAGAAGTGAGGTACA
13-561	8	/5PHOS/TGTACCTCACTTCTCATCACTGCT
13-564	9	/5FAM/AGCAGTGATGAGAAGTGAGGTACA
13-560	10	TGTACCTCACTTCTCATCACTGCT
13-144	11	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT
13-581	12	TGTACCTCACTTCTCATCACTGCTGTCATCCGAT/3FAM/
13-582	13	AGCAGTGATGAGAAGTGAGGTACAAGATCGGAAGAGCGT CGTGTAG/3SpC3/
13-156	14	GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTT
13-607	15	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGA GTTTACAGACGTGTGCTCTTCCGATCTT
13-596	16	/5SpC3/C*A*AGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTG ACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTN
13-501	17	/5PHOS/AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC ATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCT*T*G/3SpC3/
13-712	18	AGACGUGUGCUCUTCCGATCddT
13-489	19	/5SpC3/A*A*TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
13-595	20	/5SpC3/A*A*TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTN

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO.	Secuencia
13-510	21	/5PHOS/AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC GCCAATATCTCGTATGCCGTCTTCTGCT*T*G/3spC3/
* : Bases de ADN fosforado /5SpC3/: espaciador 5' C3 (IDT) /3SpC3/: espaciador 3' C3 (IDT) /5PHOS/: 5' Fosforilación (IDT) /3PHOS/: 3' Fosforilación (IDT) /5FAM/: 5' 6-carboxifluoresceína (IDT) /3FAM/: 3' 6-carboxifluoresceína (IDT) ddT: 2', 3'- Dideoximidina (TriLink)		

Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 12.

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-758	22	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTTGCAGCAG CCAGA*C*T	10 nM
14-759	23	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCCCTTCC AATGGA*T*C	10 nM
14-760	24	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCTAGCAGA GACCT*G*T	5 nM
14-864	25	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCAACCCTT GTCCTT*A*C	20 nM
14-762	26	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGACTGCTCT TTTCACCC*A*T	5 nM
14-763	27	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGCAGCCTCT GGCATTCT*T*G	5 nM
14-764	28	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAAGACCCA GGTCCAGAT*G*A	5 nM
14-765	29	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCCCTGGT AGGTTTTC*T*G	5 nM
14-766	30	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGCCCCTGT CATCTTC*T*G	15 nM
14-767	31	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGCATTGA AGTCTCATG*G*A	15 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-768	32	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTCCCTGCT TCTGTC*T*C	10 nM
14-769	33	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTCAGTGGG GAACAAGA*A*G	10 nM
14-885	34	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGCTGTGACT GCTTGTA*G*A	10 nM
14-886	35	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTGTCTCCT TCCTCTTCCT*A*C	10 nM
14-869	36	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGCAGCTG TGGGTT*G*A	10 nM
14-773	37	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCACCATCG CTATCTG*A*G	10 nM
14-865	38	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATGACGGAG GTTGTGA*G*G	5 nM
14-775	39	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCAATCAGT GAGGAATCAG*A*G	5 nM
14-776	40	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCTGGGGCT GGAGA*G*A	5 nM
14-777	41	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCATCCAAAT ACTCCACACG*C*A	5 nM
14-778	42	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATCTTATCC GAGTGGAA*G*G	5 nM
14-779	43	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTGACAACC ACCCTTAA*C*C	5 nM
14-780	44	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGTAGGAC CTGATTTCCTT*A*C	5 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-781	45	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTTGCGGAG ATTCTCTT*C*C	5 nM
14-782	46	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGGACGGAA CAGCTTTG*A*G	5 nM
14-783	47	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACCGCTTCT TGTCC*T*G	5 nM
14-784	48	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGTGCAGTTA TGCCTC*A*G	5 nM
14-785	49	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACTTAGTAC CTGAAGGGT*G*A	5 nM
14-786	50	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGCACTGCCC AACAACA*C*C	5 nM
14-787	51	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGGCATTTTGA GTGTTAGACT*G*G	5 nM
14-788	52	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGGTTGTAG CTAACTAACT*T*C	10 nM
14-789	53	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCATCGTAAG TCAAGTAGCA*T*C	10 nM
14-790	54	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGTTCTATG ACTTTGCCT*G*A	5 nM
14-791	55	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCAGGCTAG GCTAAGCTA*T*G	5 nM
14-792	56	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCTGAAAA TGACTGAATATAAACT*T*G	10 nM
14-793	57	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCCTGCACC AGTAATAT*G*C	10 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-794	58	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTTGCTCTG ATAGGAAAATG*A*G	10 nM
14-795	59	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGATCCAGAC AACTGTTCAAAC*T*G	10 nM
14-796	60	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAGAACTG CCTCTTGA*C*C	3,75 nM
14-797	61	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATGTAAGGG ACAAGCAG*C*C	3,75 nM
14-798	62	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACCAATGG ATCGATCTG*C*C	5 nM
14-799	63	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGAACTGA TGTGACTTA*C*C	5 nM
14-800	64	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGAGCAAGA GGCTTTGG*A*G	5 nM
14-801	65	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACAGTGCAG TGTGGAAT*C*C	5 nM
14-802	66	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACAGAAAC CCATGTATGAAG*T*A	5 nM
14-803	67	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTACCCAAAA AGGTGACATG*G*A	5 nM
14-804	68	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTCAGTGTTA CTTACCTGTCTTG*T*C	10 nM
14-805	69	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTCTGAA GATGTACCTATGG*T*C	10 nM
14-806	70	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACCATGTC CTGACTG*T*G	10 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-807	71	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGGCACTCTG GAAG*C*A	10 nM
14-808	72	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTACTGAAAG CTCAGGGAT*A*G	10 nM
14-809	73	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACACTTACA CATCACTTT*G*C	10 nM
14-810	74	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGTCTTTCTT TGAAGCAGCA*A*G	10 nM
14-811	75	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTAGCTGTGAT CCTGAAACTG*A*A	10 nM
14-812	76	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTCCTGCAG GATTCCT*A*C	20 nM
14-813	77	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGGATGTC CTCAAAAG*A*C	20 nM
14-814	78	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGATTCTTA CAGAAAACAAGTG*G*T	15 nM
14-815	79	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGATGGCAAAT ACACAGAGGA*A*G	15 nM
14-816	80	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACGGGTAGA GTGTGCG*T*G	5 nM
14-817	81	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGCCACAGAG AAGTTGTTG*A*G	5 nM
14-818	82	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGCACTGGCCT CATCT*T*G	10 nM
14-819	83	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTCCAGTGTG ATGATGGTG*A*G	10 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-820	84	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATGTGTAACA GTTCTGCA*T*G	5 nM
14-821	85	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCAGAGGC AAGCAG*A*G	5 nM
14-822	86	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTACTTCTCCC CCTCCTC*T*G	10 nM
14-823	87	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTCCCAGCCT GGGCA*T*C	10 nM
14-824	88	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGAATGAG GCCTTGA*A*C	8 nM
14-825	89	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTCCAACCT AGGAAGGC*A*G	8 nM
14-826	90	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCACTGTAATA ATCCAGACTGT*G*T	5 nM
14-827	91	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATGTACTGGT CCCTCATT*G*C	5 nM
14-828	92	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTTCAGGAT GGTGGATG*T*G	20 nM
14-829	93	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGACTCCACCA GGACT*T*G	20 nM
14-830	94	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTAACCTTGC AGAATGGTCG*A*T	5 nM
14-831	95	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACGAGAAC TTGATCATATTC*A*C	5 nM
14-832	96	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACAGGTTCT TGCTGGTG*T*G	5 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración en la PCR (nM)	final
14-833	97	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGTGGGATC ATATTCATCTA*C*A	5 nM	
14-836	98	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGCTTGTGGAG CCTCTTA*C*A	5 nM	
14-837	99	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGACCTTACC TTATACACC*G*T	5 nM	
14-838	100	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACCATCTCAC AATTGCCA*G*T	5 nM	
14-839	101	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTTTCGGAGA TGTTGCTTC*T*C	5 nM	
14-840	102	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATCCCAGAA GGTGAGAAAG*T*T	5 nM	
14-841	103	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAGGTTCAGA GCCATG*G*A	5 nM	
14-842	104	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCAGGAAG CCTACGT*G*A	10 nM	
14-843	105	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACATAGTCC AGGAGG*C*A	10 nM	
14-844	106	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACCGCAGCAT GTCAAGA*T*C	10 nM	
14-845	107	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACCTAAAGC CACCTCCTT*A*C	10 nM	
14-846	108	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCACTATACT GACGTCTCCA*A*C	15 nM	
14-847	109	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACACACGCAA AATACTCCTT*A*G	15 nM	

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-850	110	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTCCTCACA GAGTTCAA*G*C	5 nM
14-851	111	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTTTGCAGA TGATGGGCT*C*C	5 nM
14-852	112	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGACCAAG CCCATC*A*C	5 nM
14-853	113	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGGCCTTGT ACTGCA*G*A	5 nM
14-854	114	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGTGTGTTCA CAGAGACC*T*G	5 nM
14-855	115	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTAGGAAATA GCAGCCTCAC*A*T	5 nM
14-856	116	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTCCTGATC TCCTTAGACA*A*C	15 nM
14-857	117	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTGCTGCACT TCTCACA*C*C	15 nM
14-858	118	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAAAATTCCA GTGGCCAT*C*A	7,5 nM
14-859	119	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAATGAAGAG AGACCAGA*G*C	7,5 nM
14-860	120	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCATACCCCTC TCAGCGT*A*C	5 nM
14-861	121	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGGATGTCAG GCAGAT*G*C	5 nM
14-862	122	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCTCCCAGAA GGTCTAC*A*T	15 nM

(continuación)

Nombre de la secuencia	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	Concentración final en la PCR (nM)
14-863	123	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGACATGG TTGGGACTCT*T*G	15 nM
14-882	124	TCAGACGUGUGCUCUCCGAU*C*U	10 µM
14-382	125	GTGACTGGAGTTCAG ACGTGT/3PHOS/	-
14-877	126	AACTCCAGTCACTAATGCGCATCTCGTATGCCG TCTTCTGCTTG/3PHOS/	-
14-571	127	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGC GAAGACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATCT	-
* : Bases de ADN fosforado (IDT) /3PHOS/: fosforilación 3' (IDT)			

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Swift Biosciences, Inc.
- <120> procedimientos mejorados para el procesamiento de sustratos de ADN
- <130> REEBM/P61546EPdiv2
- 10 <140> 18165783.4 <141>2015-01-30
- <150> US 61/934515
- <151>2014-01-31
- 15 <150> US 62/078309
- <151>2014-11-11
- <150> US 62/078313
- 20 <151>2014-11-11
- <160> 127
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 58
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 1
- 35 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgctct tccgatct 58

5
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> Espaciador C3 3' (ID)

15
 <400> 2
 agatcggaag agcgtcgtgt ag 22

20
 <210> 3
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación 5' (IDT)

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (58)..(58)
 <223> Espaciador C3 3' (ID)

35
 <400> 3
 agatcggaag agcgtcgtgt agggaaagag ttagatctc ggtggtcgcc gtatcatt 58

40
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> Didesoxitimidina 3' (TriLink)

50
 <400> 4
 acacgacgct ctccgac 19

55
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> Fosforilación 3' (IDT)

<400> 5
 acacgacgct cttccgatct 20

 5 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 15 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación 5' (IDT)

 20 <400> 6
 tgtacctcac ttctcatcac tgct 24

 25 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 35 <400> 7
 agcagtgatg agaagtgagg taca 24

 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación 5' (IDT)

 45 <400> 8
 tgtacctcac ttctcatcac tgct 24

 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 55 <220>
 <221> características_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> 6-carboxifluoresceína 5' (IDT)

 60 <400> 9
 agcagtgatg agaagtgagg taca 24

 65 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 10
 5 tgtacctcac ttctcatcac tgct 24

 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> **Secuencia Artificial**

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 11
 15 gtgactggag ttcagacgtg tgctctccg atct 34

 <210> 12
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (34)..(34)
 30 <223> 6-carboxifluoresceína 3' (IDT)

 <400> 12
 tgtacctcac ttctcatcac tgctgtcatc cgat 34

 <210> 13
 35 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 45 <223> Espaciador C3 3' (ID)

 <400> 13
 agcagtgatg agaagtgagg tacaagatcg gaagagcgtc gtgtag 46

 50
 <210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 14
 60 gactggagtt cagacgtgtg ctctccgat ctt 33

 <210> 15
 <211> 65
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<400> 15		
5	caagcagaag acggcatacg agatcgtgat gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg	60	
	atctt	65	
	<210> 16		
	<211> 65		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
15	<220>		
	<221> características_misc		
	<222> (1)..(1)		
	<223> Espaciador 5' C3 (IDT)		
20	<220>		
	<221> características_misc		
	<222> (1)..(1)		
	<223> Base fosforioada		
25	<220>		
	<221> características_misc		
	<222> (2)..(2)		
	<223> Base fosforioada		
30	<220>		
	<221> características_misc		
	<222> (65)..(65)		
	<223> n e s a, c, g, o t		
35	<400> 16		
	caagcagaag acggcatacg agatcgtgat gtgactggag ttcagacgtg tgctcttcg	60	
	atctn	65	
40	<210> 17		
	<211> 64		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<221> características_misc		
50	<222> (1)..(1)		
	<223> Fosforilación 5' (IDT)		
	<220>		
	<221> características_misc		
55	<222> (62)..(62)		
	<223> Base fosforioada		
	<220>		
	<221> características_misc		
60	<222> (63)..(63)		
	<223> Base fosforioada		

	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (64)..(64)	
5	<223> Espaciador C3 3' (ID)	
	<400> 17	
	agatcggaag agcacacgtc tgaactccag tcacatcacg atctcgtatg ccgtcttctg	60
	cttg	64
10	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> características_misc	
20	<222> (20)..(20)	
	<223> 2', Didesoxitimidina 3' (TriLink)	
	<400> 18	
	agacgugugc ucutccgatc 20	
25	<210> 19	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
35	<221> características_misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Espaciador C3 de 5' (IDT)	
	<220>	
40	<221> características_misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Base fosforioada	
	<220>	
45	<221> características_misc	
	<222> (2)..(2)	
	<223> Base fosforioada	
	<400> 19	
50	aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgtct tccgatct 58	
	<210> 20	
	<211> 59	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> Espaciador C3 de 5' (IDT)	

	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (1)..(1)	
5	<223> Base fosforotioada	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (2)..(2)	
10	<223> Base fosforotioada	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (59)..(59)	
15	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 20	
	aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgctct tccgatctn 59	
	<210> 21	
20	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (1)..(1)	
30	<223> Fosforilación 5' (IDT)	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (62)..(62)	
35	<223> Base fosforotioada	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (63)..(63)	
40	<223> Base fosforotioada	
	<220>	
	<221> características_misc	
	<222> (64)..(64)	
45	<223> Espaciador C3 3' (ID)	
	<400> 21	
	agatcggaag agcacacgtc tgaactccag tcacgccaat atctcgtatg ccgtcttctg 60	
	cttg	64
50	<210> 22	
	<400> 22	
	000	
55	<210> 23	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <400> 23
 tcagacgtgt gctctccga tctcctgccc ttcaatga tc 42

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

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 24
 tcagacgtgt gctctccga tctcccctag cagagacctg t 41

45
 <210> 25
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65
 <400> 25
 tcagacgtgt gctctccga tctgccaac cctgtcctt ac 42

70
 <210> 26
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80
 <220>
 <221> características_misc

<222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5

<220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10

<400> 26
 tcagacgtgt gctctccga tctctgactg ctctttcac ccat 44

<210> 27
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20

<220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25

<220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

30

<400> 27
 tcagacgtgt gctctccga tctgagcagc ctctggcatt ctg 43

<210> 28
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45

<220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50

<400> 28
 tcagacgtgt gctctccga tctgaagac ccaggtccag atga 44

55

<210> 29
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65

5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 29
 tcagacgtgt gctctccga tctgctgccc tggtaggttt tctg 44
 10 <210> 30
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 30 <400> 30
 tcagacgtgt gctctccga tctctggccc ctgtcatctt ctg 43
 35 <210> 31
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 50 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 55 <400> 31
 tcagacgtgt gctctccga tctcaggcat tgaagtctca tgga 44
 60 <210> 32
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 70 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 75 <220>
 <221> características_misc

<222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5 <400> 32
 tcagacgtgt gctctccga tcttctccc tgcttctgc tc 42

10 <210> 33
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25 <400> 33
 tcagacgtgt gctctccga tctctgtcag tgggaacaa gaag 44

30 <210> 34
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50 <400> 34
 tcagacgtgt gctctccga tctgtgctgt gactgctgt aga 43

55 <210> 35
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

70 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 35
 tcagacgtgt gctctccga tctctgtc tcttctct tctac 46

 5 <210> 36
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 20 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 36
 tcagacgtgt gctctccga tctctgtgca gctgtgggt ga 42

 25 <210> 37
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 40 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 37
 tcagacgtgt gctctccga tctgtcacc atcgctatct gag 43

 45 <210> 38
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 55 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 60 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 38
 tcagacgtgt gctctccga tctcatgacg gaggtgtga gg 42

 65

5
 <210> 39
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

20
 <400> 39
 tcagacgtgt gctctccga tctagcaatc agtgaggaat cagag 45

25
 <210> 40
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (38)..(38)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 40
 tcagacgtgt gctctccga tctagctggg gctggagaga 40

45
 <210> 41
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <400> 41
 tcagacgtgt gctctccga tctgtcatcc aaatactcca cagcga 46

65
 <210> 42
 <211> 44

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 10 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 42
 tcagacgtgt gctctccga tctgcatctt atccgagtg aagg 44

 20 <210> 43
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 30 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 35 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 43
 tcagacgtgt gctctccga tctcactgac aaccaccctt aacc 44

 40 <210> 44
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 50 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 55 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 44
 60 tcagacgtgt gctctccga tctcaggtag gacctgattt ccttac 46

 <210> 45
 <211> 44
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 15 <400> 45
 tcagacgtgt gctctccga tcttcttgc ggagattctc ttcc 44

 20 <210> 46
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 35 <400> 46
 tcagacgtgt gctctccga tcttgggacg gaacagcttt gag 43

 40 <210> 47
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 50 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 55 <400> 47
 tcagacgtgt gctctccga tctccaccgc ttctgtcct g 41

 60 <210> 48
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <400> 48
 tcagacgtgt gctctccga tctgggtgca gttatgcctc ag 42

20
 <210> 49
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 49
 tcagacgtgt gctctccga tctagactta gtacctaag ggtga 45

45
 <210> 50
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65
 <400> 50
 tcagacgtgt gctctccga tcttagcact gcccaacaac acc 43

70
 <210> 51
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80
 <220>
 <221> características_misc

<222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10
 <400> 51
 tcagacgtgt gctctccga tctcgccatt ttgagtgtta gactgg 46

15
 <210> 52
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

30
 <400> 52
 tcagacgtgt gctctccga tctcctggtt gtagctaact aacttc 46

35
 <210> 53
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 53
 tcagacgtgt gctctccga tctaccatcg taagtcaagt agcatc 46

55
 <210> 54
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 5
 <400> 54
 tcagacgtgt gctctccga tctatgggtc tatgacttg cctga 45
 <210> 55
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 20 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 25 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 55
 tcagacgtgt gctctccga tctagcaggc taggctaagc tatg 44
 30 <210> 56
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> características_misc
 40 <222> (50)..(50)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <220>
 <221> características_misc
 45 <222> (51)..(51)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 56
 tcagacgtgt gctctccga tctcctgctg aaaatgactg aatataaact tg 52
 50 <210> 57
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> características_misc
 60 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <220>
 65 <221> características_misc

<222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5 <400> 57
 tcagacgtgt gctctccga tctggctctg caccagtaat atgc 44

10 <210> 58
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25 <400> 58
 tcagacgtgt gctctccga tcttgctgc tctgatagga aaatgag 47

30 <210> 59
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50 <400> 59
 tcagacgtgt gctctccga tctggatcca gacaactgtt caaactg 47

55 <210> 60
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

70 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 60
 tcagacgtgt gctctccga tctccagaaa ctgcctcttg acc 43

 5 <210> 61
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 20 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 25 <400> 61
 tcagacgtgt gctctccga tctgatgtaa gggacaagca gcc 43

 <210> 62
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 40 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 45 <400> 62
 tcagacgtgt gctctccga tctgaaccaa tggatcgatc tgcc 44

 <210> 63
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 55 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 60 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 65 <400> 63
 tcagacgtgt gctctccga tctggggaac tgatgtgact tacc 44

