

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 855 748**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2017 PCT/US2017/041748**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18013710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2017 E 17748591 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3485038**

54 Título: **Enriquecimiento de diana de extensión de cebador**

30 Prioridad:

12.07.2016 US 201662361426 P
09.03.2017 US 201762469480 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GODWIN, BRIAN C.;
PLATZER, JOSEPH;
MOK, JANINE;
PENKLER, JO-ANNE y
MILLER, BRONWEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 855 748 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

Enriquecimiento de diana de extensión de cebador

5 Antecedentes de la invención

La preparación de muestras para la secuenciación de alto rendimiento típicamente implica una etapa de enriquecimiento que incrementa la proporción de ácidos nucleicos diana a ácidos nucleicos no diana en una muestra. Dicho enriquecimiento puede utilizar varios atributos físicoquímicos diferentes de los ácidos nucleicos diana y no diana. Véase, Mamanova *et al.*, Nat. Methods, 7:111-118 (2010), Törmänen *et al.*, 1992, Nucleic Acids Research, Vol. 20, n.º 20, 5487-5488.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos diana que tienen atributos de secuencia conocidos se pueden enriquecer seleccionando fragmentos de ácido nucleico de una muestra que tienen las secuencias diana. Las técnicas de enriquecimiento basadas en secuencias conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, captura híbrida, amplificación por PCR múltiple, enriquecimiento de diana de extensión de cebador (PETE), matriz lineal y procedimientos basados en microesferas.

Breve resumen de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento se describen procedimientos y composiciones mejorados para el enriquecimiento de diana de extensión de cebador (PETE) de ácidos nucleicos diana a partir de una muestra. Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar, por ejemplo, para la preparación de muestras para análisis mediante secuenciación de alto rendimiento. En algunos casos, los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden proporcionar sensibilidad incrementada, antecedentes disminuido o eficacia incrementada en la preparación o el análisis de colecciones de secuenciación de alto rendimiento. En algunos casos, la mejora se proporciona mediante el uso de dos cebadores unidireccionales que se hibridan secuencialmente con el mismo polinucleótido diana y se extienden con una polimerasa.

En algunos modos de realización, se proporciona un procedimiento para enriquecer un polinucleótido diana a partir de una muestra, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una mezcla de reacción que comprende la muestra y un primer cebador específico de diana, en el que la muestra comprende un polinucleótido diana monocatenario que tiene un extremo 3' y un extremo 5' y una pluralidad de polinucleótidos no diana monocatenarios estructuralmente diferentes; hibridar un primer cebador específico de diana con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción, en el que el primer cebador específico de diana hibrida con al menos 6 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario; extender el primer cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa para formar un primer producto bicatenario que comprende el polinucleótido diana hibridado con el primer cebador específico de diana extendido, en el que el polinucleótido diana hibridado comprende una región saliente monocatenaria de al menos 6 nucleótidos consecutivos en el extremo 3'; eliminar polinucleótidos monocatenarios diana y no diana que no hibridan con el cebador específico de diana extendido, si están presentes, de la mezcla de reacción; hibridar un segundo cebador específico de diana con la región saliente monocatenaria en el extremo 3' del polinucleótido diana hibridado, en el que el segundo cebador específico de diana comprende una región de hibridación 3' y una región de código de barras; y extender el segundo cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa, en el que la ADN polimerasa comprende actividad de desplazamiento catenar, actividad exonucleasa de ADN bicatenario 5'-3' o una combinación de las mismas, desplazando o degradando de este modo el primer cebador específico de diana extendido y formando un segundo producto bicatenario que comprende un código de barras, en el que el segundo producto bicatenario comprende el polinucleótido diana hibridado con un segundo cebador específico de diana extendido, en el que el segundo cebador específico de diana extendido comprende: i) un complemento de al menos una parte del polinucleótido diana; y ii) una región saliente 5' monocatenaria que comprende el código de barras.