5
 <210> 64
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

20
 <400> 64
 tcagacgtgt gctctccga tctctgagca agaggcttg gag 43
 <210> 65
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 65
 tcagacgtgt gctctccga tctaacagtg cagtgtggaa tcc 43
 <210> 66
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <400> 66
 tcagacgtgt gctctccga tctccacaga aacccatgta tgaagta 47
 <210> 67
 <211> 45

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 10 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 67
 tcagacgtgt gctctccga tctgtaccca aaaaggtgac atgga 45

 20 <210> 68
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (47)..(47)
 30 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (48)..(48)
 35 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 68
 tcagacgtgt gctctccga tctttcagt gttactacc tgtctgtc 49

 40 <210> 69
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 50 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (47)..(47)
 55 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 69
 60 tcagacgtgt gctctccga tctggactct gaagatgtac ctatggtc 48

 <210> 70
 <211> 43
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 15 <400> 70
 tcagacgtgt gctctccga tctctcacca tgtctgact gtg 43

 20 <210> 71
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (38)..(38)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 35 <400> 71
 tcagacgtgt gctctccga tctgtggcac tctggaagca 40

 40 <210> 72
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 50 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 55 <400> 72
 tcagacgtgt gctctccga tctgttactg aaagctcagg gatag 45

 60 <210> 73
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15 <400> 73
 tcagacgtgt gctctccga tctccacact tacacatcac ttgac 45

20 <210> 74
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40 <400> 74
 tcagacgtgt gctctccga tcttagtctt tcttgaagc agcaag 46

45 <210> 75
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65 <400> 75
 tcagacgtgt gctctccga tcttagctg tgatcctgaa actgaa 46

70 <210> 76
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80 <220>
 <221> características_misc

<222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5

<220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10

<400> 76
 tcagacgtgt gctctccga tcttctct gcaggattcc tac 43

<210> 77
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20

<220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25

<220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

30

<400> 77
 tcagacgtgt gctctccga tcttggtgga tgcctcaaa agac 44

<210> 78
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<220>
 <221> características_misc
 <222> (47)..(47)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45

<220>
 <221> características_misc
 <222> (48)..(48)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50

<400> 78
 tcagacgtgt gctctccga ttcaggatt cttacagaaa acaagtgt 49

<210> 79
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60

<220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65

5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 79
 tcagacgtgt gctctccga tcttgatggc aaatacacag aggaag 46
 10 <210> 80
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 80
 tcagacgtgt gctctccga tctgacgggt agagtgtgcg tg 42
 30 <210> 81
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 <400> 81
 tcagacgtgt gctctccga tctcgccaca gagaagttgt tgag 44
 50 <210> 82
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 65 <220>
 <221> características_misc

<222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5 <400> 82
 tcagacgtgt gctctccga tctcgactg gcctcatctt g 41

10 <210> 83
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25 <400> 83
 tcagacgtgt gctctccga tctctccag tgtgatgatg gtgag 45

30 <210> 84
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50 <400> 84
 tcagacgtgt gctctccga tctcatgtgt aacagttcct gcatg 45

55 <210> 85
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

70 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 85
 tcagacgtgt gctctccga tctggcaga ggcaagcaga g 41

 5 <210> 86
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 20 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 86
 tcagacgtgt gctctccga tcttacttc tccccctct ctg 43

 25 <210> 87
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 40 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 87
 tcagacgtgt gctctccga tctctcca gcctggcat c 41

 45 <210> 88
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 55 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 60 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 88
 tcagacgtgt gctctccga tctgctgaat gaggccttg aac 43

 65

5
 <210> 89
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

20
 <400> 89
 tcagacgtgt gctctccga tctcttcca acctaggaag gcag 44
 <210> 90
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 90
 tcagacgtgt gctctccga tctgcactgt aataatccag actgtgt 47
 <210> 91
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <400> 91
 tcagacgtgt gctctccga tctcatgtac tggtcctca ttgc 44
 <210> 92
 <211> 44

65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 10 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 92
 tcagacgtgt gctctccga tctccttca ggatggtgga tgtg 44

 20 <210> 93
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (39)..(39)
 30 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 35 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 93
 tcagacgtgt gctctccga tctcgactcc accaggactt g 41
 40
 <210> 94
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 50 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 55 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 94
 60 tcagacgtgt gctctccga tctgttaacc ttgcagaatg gtcgat 46

 <210> 95
 <211> 47
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 15 <400> 95
 tcagacgtgt gctcttccga tctccacgag aacttgatca tattcac 47

 20 <210> 96
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 35 <400> 96
 tcagacgtgt gctcttccga tctcaacagg ttcttgctgg tgtg 44

 40 <210> 97
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 50 <220>
 <221> características_misc
 <222> (46)..(46)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 55 <400> 97
 tcagacgtgt gctcttccga tctatggtgg gatcatattc atctaca 47

 60 <210> 98
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <400> 98
 tcagacgtgt gctctccga tctagcttgt ggagcctctt aca 43

20
 <210> 99
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 99
 tcagacgtgt gctctccga tctgggacct tacctatac accgt 45

45
 <210> 100
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65
 <400> 100
 tcagacgtgt gctctccga tctcaccatc tcacaattgc cagt 44

70
 <210> 101
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

80
 <220>
 <221> características_misc

<222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5

<220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10

<400> 101
 tcagacgtgt gctctccga tctgcttcg gagatgtgc ttctc 45

<210> 102
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20

<220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25

<220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

30

<400> 102
 tcagacgtgt gctctccga tctgatccca gaaggtgaga aagtt 45

<210> 103
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45

<220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50

<400> 103
 tcagacgtgt gctctccga tcttgaggtt cagagccatg ga 42

<210> 104
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60

<220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 104
 tcagacgtgt gctctccga tctctccagg aagcctacgt ga 42

10
 <210> 105
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 105
 tcagacgtgt gctctccga tctggacata gtccaggagg ca 42

30
 <210> 106
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

45
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 106
 tcagacgtgt gctctccga tctcaccgca gcatgtcaag atc 43

50
 <210> 107
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

60
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

65
 <220>
 <221> características_misc

<222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

5 <400> 107
 tcagacgtgt gctctccga tctgacctaa agccacctcc ttac 44

10 <210> 108
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

30 <400> 108
 tcagacgtgt gctctccga tctccacta tactgacgtc tccaac 46

35 <210> 109
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

50 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

55 <400> 109
 tcagacgtgt gctctccga tctacacacg caaaatactc cttcag 46

60 <210> 110
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

70 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

75 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

<400> 110
 tcagacgtgt gctctccga tctctgtcct cacagagttc aagc 44

 5 <210> 111
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 20 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 25 <400> 111
 tcagacgtgt gctctccga tctgttttg cagatgatgg gctcc 45

 <210> 112
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 35 <222> (39)..(39)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 40 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 45 <400> 112
 tcagacgtgt gctctccga tctctggacc aagcccatca c 41

 <210> 113
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 55 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 60 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 65 <400> 113
 tcagacgtgt gctctccga tctgtggcc ttgtactgca ga 42

5
 <210> 114
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

20
 <400> 114
 tcagacgtgt gctctccga tctcagtggt ttcacagaga cctg 44
 <210> 115
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 115
 tcagacgtgt gctctccga tctgtaggaa atagcgcct cacat 45
 <210> 116
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

60
 <400> 116
 tcagacgtgt gctctccga tctgttcct gatctccta gacaac 46
 <210> 117
 <211> 43

65

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 10 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 15 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 117
 tcagacgtgt gctctccga tctctgctg cactctcac acc 43

 20 <210> 118
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 30 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (43)..(43)
 35 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 118
 tcagacgtgt gctctccga tctgaaaat tccagtggcc atca 44
 40
 <210> 119
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 50 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 55 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 <400> 119
 60 tcagacgtgt gctctccga tctcaatgaa gagagaccag agc 43

 <210> 120
 <211> 43
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 5 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 10 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 15 <400> 120
 tcagacgtgt gctctccga tctcccatat cctctcagcg tac 43

 20 <210> 121
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 25 <220>
 <221> características_misc
 <222> (40)..(40)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 30 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

 35 <400> 121
 tcagacgtgt gctctccga tctgtggatg tcaggcagat gc 42

 40 <210> 122
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> características_misc
 <222> (41)..(41)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 50
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (42)..(42)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)
 55
 <400> 122
 tcagacgtgt gctctccga tctccctccc agaaggtcta cat 43

 60 <210> 123
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

10
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (45)..(45)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

15
 <400> 123
 tcagacgtgt gctctccga tcttttgac atggtggga ctctg 46

20
 <210> 124
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

35
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> Bases de ADN fosforotioadas (IDT)

40
 <400> 124
 tcagacgugu gcucuuccga ucu 23

45
 <210> 125
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> Fosforilación 3' (IDT)

60
 <400> 125
 gtgactggag ttcagacgtg t 21

65
 <210> 126
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

70
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

75
 <220>
 <221> características_misc
 <222> (44)..(44)
 <223> Fosforilación 3' (IDT)

80
 <400> 126
 aactccagtc actaatgcgc atctcgatg ccgtctctg ctg 44

ES 2 908 644 T3

5	<p><210> 127 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>
<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
10	<p><400> 127</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"><div style="flex-grow: 1;"><p>aatgatacgg cgaccaccga gatctacaca ggcgaagaca ctctttccct acacgacgct</p><p>cttcgatct</p></div><div style="text-align: right; white-space: nowrap;"><p>60</p><p>70</p></div></div>

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de enriquecimiento con base en la PCR de un sustrato objetivo que comprende los pasos de:

- (i) introducir una pluralidad de componentes de la reacción en cadena de la polimerasa en una muestra que comprende un sustrato de ácido nucleico para proporcionar una mezcla de reacción de PCR, en la que la pluralidad de componentes de la reacción en cadena de la polimerasa comprende una pluralidad de pares de cebadores diferentes específicos-objetivo para amplificar una pluralidad de loci diferentes del sustrato de ácido nucleico, un cebador universal, una ADN polimerasa, y los dNTP, en el que cada uno de la pluralidad de diferentes pares de cebadores específicos-objetivo comprende un cebador directo y un cebador inverso, en el que el cebador directo y el cebador inverso comprenden una secuencia complementaria 3' que es complementaria a una primera secuencia del sustrato de ácido nucleico y una segunda secuencia del sustrato de ácido nucleico, respectivamente, y en el que el cebador directo y el cebador inverso comprenden además cada uno una secuencia terminal 5' que no es complementaria al sustrato de ácido nucleico, en el que la secuencia terminal 5' comprende una secuencia de adaptador universal, en el que el cebador universal comprende una secuencia de adaptador universal modificada, en el que la secuencia de adaptador universal modificada posee una base modificada, en el que la base modificada se dirige a la escisión del cebador universal por una endonucleasa, en el que la secuencia de adaptador universal modificada y la secuencia de adaptador universal son complementarias a una secuencia común, y en la que el cebador universal se encuentra en una concentración final en la mezcla de reacción de PCR que es superior a la concentración final de cada uno de la pluralidad de pares de cebadores específicos objetivo-específicos;
- (ii) exponer la mezcla de reacción de PCR a al menos dos ciclos iniciales de PCR que comprendan una primera temperatura de fusión durante una primera duración de fusión para generar una pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes, en los que cada uno de la pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes comprenda la secuencia terminal 5' en su región terminal 5';
- (iii) exponer la mezcla de reacción de PCR a un número adecuado de ciclos de PCR adicionales para amplificar aún más la pluralidad de amplicones específicos objetivo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además (iv) purificar la pluralidad de diferentes amplicones específicos objetivo a partir de la mezcla de PCR para obtener una muestra de amplicón específico objetivo purificada.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende, además:

- (v) aplicar una ligasa, un adaptador 5', un adaptador 3', una enzima con actividad endonucleasa de aleta 5' y una endonucleasa a la muestra de amplicón específico objetivo purificada, en la que el adaptador 5' es de cadena única y comprende una secuencia 3' que es idéntica a una porción 3' de la secuencia del adaptador universal donde el adaptador 5' comprende además una porción 5' que no está presente en la secuencia del adaptador universal, en el que el adaptador 3' es parcialmente de cadena doble y comprende una secuencia que es idéntica a la porción 5' de la secuencia del adaptador universal, y en el que el adaptador 3' comprende además una porción 3' que no está presente en la secuencia del adaptador universal; y
- (vi) incubar la muestra de amplicón específico objetivo purificada del paso iv) en condiciones suficientes para permitir lo siguiente:
- (a) la escisión de los cebadores universales que comprenden la base modificada presente en la pluralidad de diferentes amplicones específicos-objetivo;
- (b) la fusión del adaptador 5' y del adaptador 3' a cada uno de la pluralidad de amplicones específicos objetivo;
- (c) la ligadura del adaptador 5' y del adaptador 3' a cada uno de la pluralidad de amplicones específicos-objetivo, precedida de una escisión por endonucleasa de aleta si la digestión por endonucleasa da lugar a alguna base restante del cebador universal.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los ciclos de PCR adicionales comprenden la primera temperatura de fusión para una segunda duración de fusión, en el que la primera duración de fusión es mayor que la segunda duración de fusión.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que uno o ambos cebadores delanteros y reversos de cada uno de los diferentes pares de cebadores específicos-objetivo comprenden además una secuencia degenerada en su secuencia terminal 5', en el que la secuencia degenerada se sitúa entre la secuencia complementaria 3' y la secuencia adaptadora universal.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la base modificada es desoxiuridina, ARN, desoxiinosina o inosina, opcionalmente en el que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa de alta fidelidad que es tolerante a la base modificada.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cebador universal comprende además una modificación resistente a las nucleasas en su extremo 3', opcionalmente en el que la modificación resistente a las nucleasas es un enlace fosforotioato.
- 5 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cebador directo y el cebador inverso de cada uno de la pluralidad de pares de cebadores específicos-objetivo comprenden además una modificación resistente a la nucleasa en sus extremos 3'.
- 10 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la relación molar de cada uno de la pluralidad de pares de cebadores específicos-objetivo diferentes con respecto al cebador universal es de al menos 1:100.
- 15 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes comprende un primer amplicón específico objetivo y un segundo amplicón específico objetivo, en el que el primer amplicón específico objetivo comprende una región que se superpone con el segundo amplicón específico objetivo y una región que no se superpone con el segundo amplicón específico objetivo.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el segundo amplicón específico-objetivo forma una estructura secundaria estable.
- 20 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos uno de la pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes comprende dos regiones que se superponen con otras dos de la pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes y una región que no se superpone con ninguna otra de la pluralidad de amplicones específicos objetivo diferentes.
- 25 13. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la endonucleasa se selecciona del grupo que consiste en UDG + Endonucleasa VIII, RNasa HI, RNasa H2 y Endonucleasa V.
14. Un sistema de reacción en cadena de la polimerasa para generar una biblioteca de secuenciación que comprende:
- 30 un par de cebadores específicos-objetivo que comprenden un cebador directo y un cebador inverso, en el que el cebador directo y el cebador inverso comprenden cada uno una secuencia complementaria 3' que es complementaria a una primera secuencia y una segunda secuencia, respectivamente, de un sustrato de ácido nucleico y una secuencia terminal 5' que no es complementaria al sustrato de ácido nucleico, en el que la secuencia terminal 5' comprende una secuencia de adaptador universal;
- 35 un cebador universal, en el que el cebador universal comprende una secuencia de adaptador universal modificada, en la que la secuencia de adaptador universal modificada posee una base modificada, en la que la base modificada está dirigida a la escisión del cebador universal por una endonucleasa, y en el que la secuencia de adaptador universal modificada y la secuencia de adaptador universal son complementarias a una secuencia común;
- 40 los dNTP;
- una ADN polimerasa para amplificar el sustrato de ácido nucleico;
- una endonucleasa para escindir el cebador universal que comprende la base modificada;
- un polinucleótido adaptador 3' que comprende un primer oligonucleótido, un segundo oligonucleótido y una porción de cadena doble, en la que la porción de cadena doble comprende el segundo oligonucleótido
- 45 hibridado con el primer oligonucleótido, y en la que el primer oligonucleótido comprende una secuencia idéntica a la porción 5' de la secuencia de adaptador universal, y en el que el segundo oligonucleótido comprende además una porción 3' que no está presente en la secuencia de adaptador universal;
- un polinucleótido adaptador 5' que es de cadena única y que comprende una secuencia 3' que es idéntica a una porción 3' de la secuencia de adaptador universal, en el que el polinucleótido adaptador 5' comprende
- 50 además una porción 5' que no está presente en la secuencia de adaptador universal; una enzima con actividad endonucleasa de aleta 5' para escindir cualquier base restante del cebador universal; y una ligasa para ligar el segundo oligonucleótido del polinucleótido adaptador 3' a un extremo 3' de un amplicón específico-objetivo y para ligar el polinucleótido adaptador 5' a un extremo 5' del amplicón específico-objetivo.

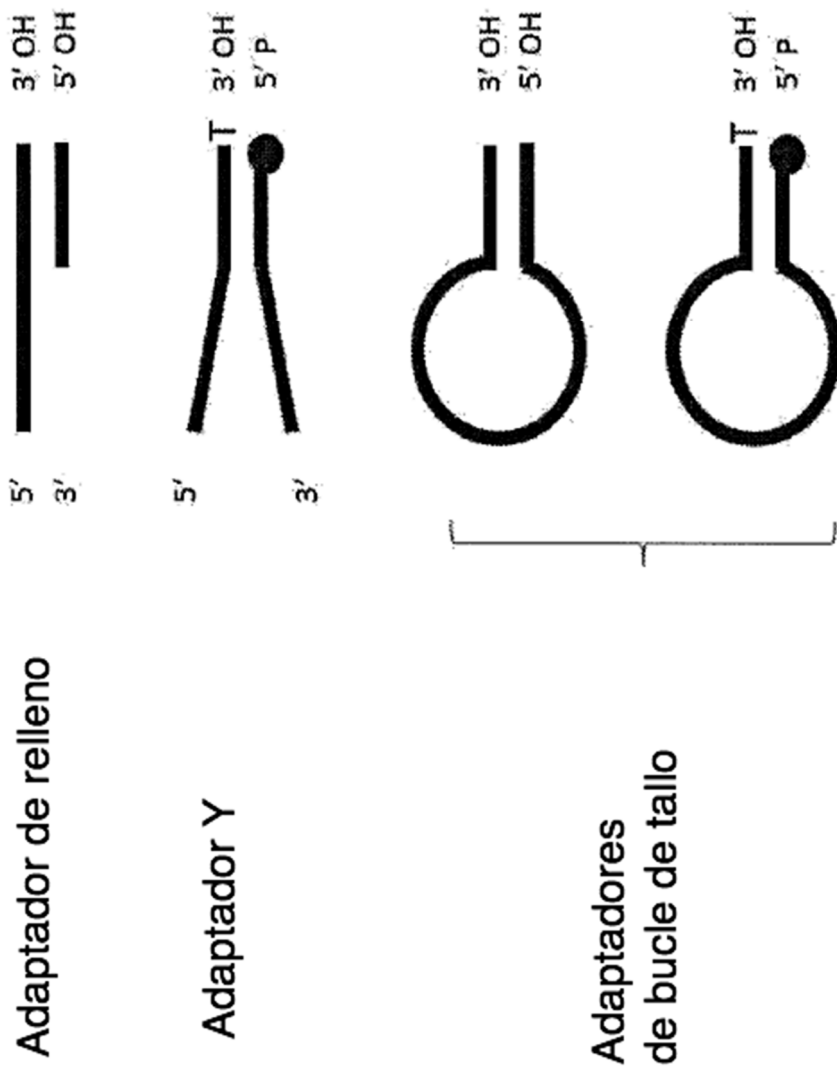


FIG. 1

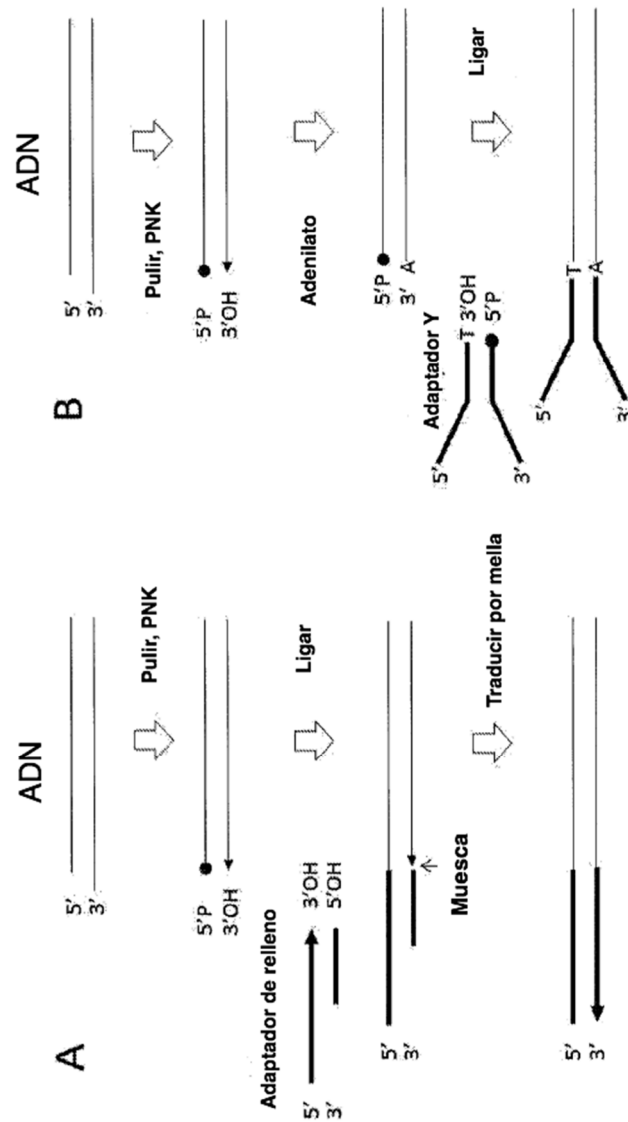
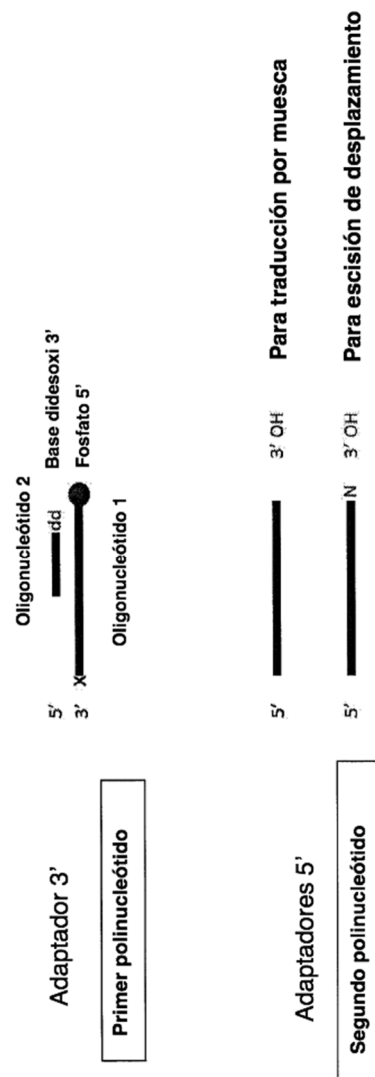


FIG. 2



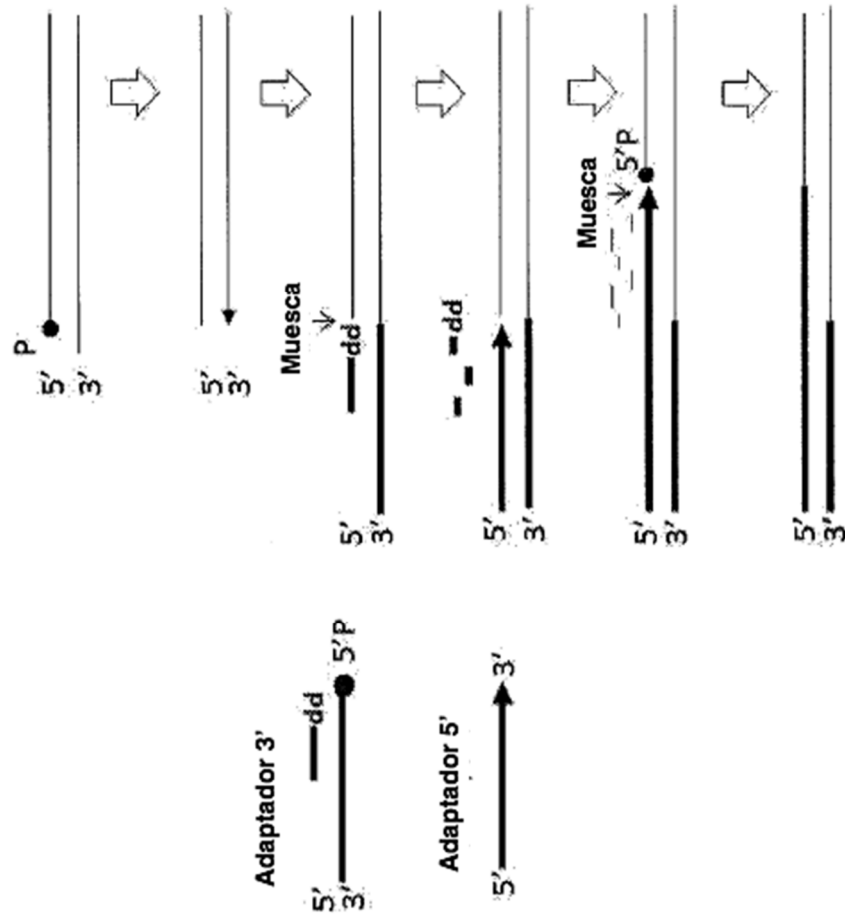


FIG. 4

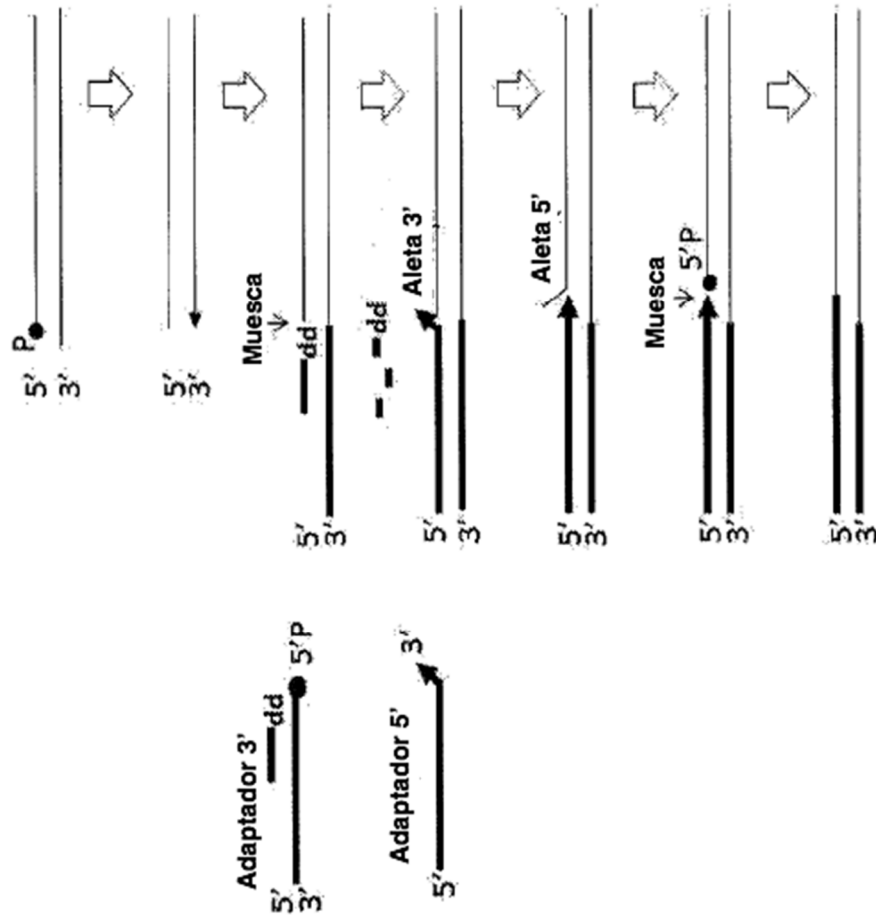


FIG. 5

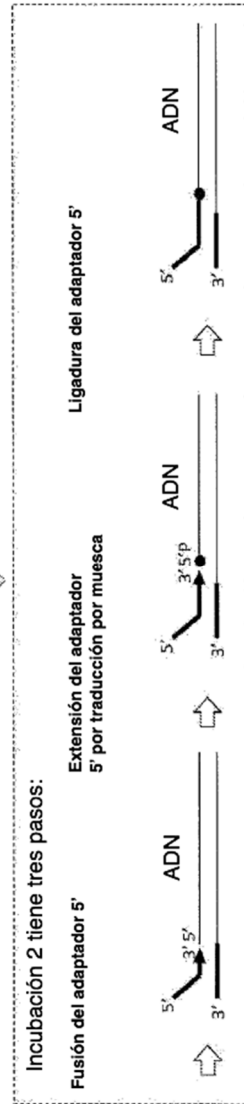
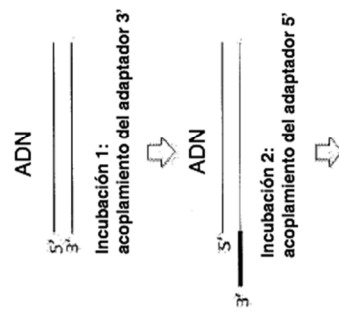


FIG. 6A

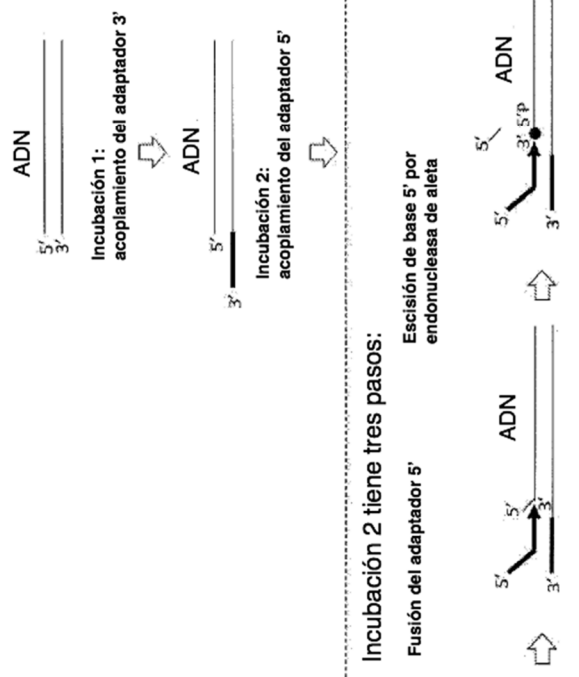
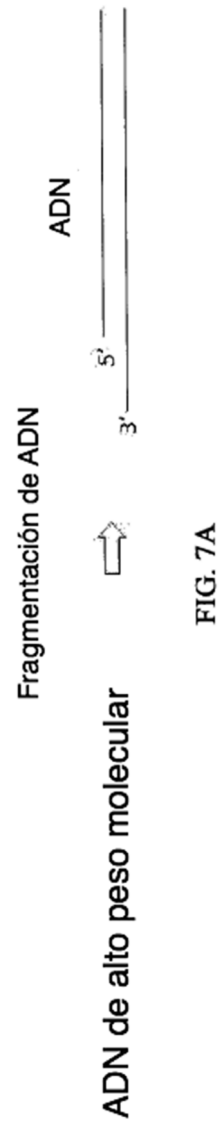


FIG. 6B



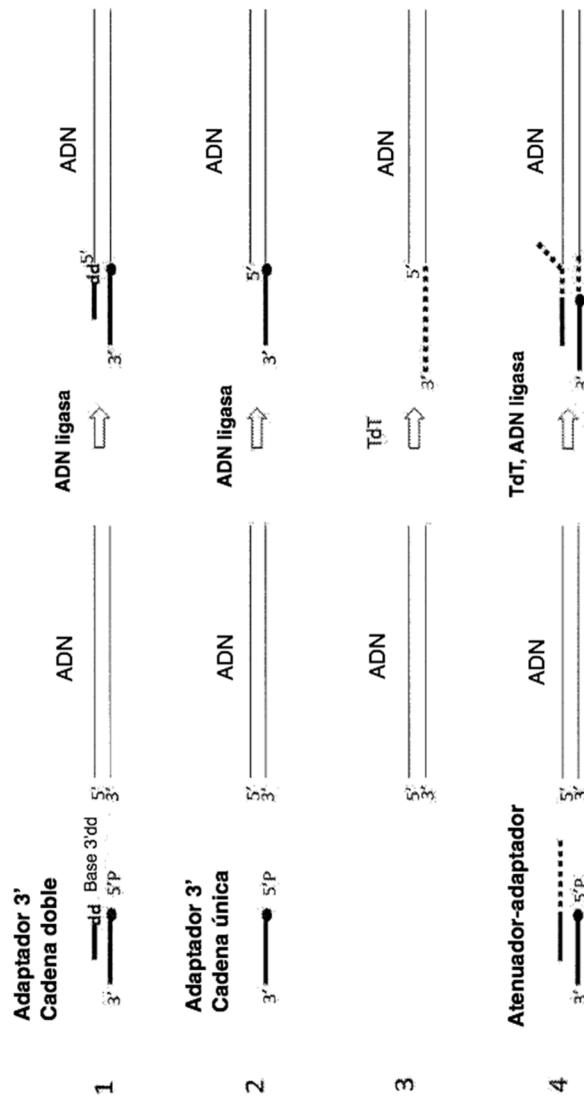


FIG. 7B

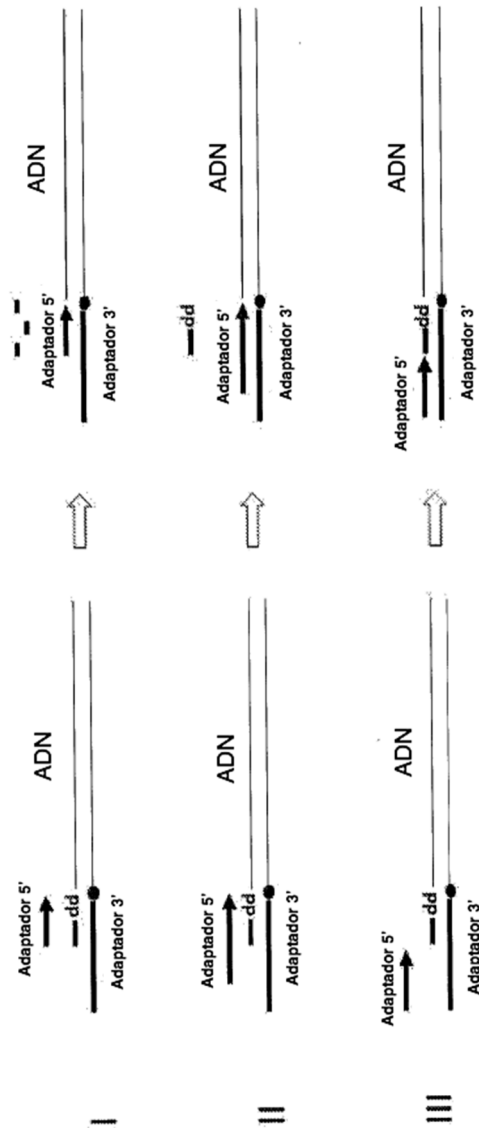


FIG. 8A

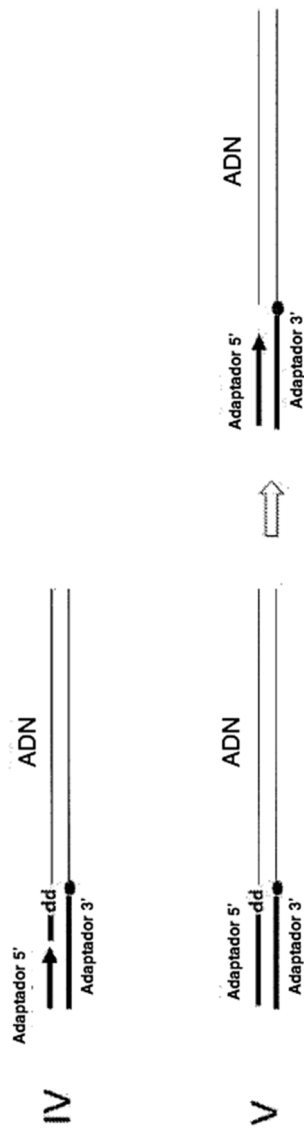


FIG. 8B

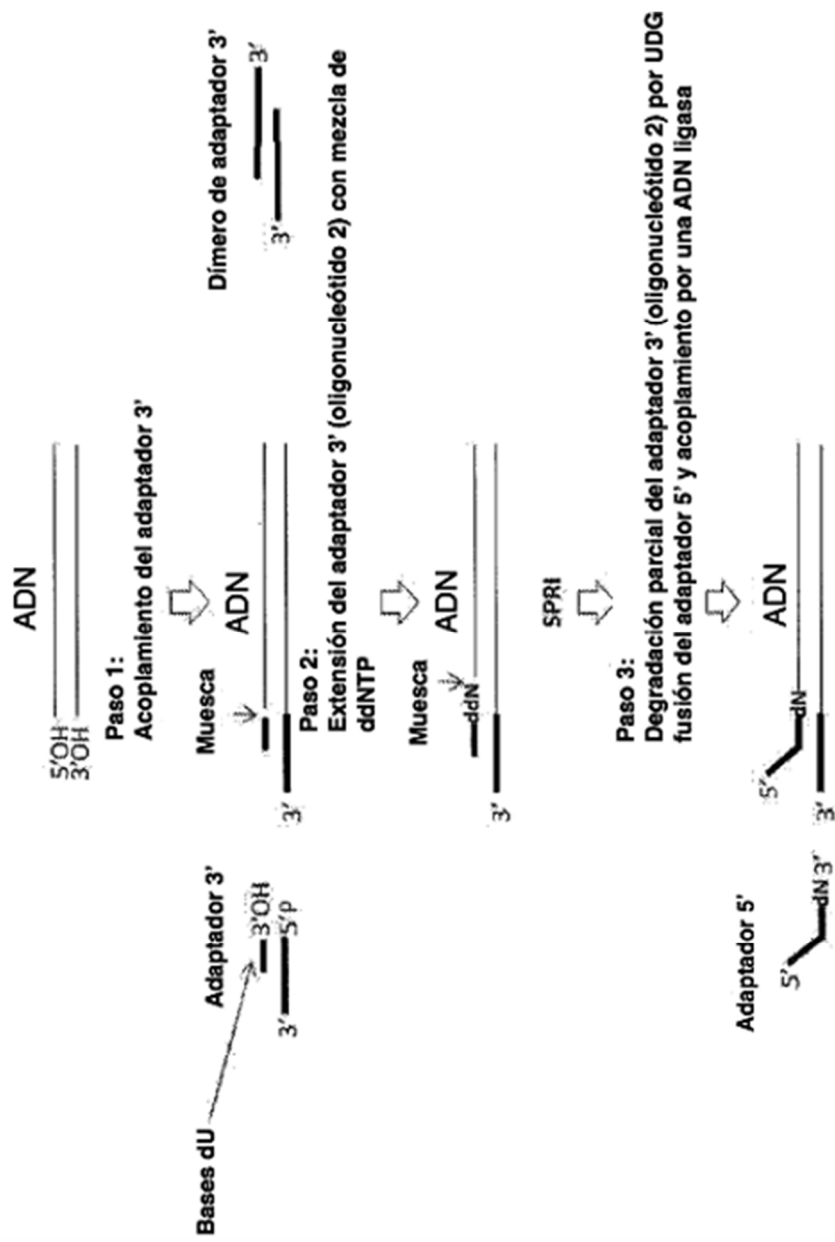


FIG. 9A

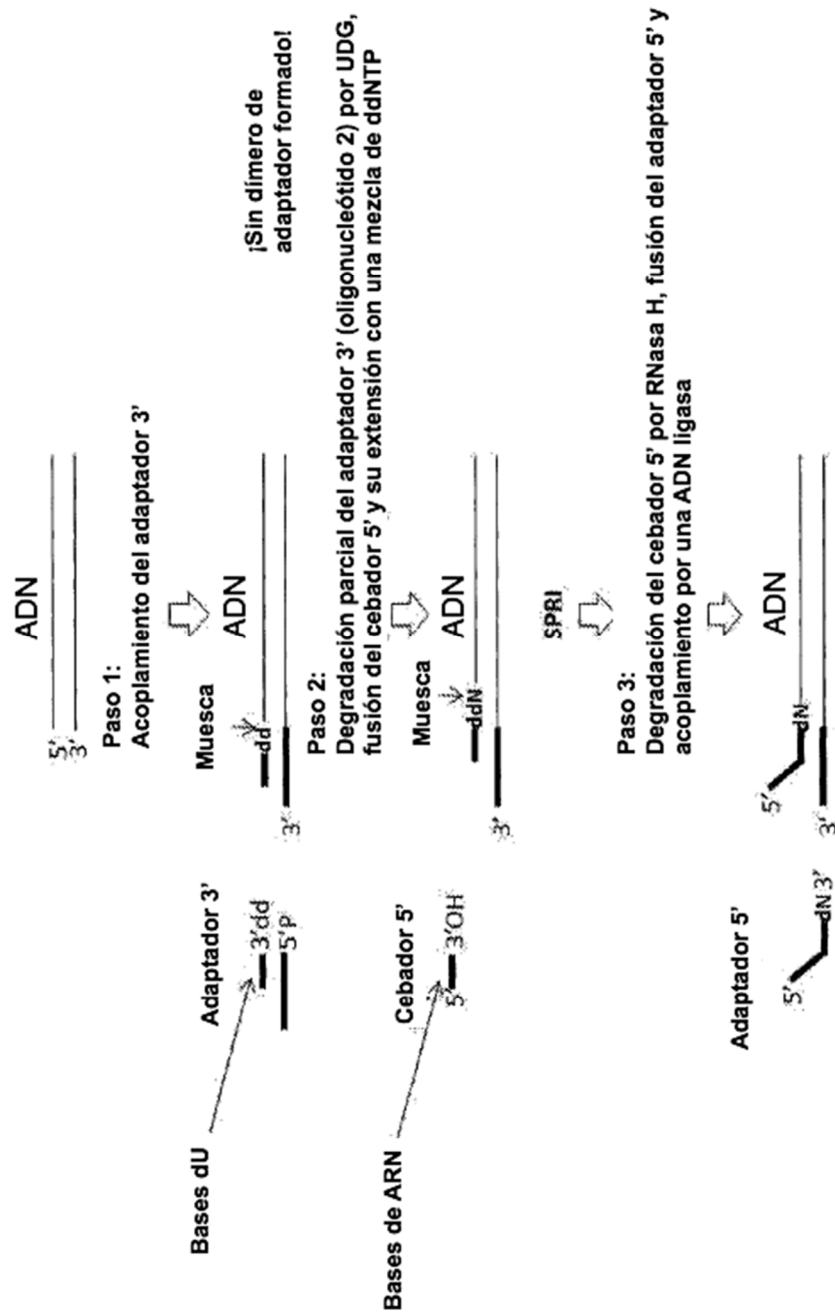


FIG. 9B

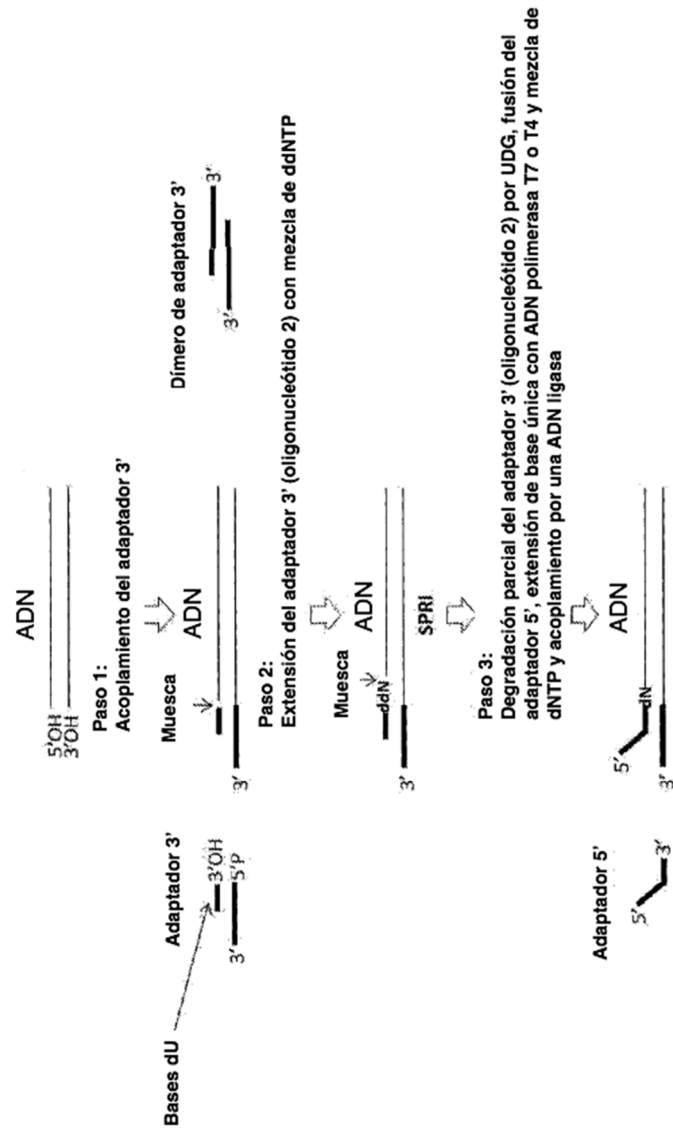


FIG. 9C

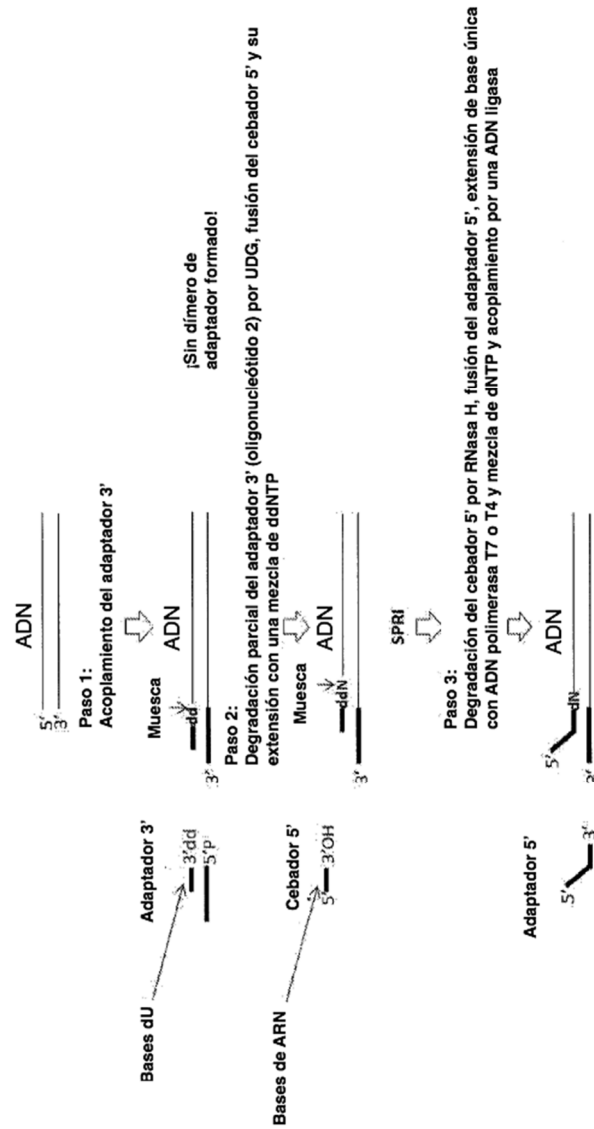


FIG. 9D

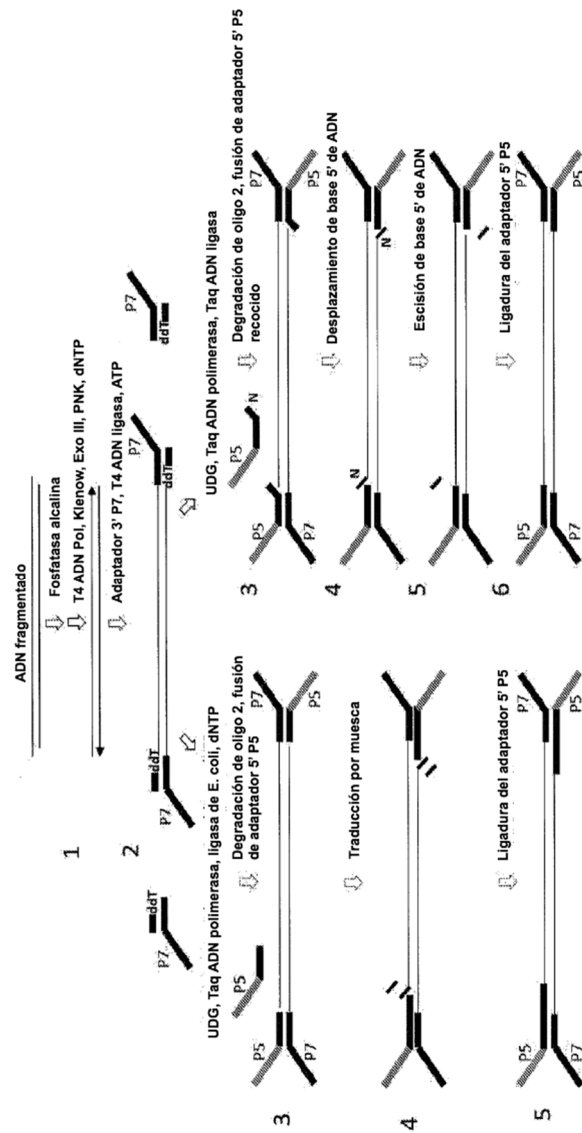


FIG. 10A

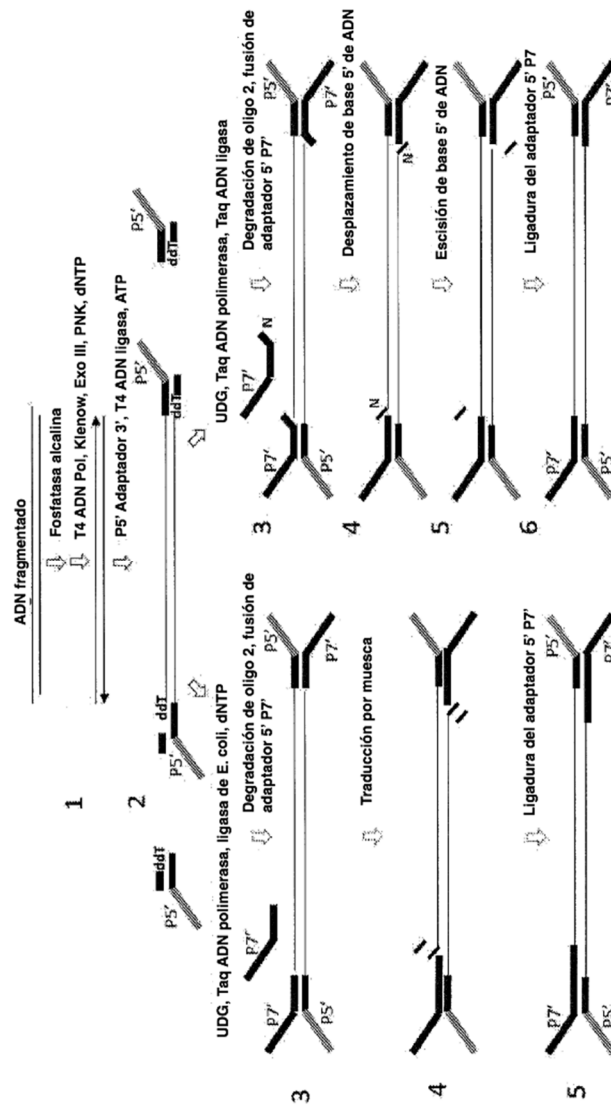


FIG. 10B

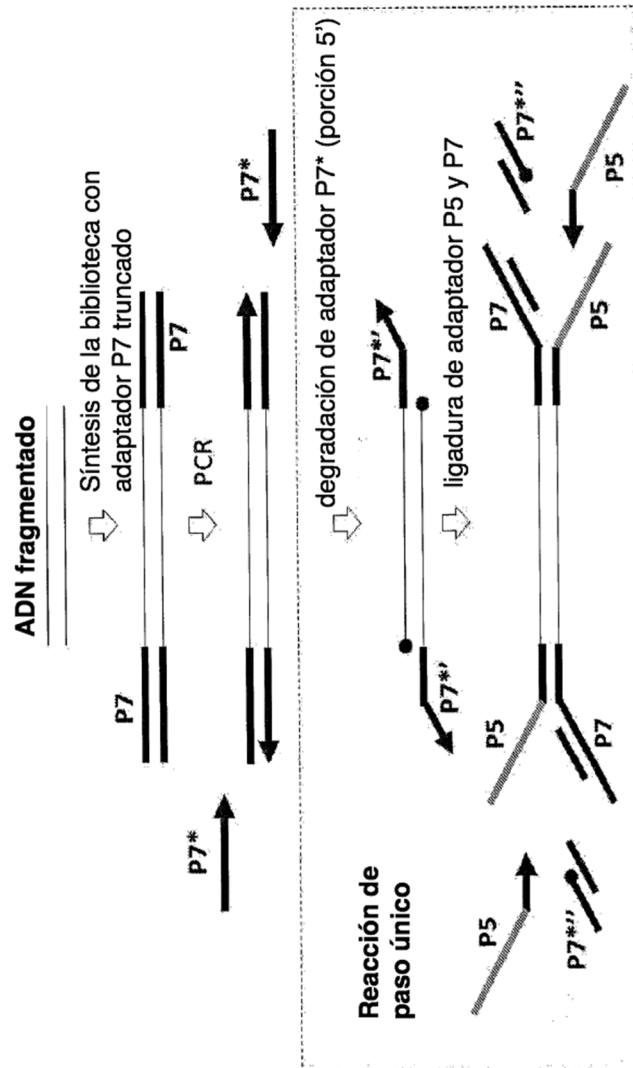


FIG. 11

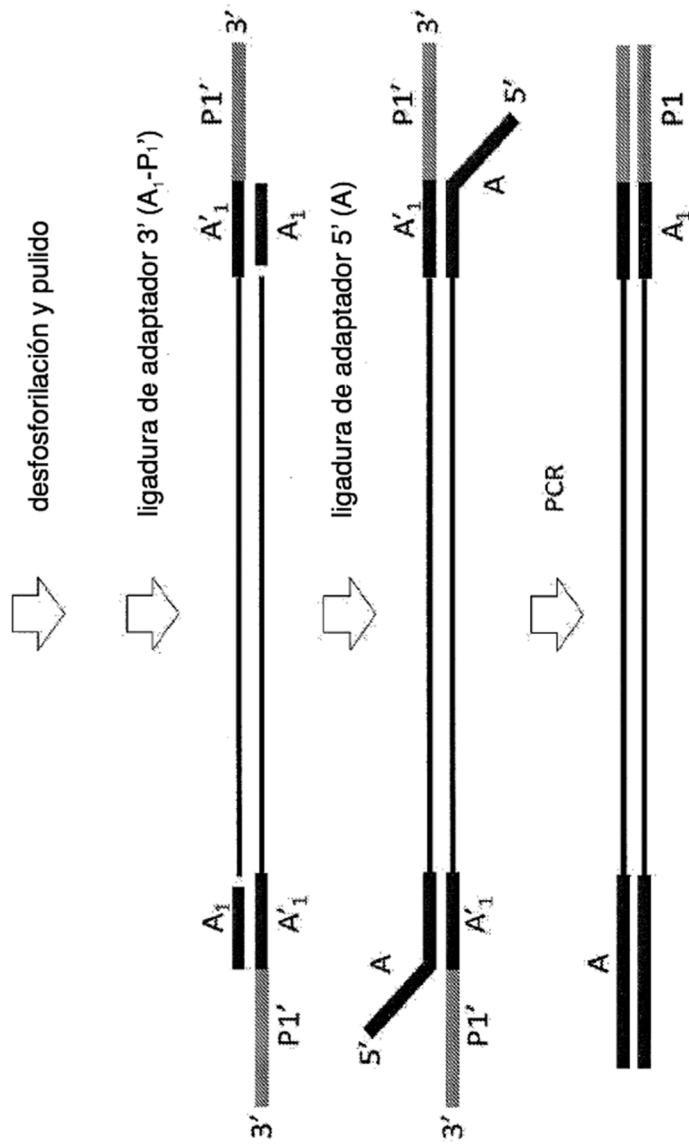


FIG. 12A

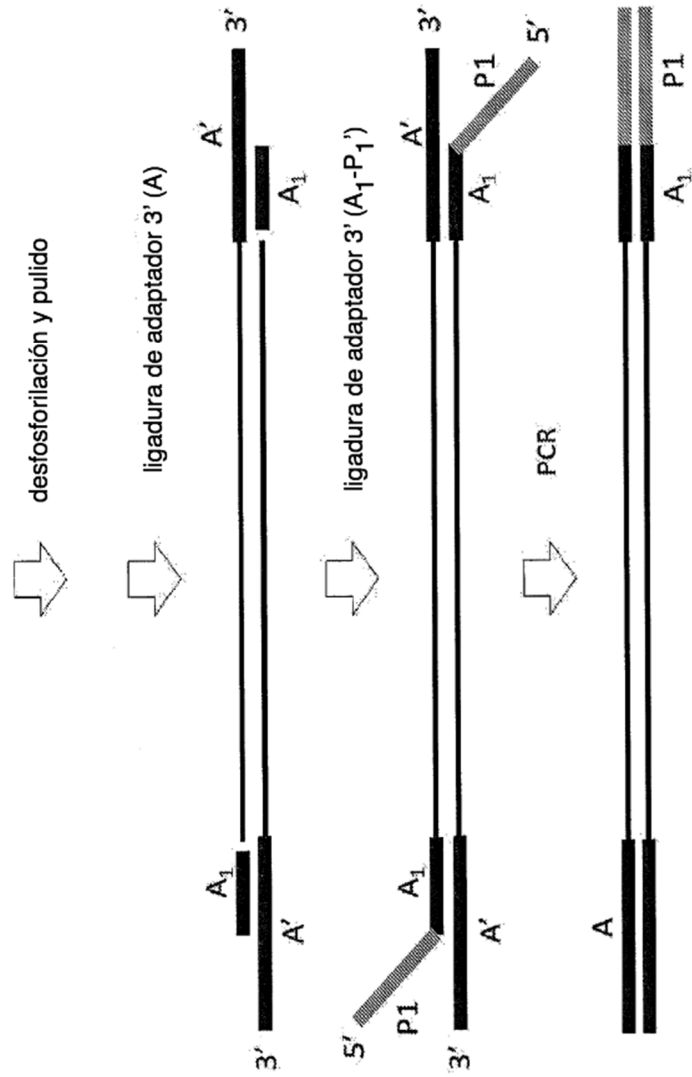


FIG. 12B

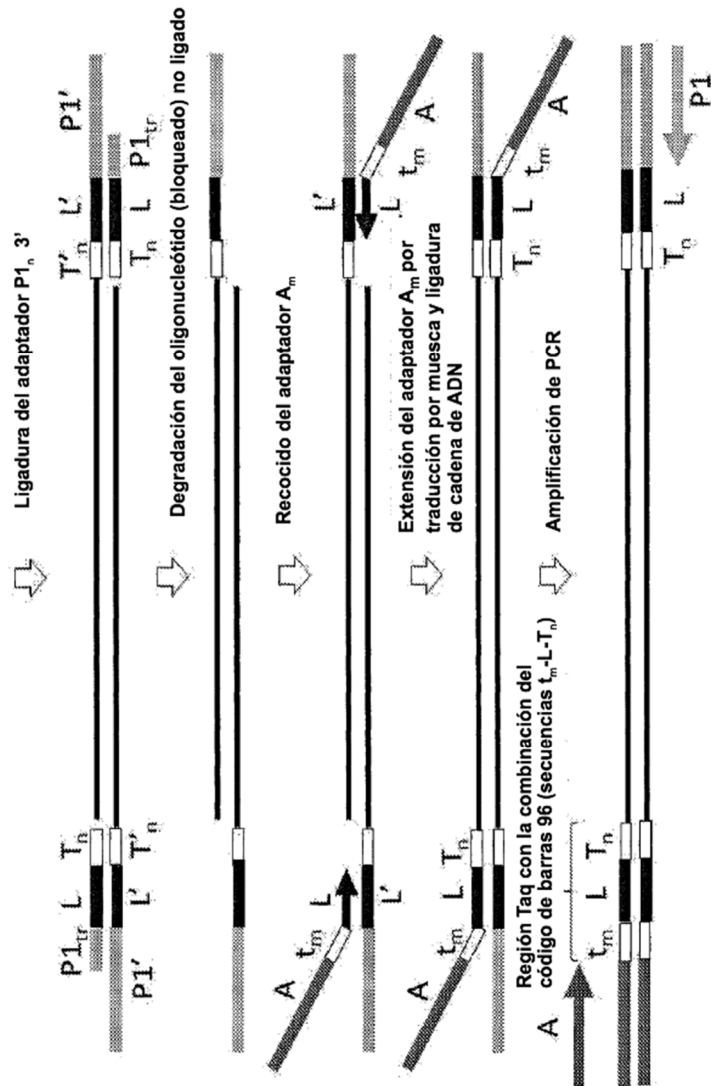


FIG. 13A

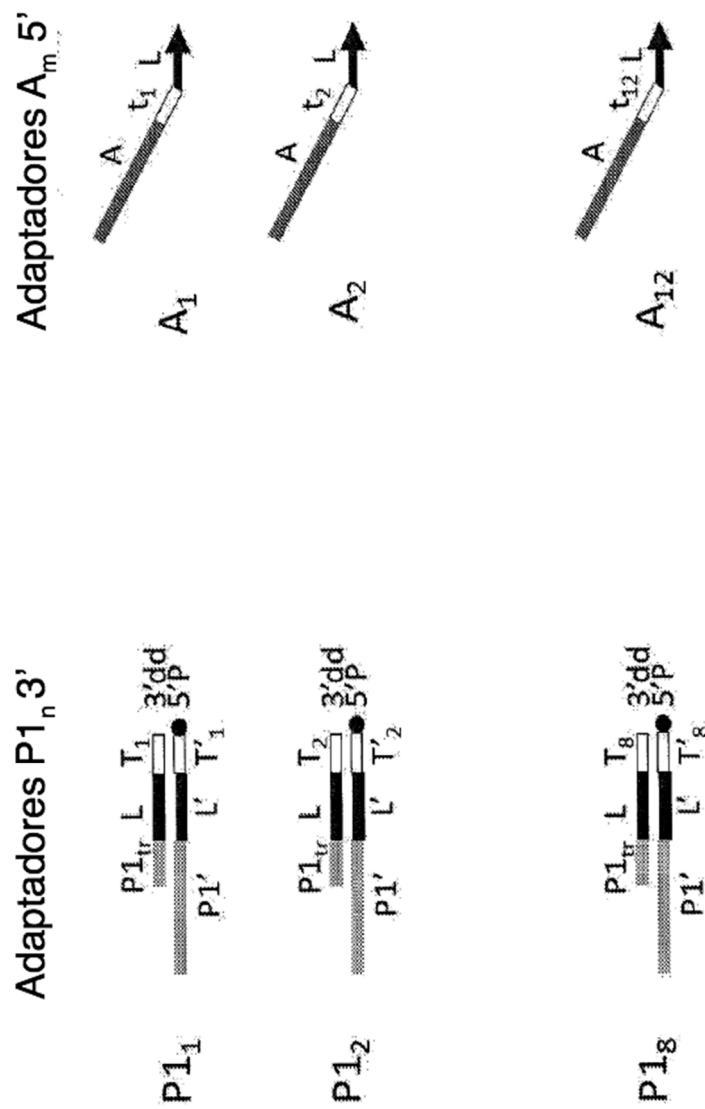


FIG. 13B

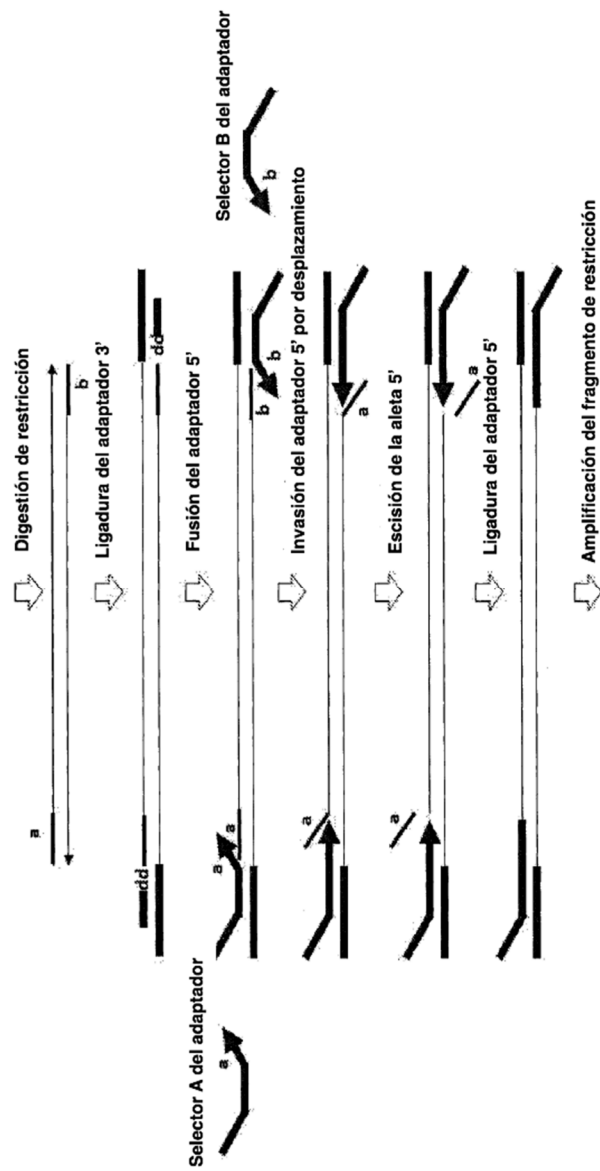


FIG. 14

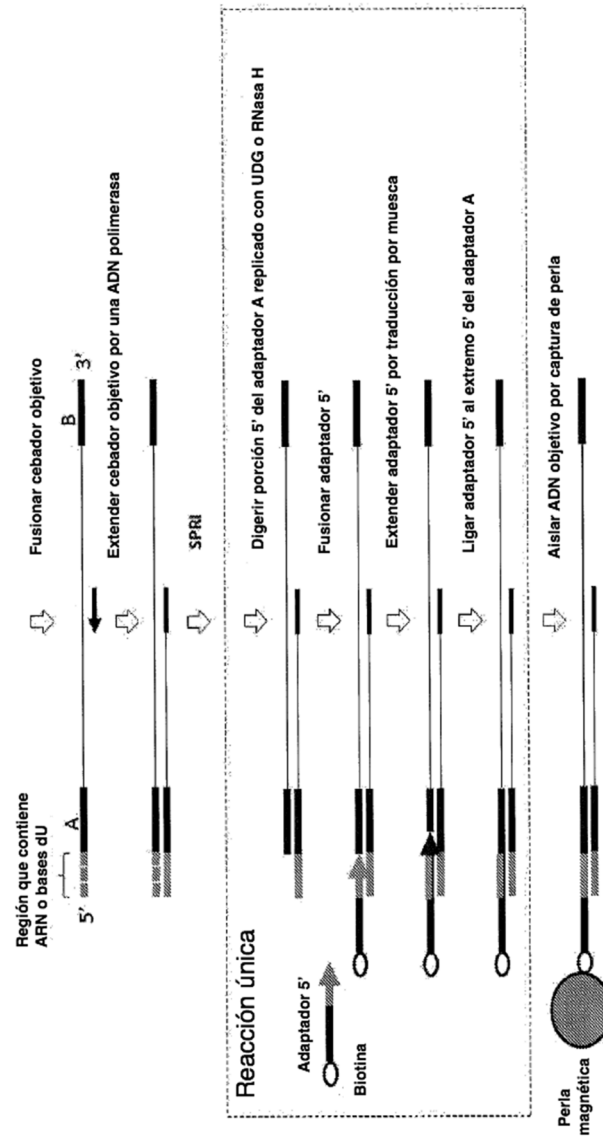


FIG. 15A

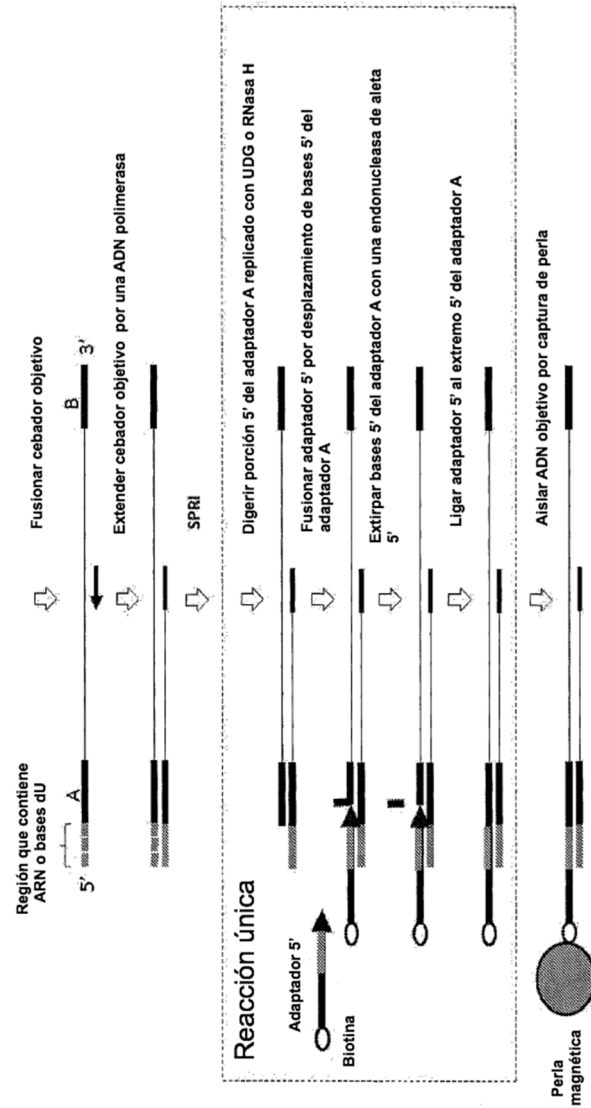


FIG. 15B

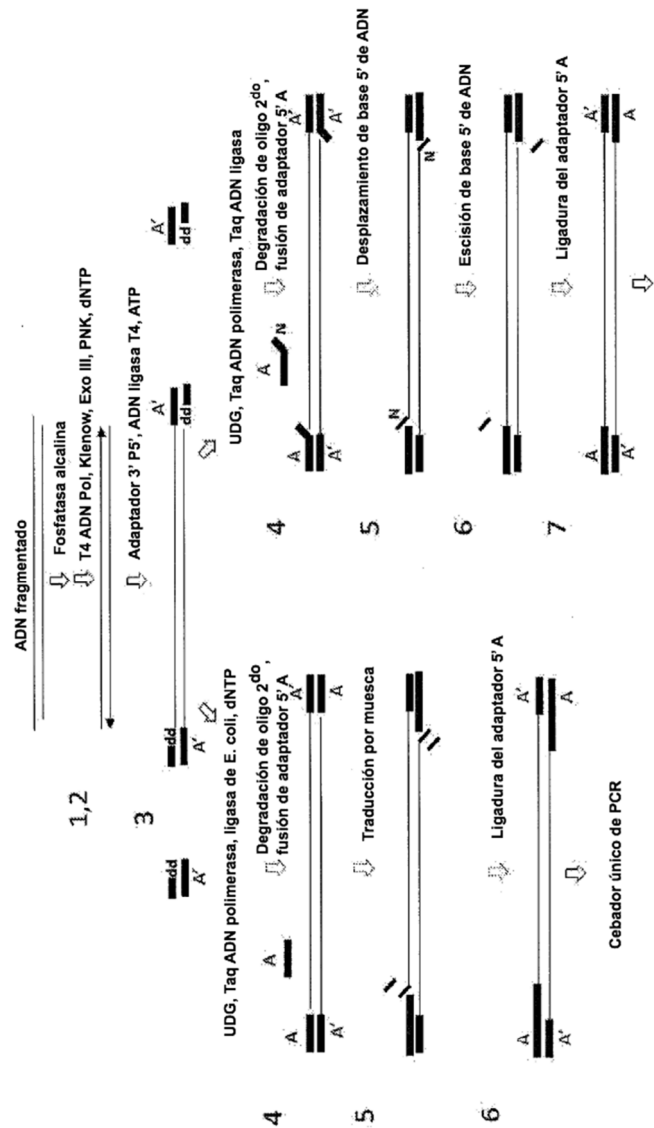
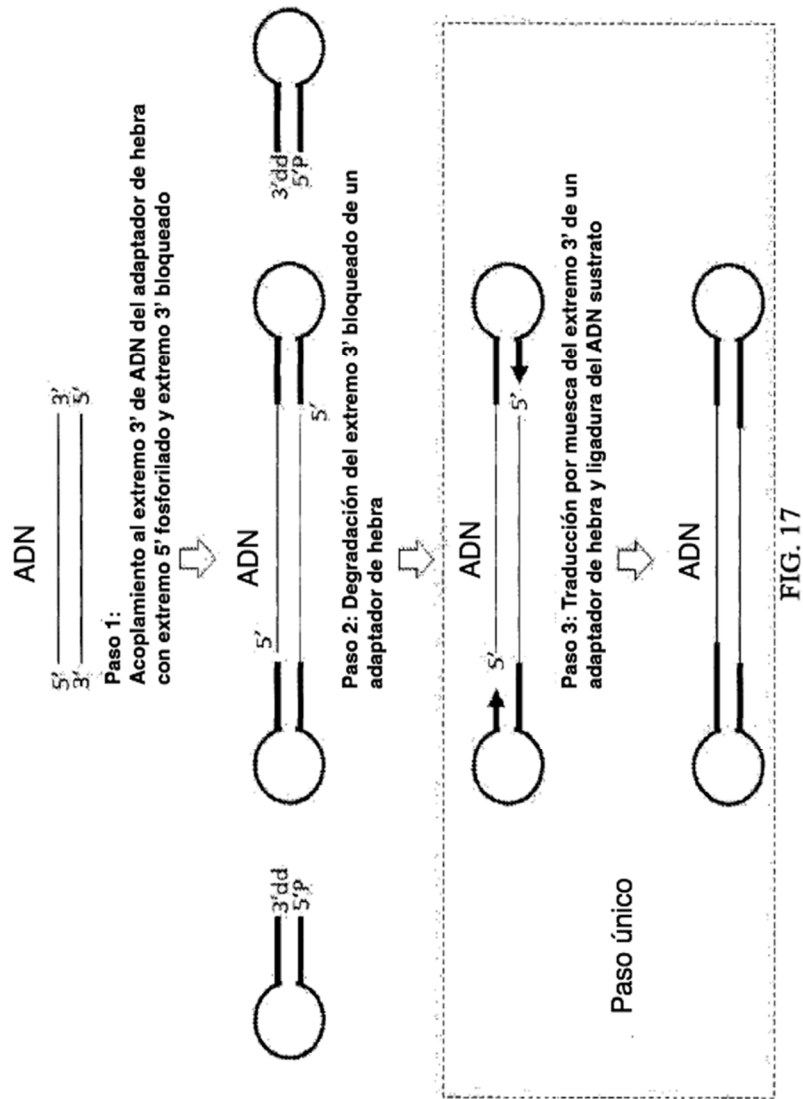


FIG. 16



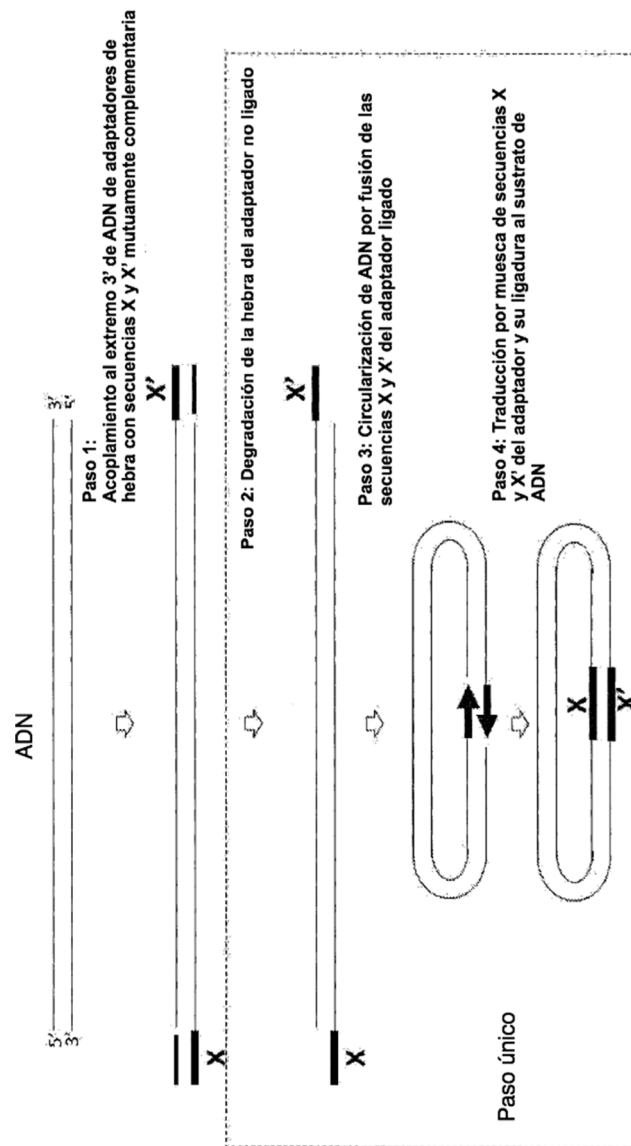


FIG. 18

Carril:												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Adaptador de relleno (pmoles)	20	200	20									
Opción 1 del adaptador 3' (pmoles)				20	200	20	200					
Opción 2 del adaptador 3' (pmoles)								20	200	20	200	20
Construido A de sustrato de FAM (pmoles)	10	10	10									
Construido B de sustrato de FAM (pmoles)				10	10			10	10			10
Construido C de sustrato de FAM (pmoles)						10	10			10	10	
T4ADN ligasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

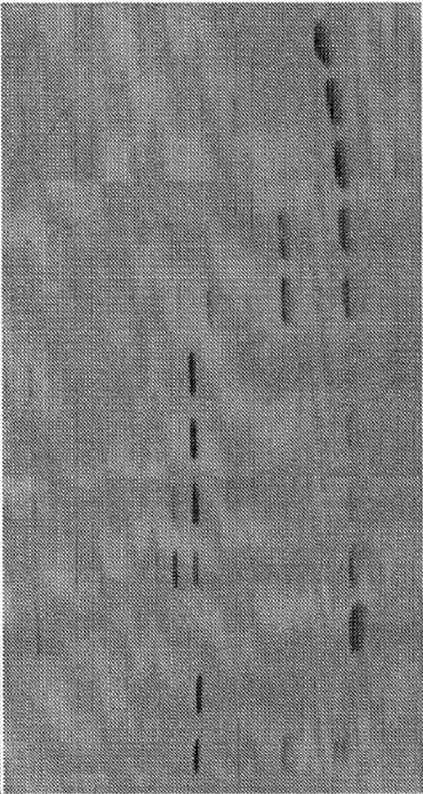


FIG. 19

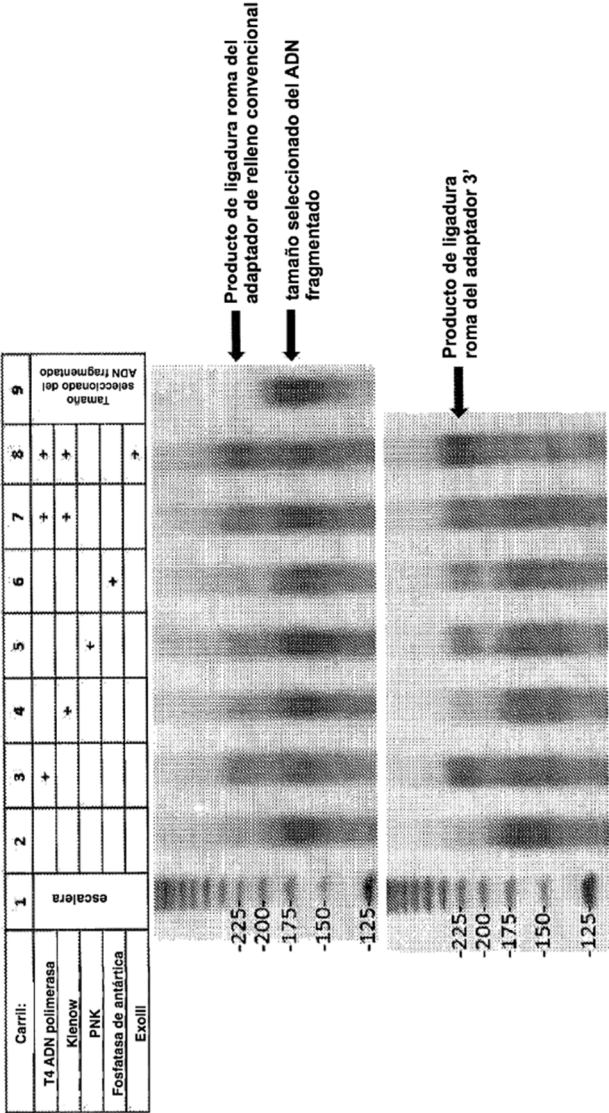


FIG. 20

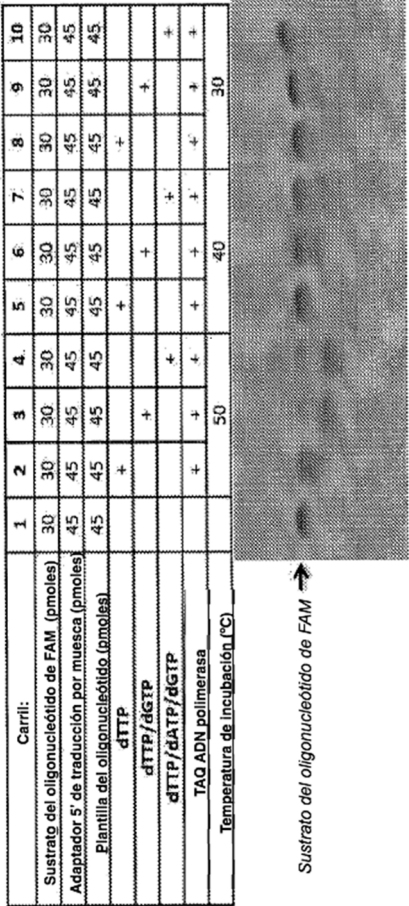


FIG. 21A

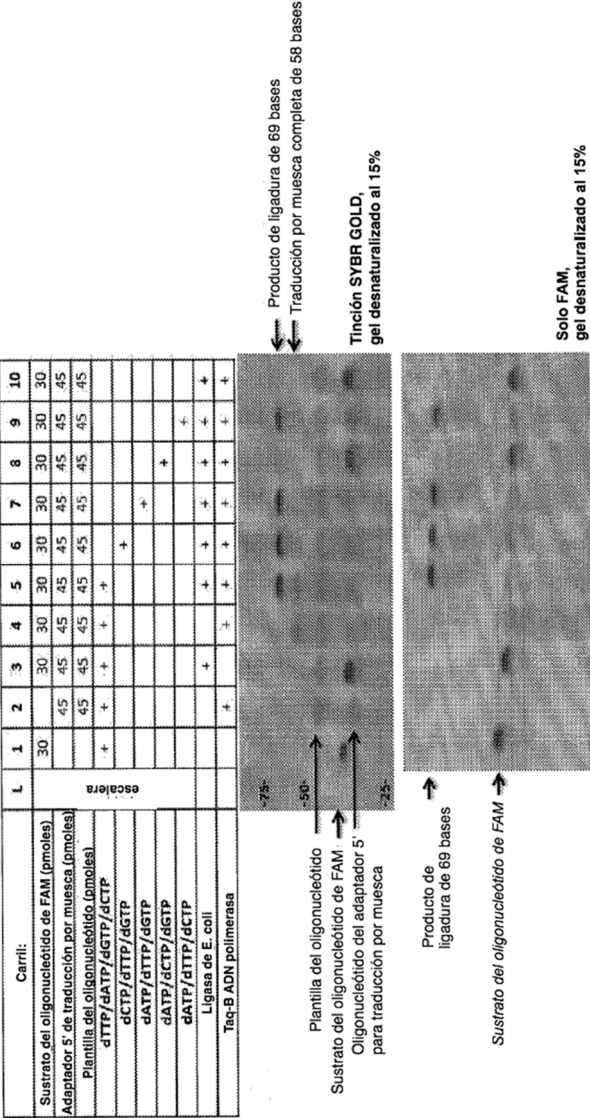


FIG. 22

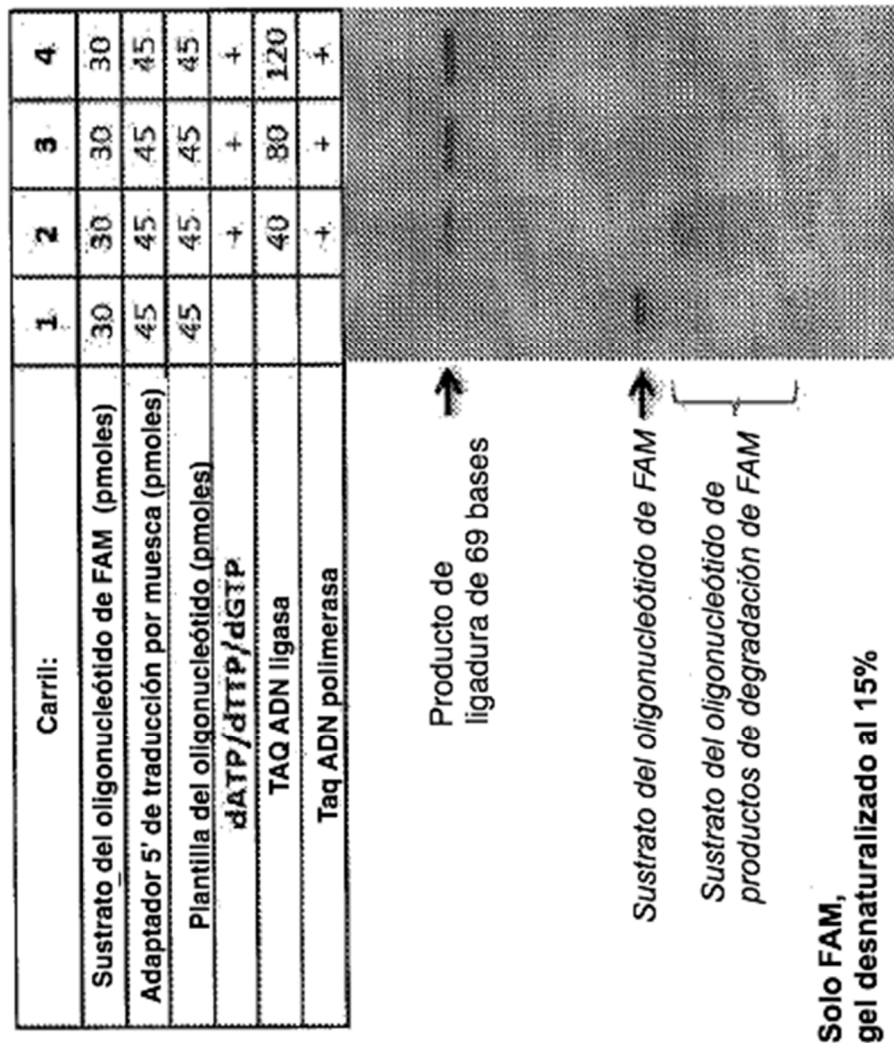


FIG. 23B

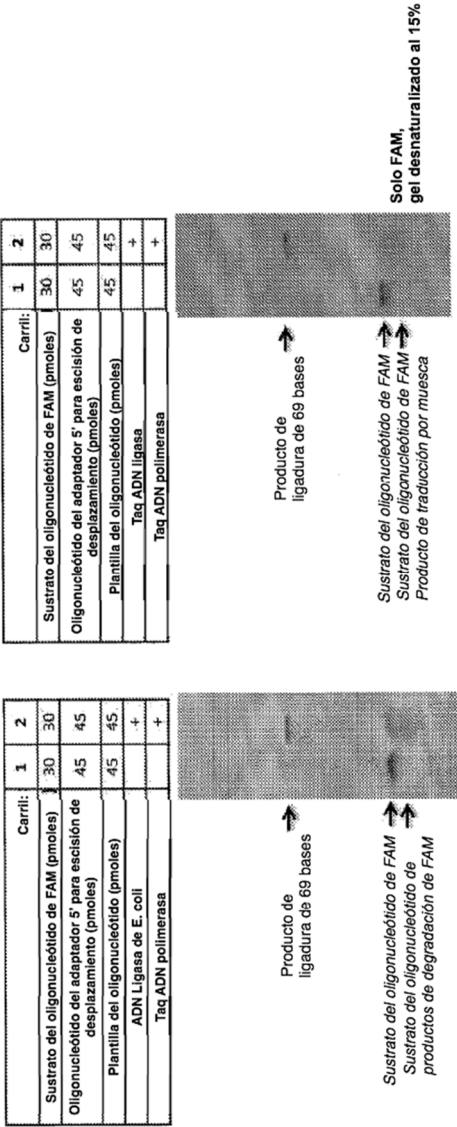


FIG. 24

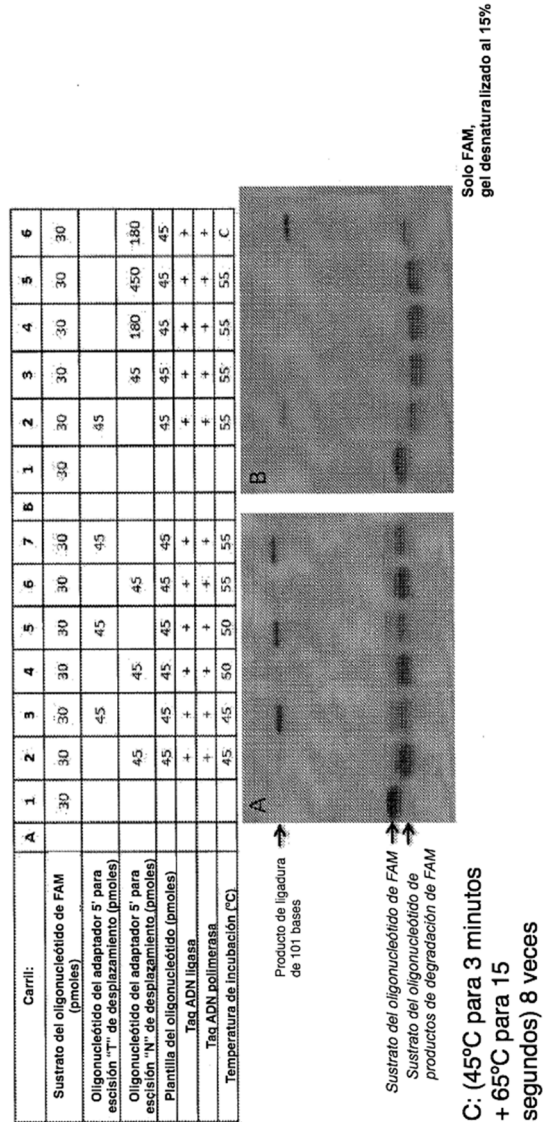


FIG. 25

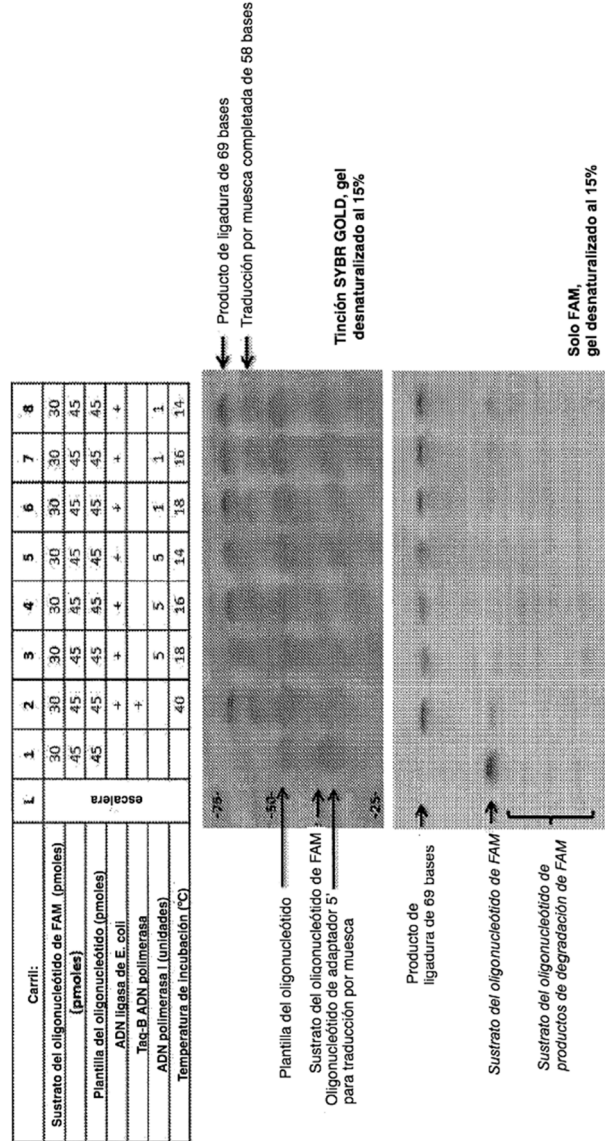


FIG. 26

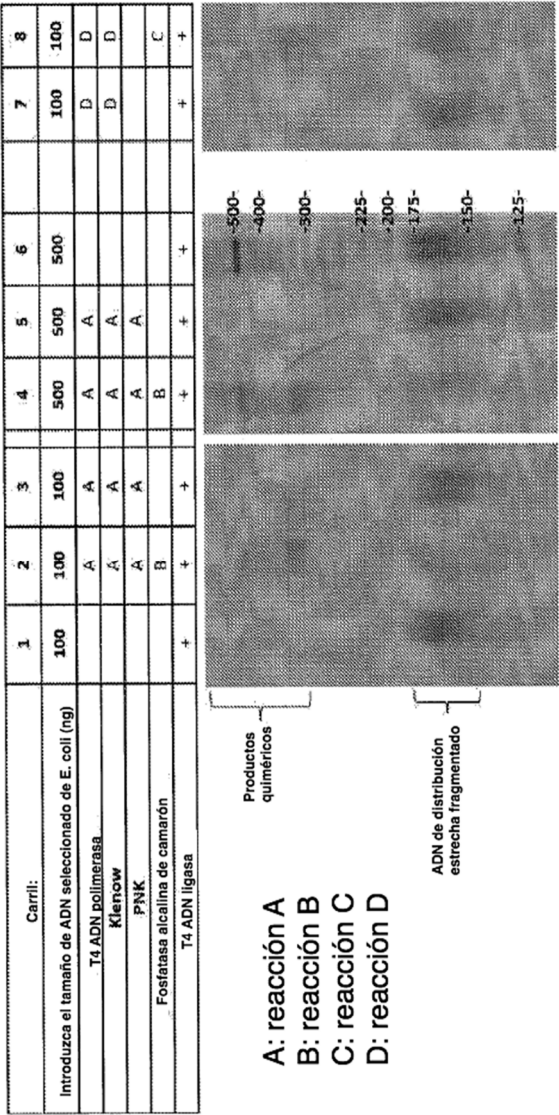


FIG. 27

Carril:	1	2	3	4	5
Adaptador 5' para traducción por muestra	+	+		+	
Adaptador 5' para escisión de desplazamiento					+
dTTP/dATP/dGTP/dCTP		+			
dATP/dTTP/dGTP					
UDG			+	+	+
Taq ADN polimerasa	+	+	+	+	+
ADN ligasa de E. coli	+	+	+	+	+
T4 ADN ligasa				+	+
Temperatura de incubación (°C)	40	40	40	45	C

C: (45°C para 45 segundos + 65°C para 5 segundos) 30 ciclos

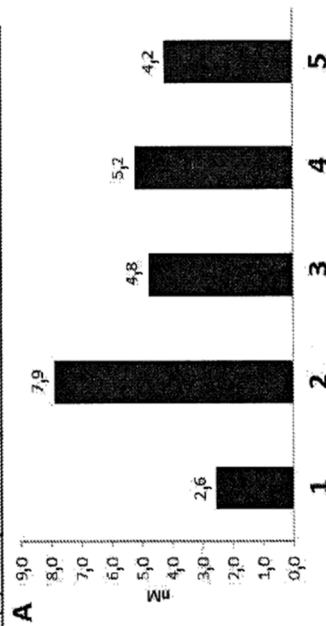


FIG. 28A

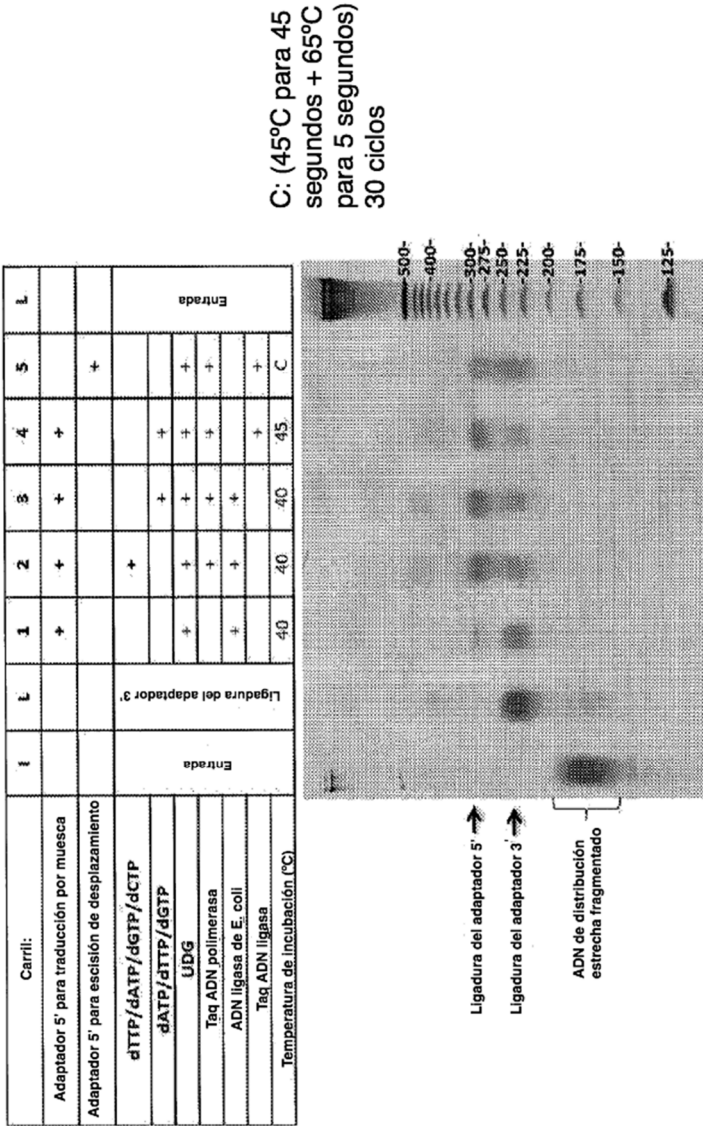
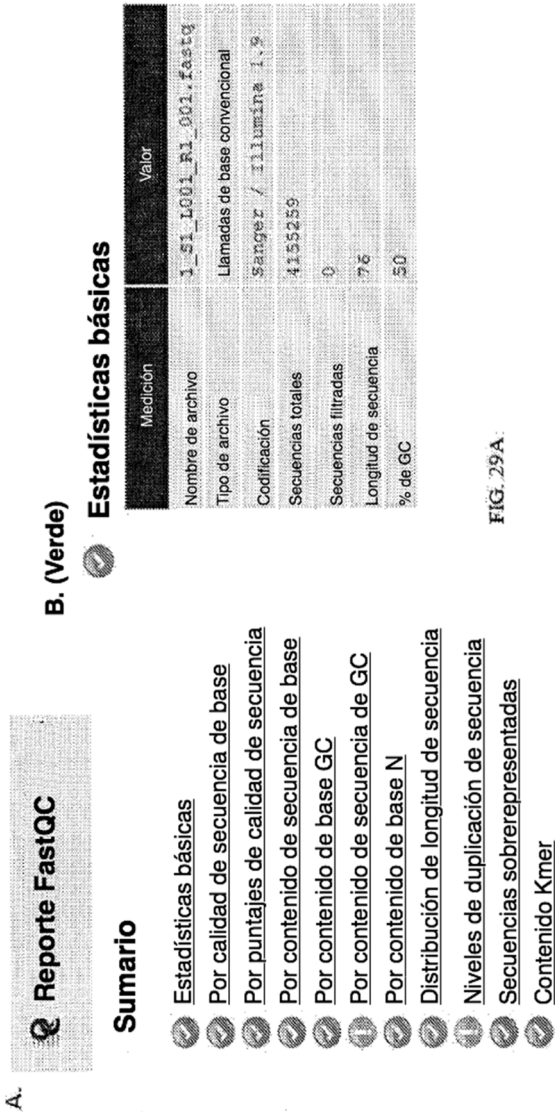


FIG. 28B



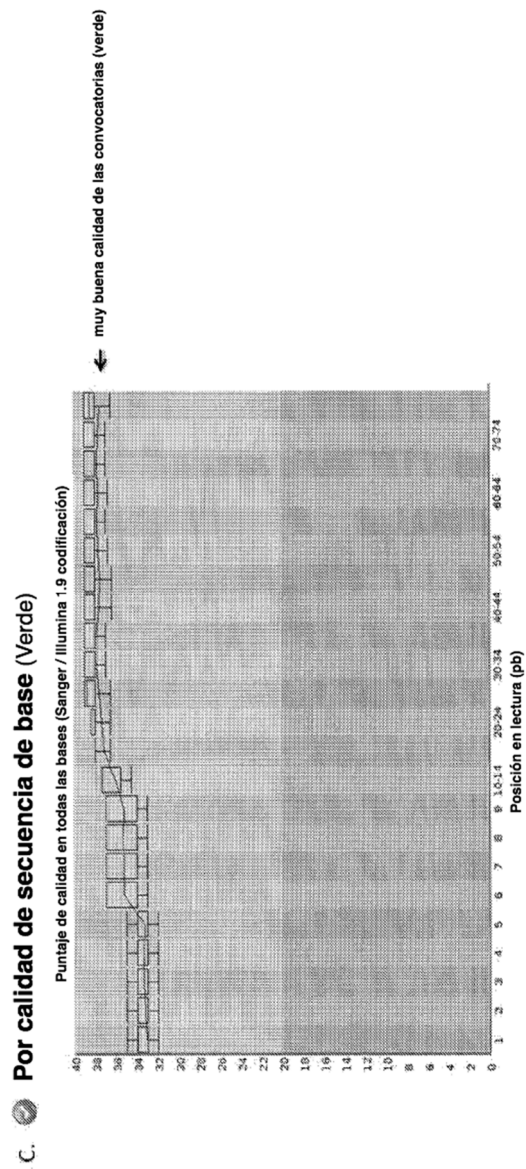


FIG. 29A (CONTINUACIÓN)

D.  **Por contenido de secuencia de base (Verde)**

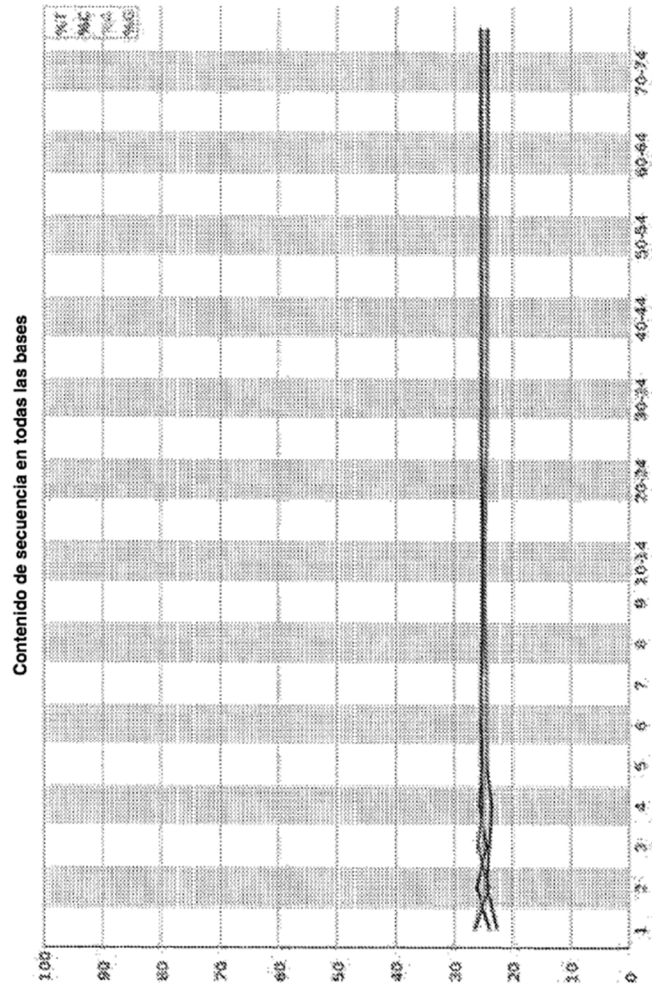


FIG. 29B

E. **Por contenido de base GC (Verde)**

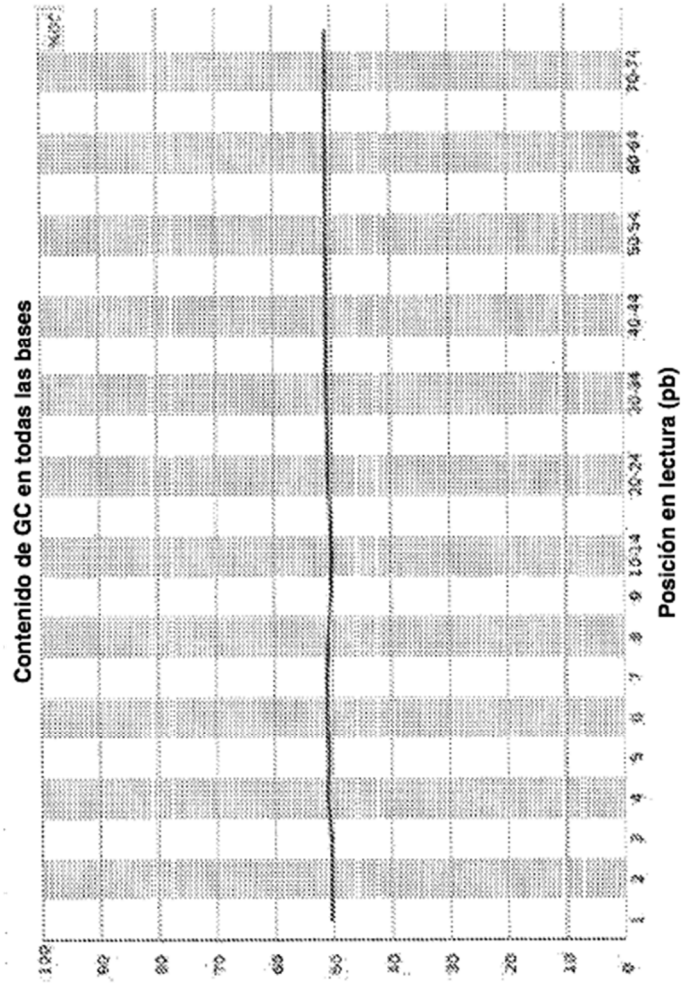


FIG. 29B (CONTINUACIÓN)

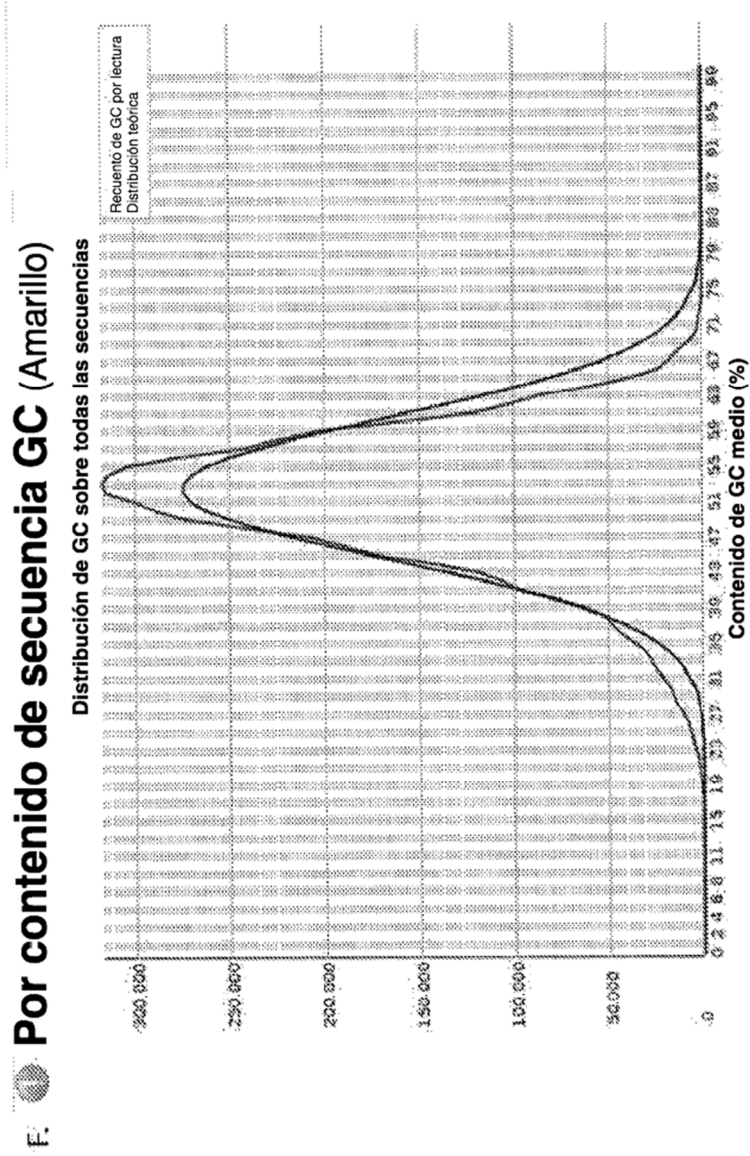


FIG. 29B (CONTINUACIÓN)

G.  **Niveles de duplicación de secuencia (Amarillo)**

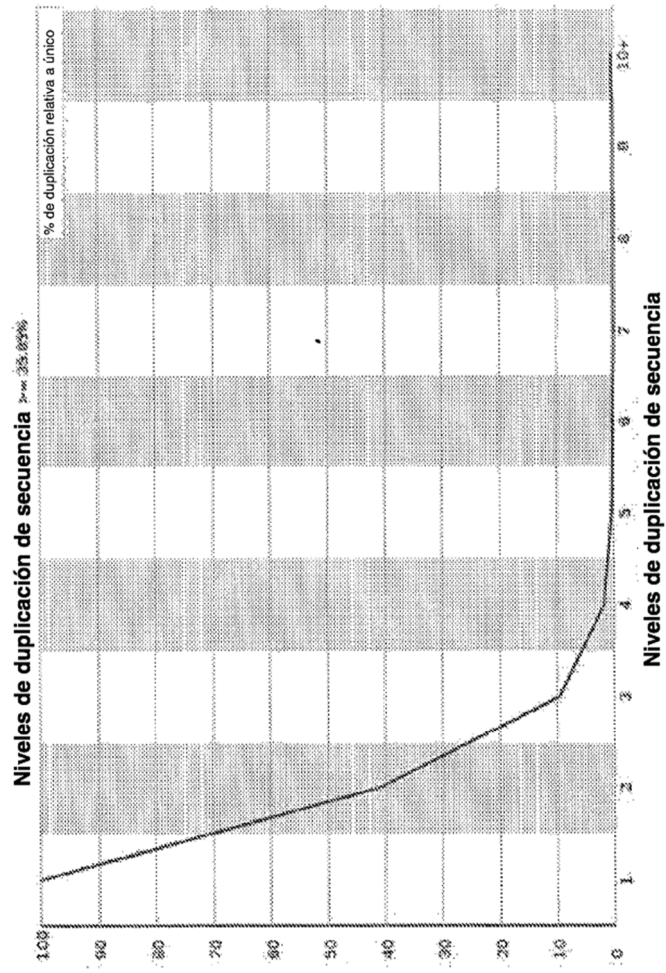


FIG. 29B (CONTINUACIÓN)

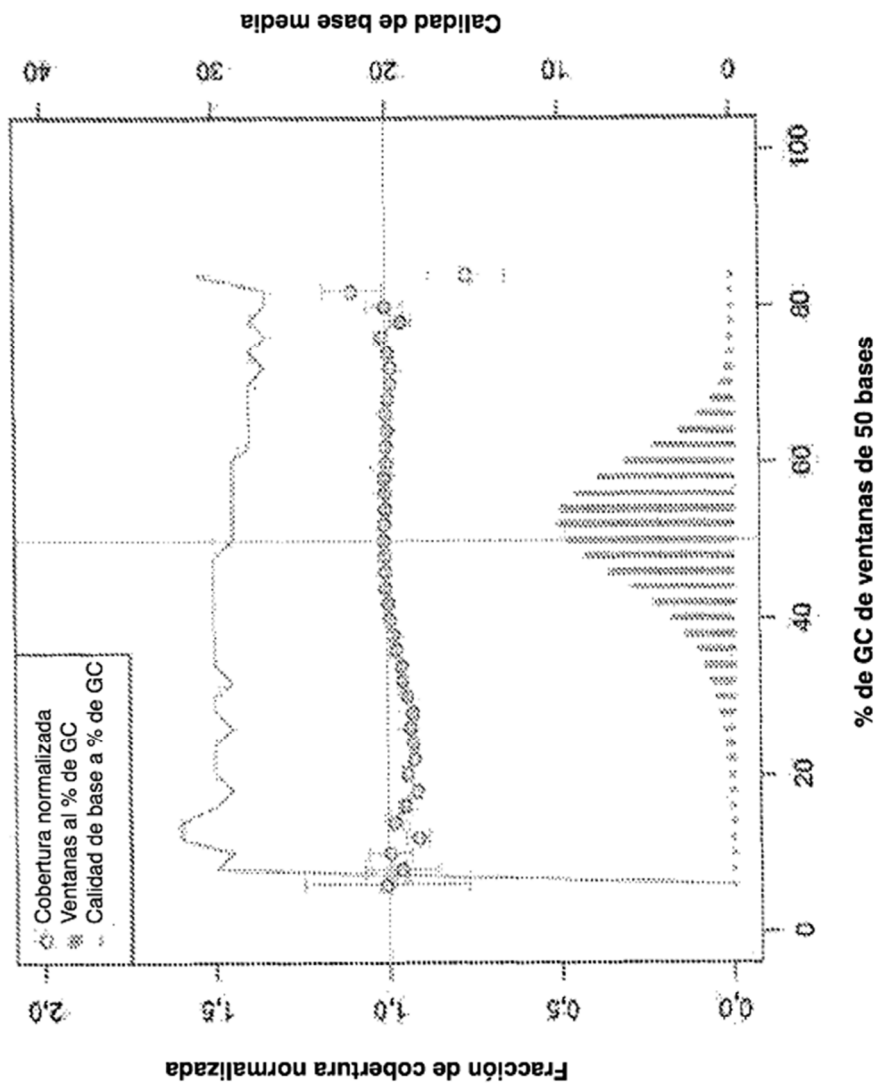


FIG. 29C



FIG. 33

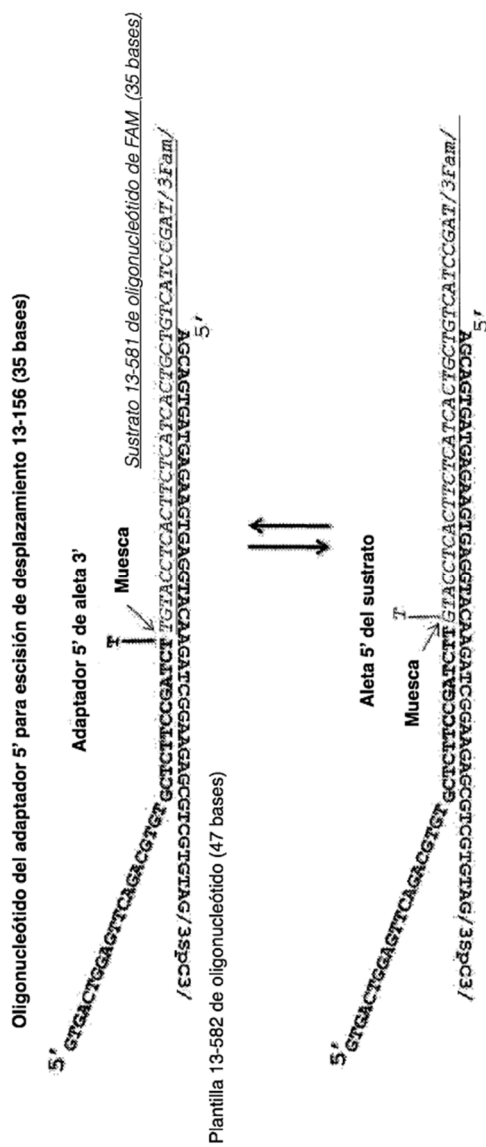


FIG. 34

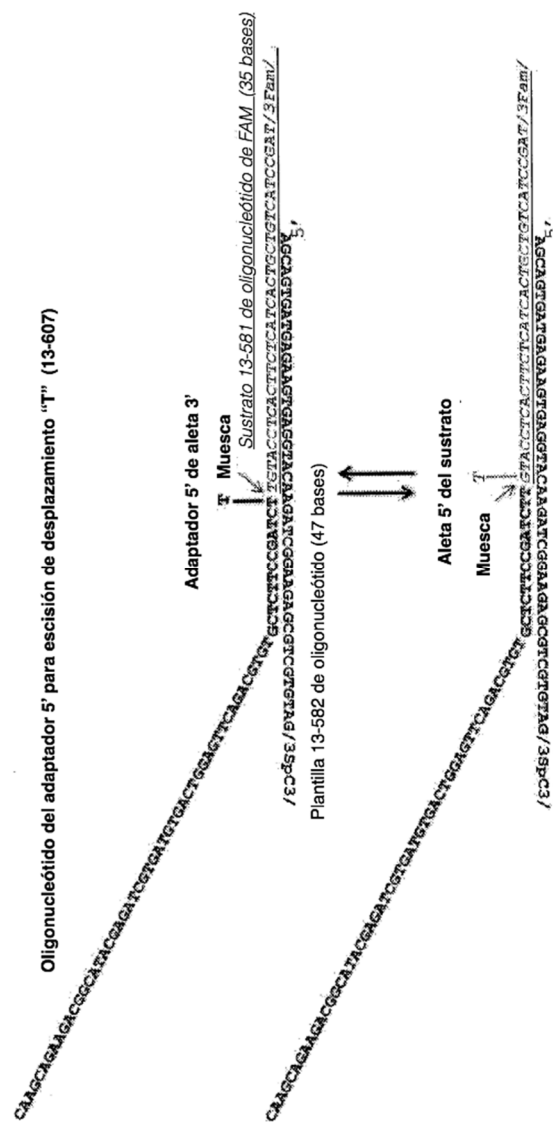
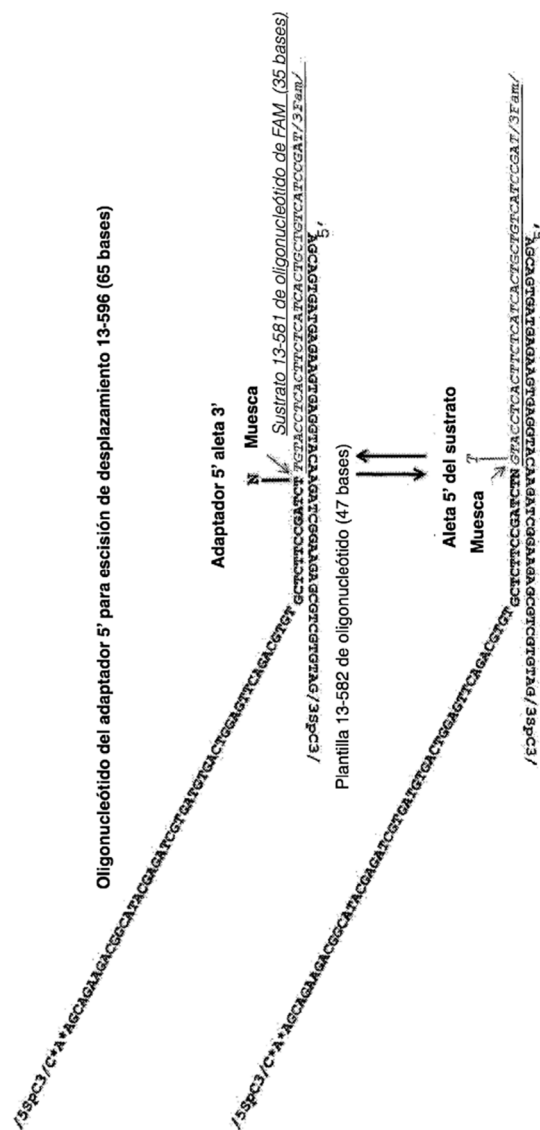


FIG. 35



Adaptador 3'; 1^{er} oligonucleótido 13-501

5
AGACGGGCGCCTTCGCATCCdT
/SPHOS/AGATCGGAAGSCACACGTCTTGAACTCCAGTCACATCACGATCTGTAATCCGTTCTTCTGCT**G/SSPDC3/

Adaptador 3'; 2^{do} oligonucleótido 13-712

“Adaptadores P5”

Oligonucleótido del adaptador 5' para traducción por muestra (13-489)

583p3/a*ATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTCCCTACAGCGCTCTTCCGATCT

Oligonucleótido del adaptador 5' para escisión de desplazamiento (13-595)

58pC3/A *A *TGAATACGGCGACCA CCGAGATCTTACACCTCTTCCCTACACGACGGCTCTTCCGATCTN²²

FIG. 37

“Adaptador P7”

Adaptador 3'; 1^{er} oligonucleótido 13-510

5' /SEHOS/AGATCGGAAGAGCACACCGTCTGAACTCCAGTCCAGGCCAAATATCTGATGCGTCTCTGCT**TG/3spc3/
TTPOLWCCOINOCCEBGGGWN

Adaptador 3'; 2^{do} oligonucleótido 13-712

“Adaptadores P5”

Oligonucleótido del adaptador 5' para traducción por muesca (13-489)

/5spc3/A*A*TGATACGGGGACCCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

FIG. 38

Preparaciones de bibliotecas de amplicones múltiplex de 3 pasos y 2 pasos que utilizan cebadores específicos-objetivo con secuencia universal, cebador universal degradable y química de fijación del adaptador NGS de 1 paso

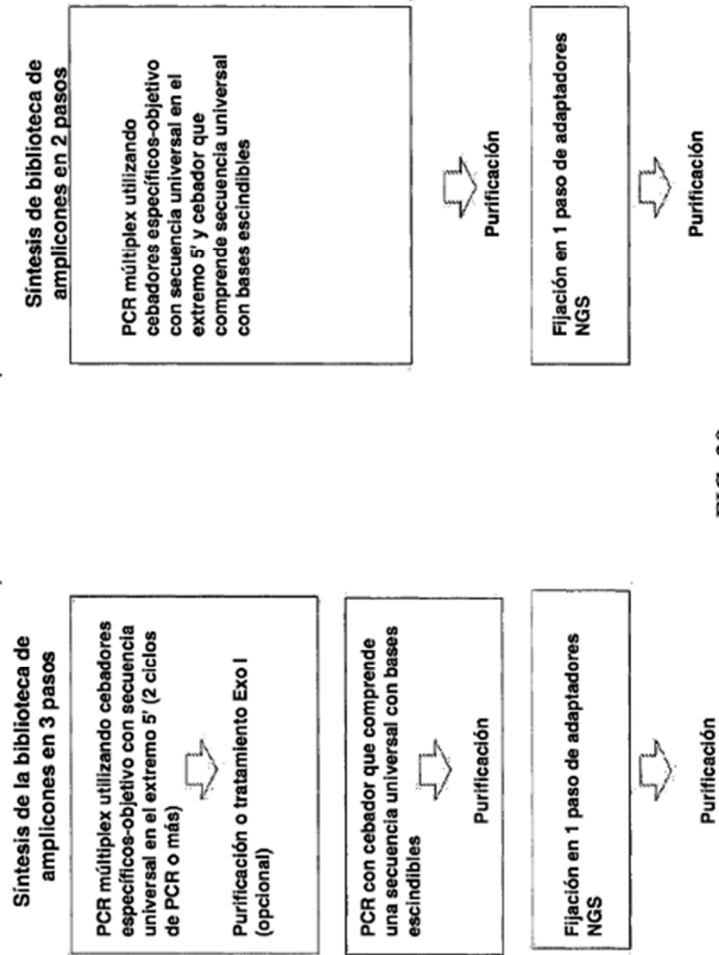


FIG. 39

Síntesis y amplificación de bibliotecas de amplicones múltiplex en 3 pasos utilizando cebadores específicos-objetivo y universales con cola

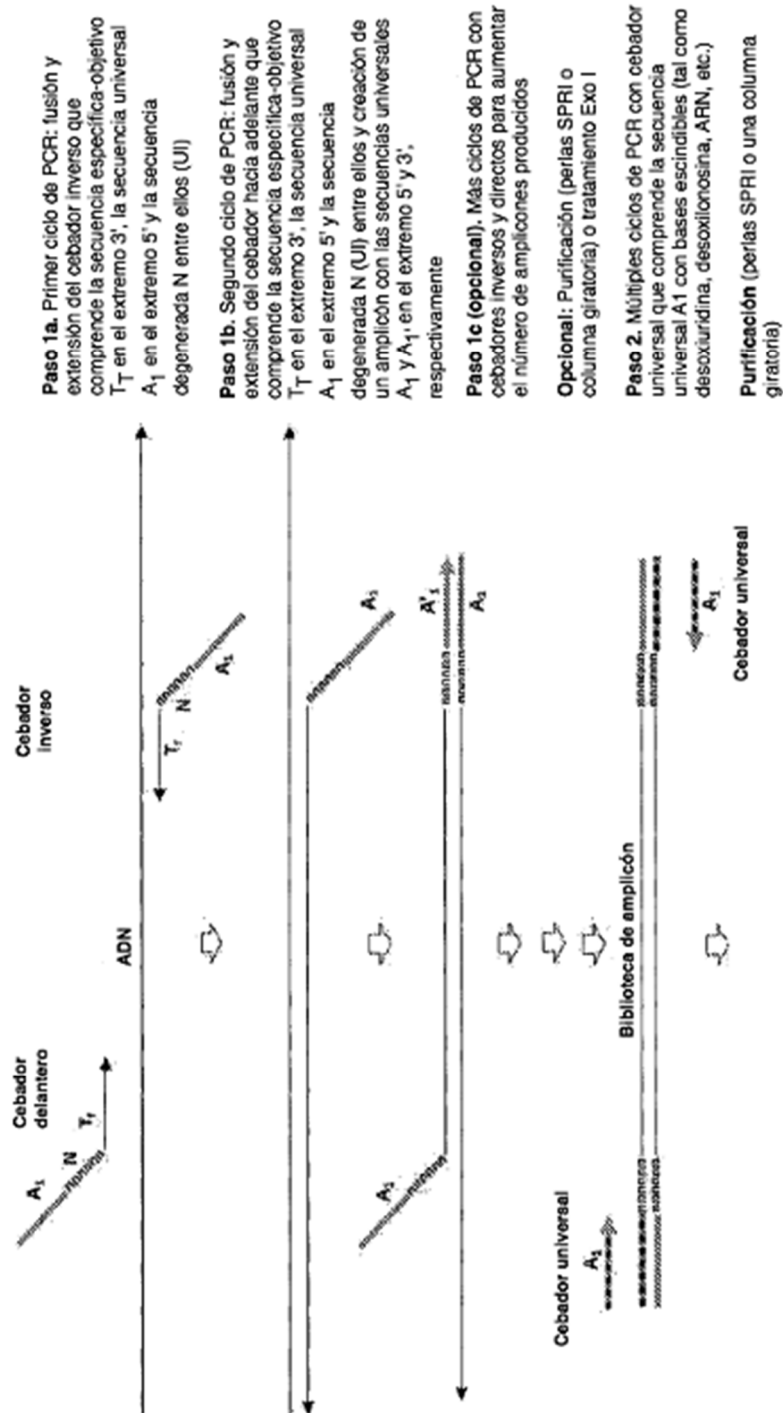


FIG. 40

Síntesis y amplificación de bibliotecas de amplicones múltiplex de 2 pasos utilizando cebadores universales y específicos-objetivo con cola

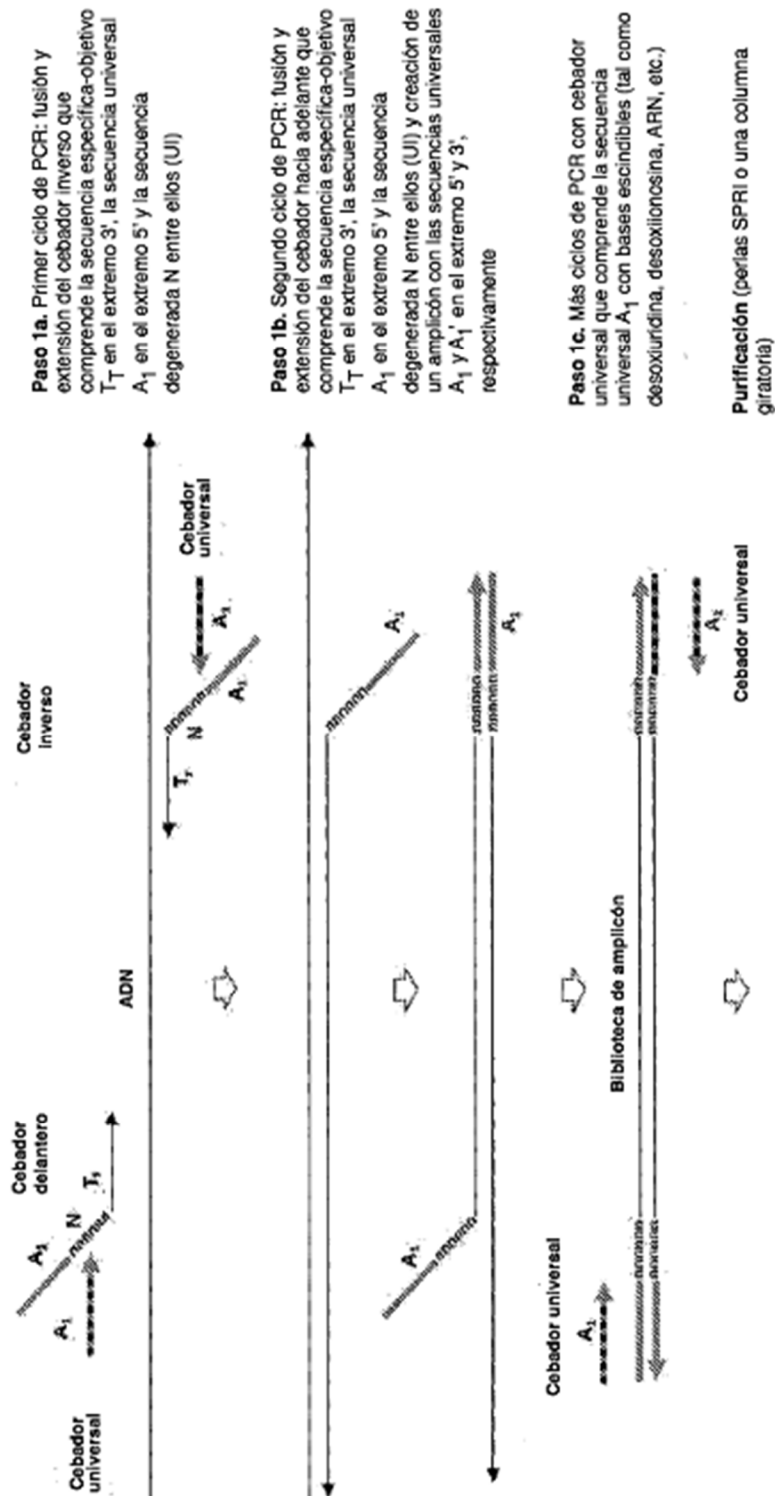
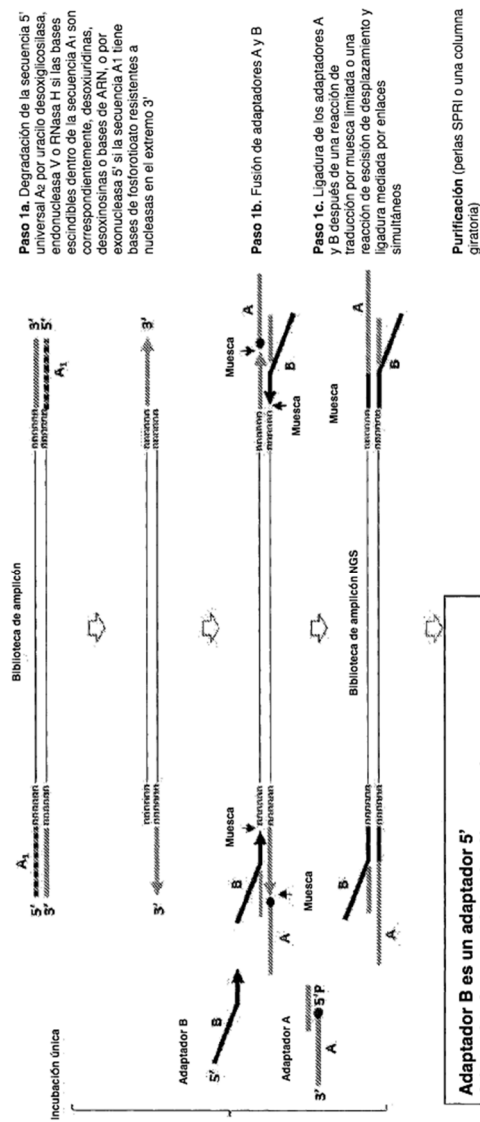
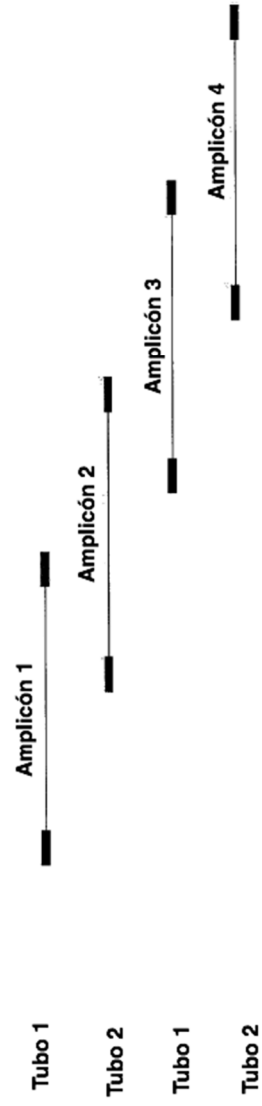


FIG. 41

Paso final para la síntesis de biblioteca: acoplamiento del adaptador NGS del paso 1



Práctica actual para la amplificación por PCR múltiplex de amplicones superpuestos



Un aspecto de la invención

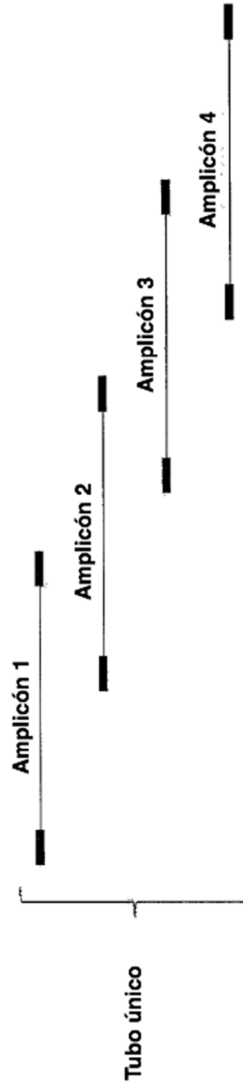


FIG. 43

Productos potenciales de PCR múltiplex de dos regiones de ADN superpuestas

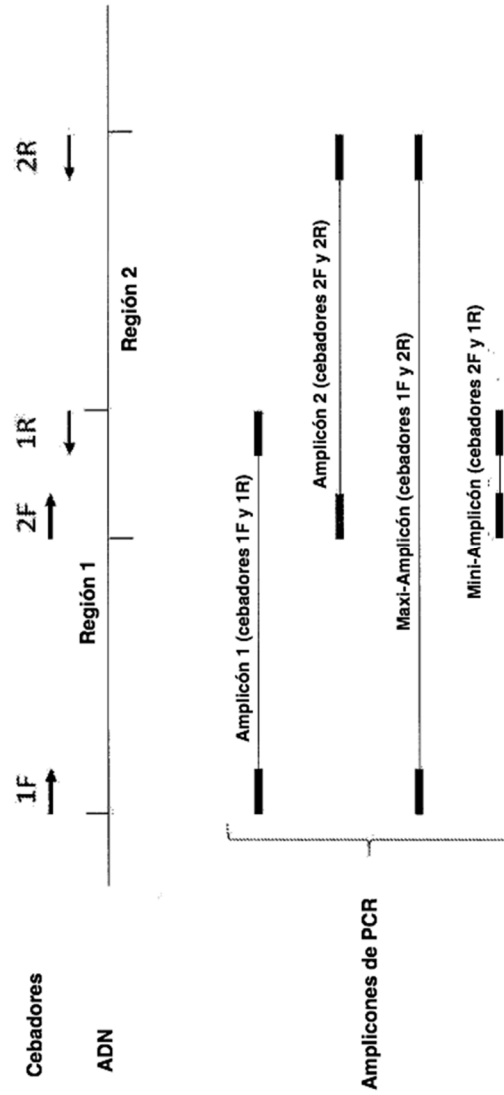


FIG. 44A

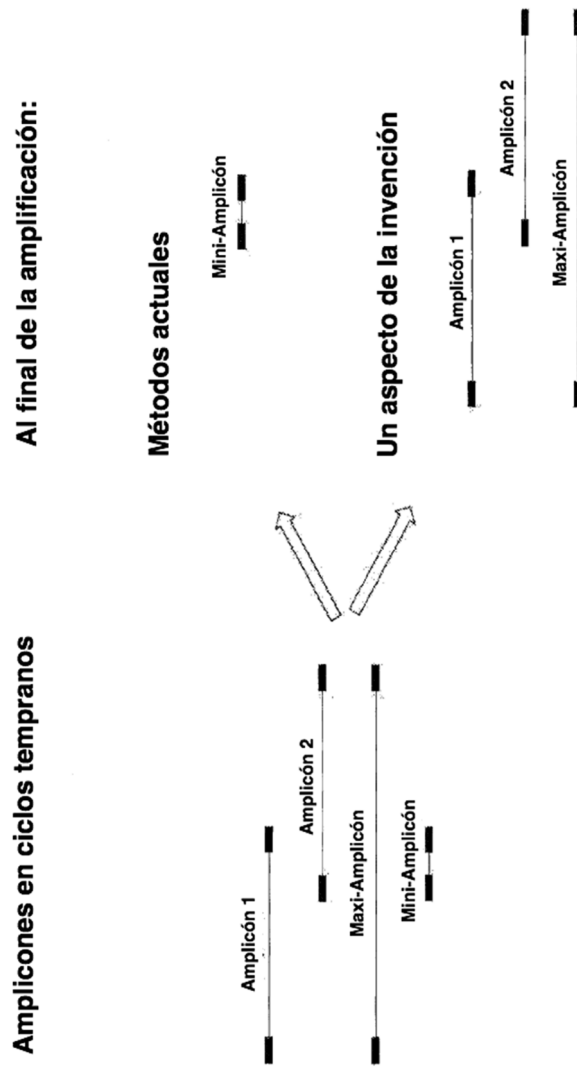


FIG. 44B

Gráfico de cobertura de amplificación para exones de codificación TP53

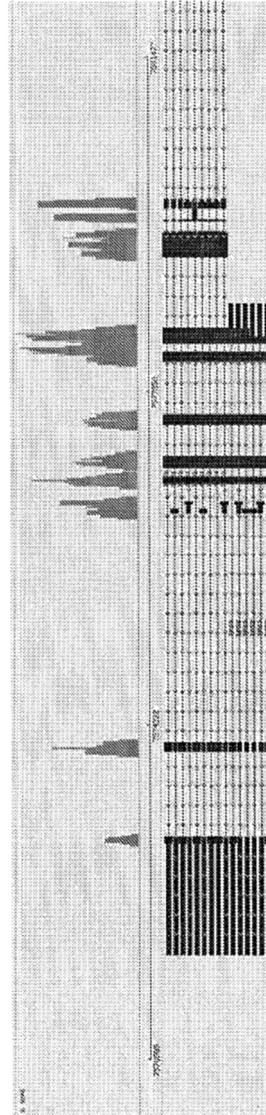


FIG. 45

Una llamada variante TP53 en exón 8

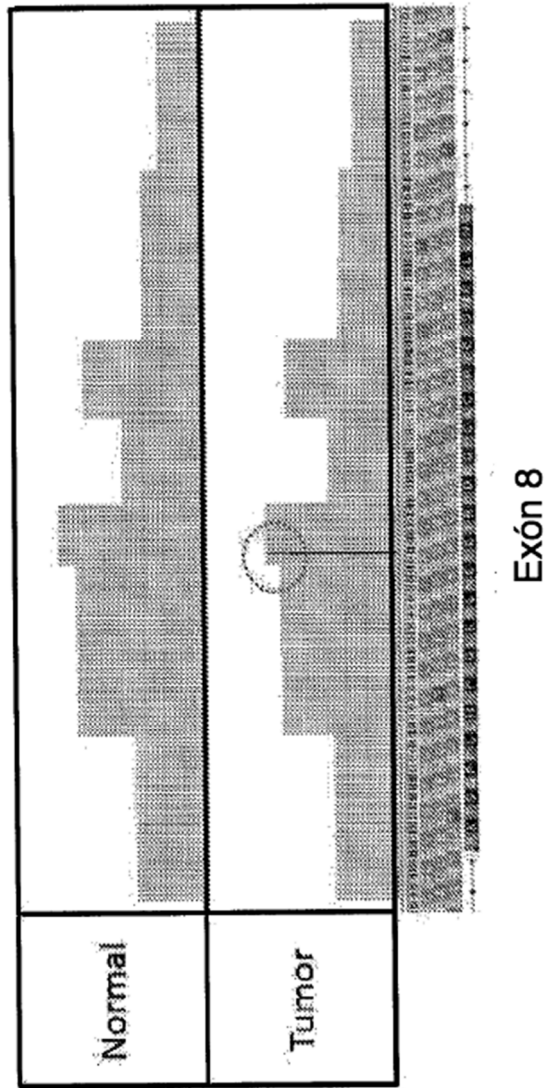


FIG. 46