En algunos modos de realización, el primer cebador específico de diana comprende un ligando de afinidad y: - la extensión comprende inmovilizar el primer producto bicatenario sobre una superficie sólida, en el que la superficie sólida comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad del primer cebador específico de diana; y - la eliminación comprende lavar los polinucleótidos no inmovilizados. En algunos modos de realización, el primer cebador específico de diana se une covalentemente a una superficie sólida y: - la hibridación comprende poner en contacto la superficie sólida a la que el primer cebador específico de diana está unido covalentemente con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción; y - la eliminación comprende lavar los polinucleótidos no inmovilizados. En algunos modos de realización, la extensión en c) comprende extender el primer cebador específico de diana hibridado en presencia de nucleótidos que están unidos covalentemente a un ligando de afinidad, incorporando de este modo nucleótidos unidos al ligando de afinidad en el primer cebador específico de diana extendido y a continuación, inmovilizar el primer producto bicatenario sobre una superficie sólida, en el que la superficie sólida comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad incorporado en el primer cebador específico de diana extendido; y - la eliminación en d) comprende lavar los polinucleótidos no inmovilizados.

En algunos modos de realización, la eliminación comprende además eliminar el primer cebador específico de diana no extendido, si está presente, poniendo en contacto el cebador no extendido con una exonucleasa monocatenaria de 5' a 3'. En algunos modos de realización, el primer cebador específico de diana comprende un ligando de afinidad y: la hibridación de un segundo cebador específico de diana comprende hibridar el segundo cebador específico de diana con un primer producto bicatenario inmovilizado; y la extensión del segundo cebador específico de diana hibridado comprende extender el segundo cebador específico de diana con la ADN polimerasa que comprende actividad de desplazamiento catenar y/o actividad exonucleasa bicatenaria 5'-3', liberando de este modo el polinucleótido diana en solución.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además: unir (por ejemplo, ligar o unir mediante extensión del cebador) un primer y un segundo adaptador universal a:) un primer y un segundo extremo, respectivamente, del segundo producto bicatenario; o un extremo 5' y 3', respectivamente, de un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado a partir del segundo producto bicatenario, o un primer y un segundo extremo de un producto de amplificación bicatenario del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. El procedimiento puede comprender además hibridar un primer cebador universal con el primer adaptador universal y un segundo cebador universal con el segundo adaptador universal y extender los cebadores universales hibridados con una polimerasa, amplificando de este modo: el polinucleótido diana del segundo producto bicatenario ligado al adaptador universal ligado; o el polinucleótido diana del segundo cebador específico de diana recuperado ligado al adaptador universal, o un producto bicatenario del mismo.

En algunos modos de realización, el primer o segundo adaptador universal comprende un segundo código de barras y la ligadura del adaptador universal que comprende el segundo código de barras liga el segundo código de barras al segundo cebador específico de diana extendido. En algunos modos de realización, el segundo adaptador universal se liga a un extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado mediante un procedimiento que comprende: i) poner en contacto el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado con una transferasa terminal, añadiendo de este modo una región de cola 3' que comprende al menos aproximadamente 3, o aproximadamente 8, nucleótidos consecutivos de la misma secuencia al extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado y generar un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola; ii) poner en contacto el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola con un segundo adaptador universal que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una región saliente 3' monocatenaria que es complementaria a la región de cola 3' del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola, hibridando de este modo el segundo adaptador universal con el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola; y iii) ligar un extremo 5' del segundo adaptador universal hibridado a la región de cola 3' del cebador específico de diana extendido monocatenario con cola.

En algunos modos de realización, el primer adaptador universal se liga a un extremo 5' del segundo cebador específico de diana monocatenario recuperado mediante un procedimiento que comprende: i) poner en contacto el segundo cebador específico de diana monocatenario recuperado o con cola con un segundo adaptador universal que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una región saliente 5' monocatenaria que es complementaria a al menos una parte de la región de código de barras del segundo cebador específico de diana monocatenario recuperado o con cola, hibridando de este modo el segundo adaptador universal con el segundo cebador específico de diana monocatenario recuperado o con cola; y iii) ligar un extremo 3' del segundo adaptador universal hibridado a un extremo 5' de la región de código de barras del segundo cebador específico de diana monocatenario recuperado o con cola. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además: poner en contacto el segundo producto bicatenario con una transposasa cargada con un adaptador universal para catalizar la fragmentación y la integración *in vitro* del primer o segundo adaptador universal en extremos de fragmento; e hibridar un primer cebador universal con los primeros adaptadores universales y un segundo cebador universal con los segundos adaptadores universales y extender los cebadores universales hibridados con una polimerasa, amplificando de este modo fragmentos que comprenden el primer y segundo adaptador universal.

En algunos modos de realización: - el polinucleótido diana monocatenario comprende ARN, preferentemente ARNm; y- la extensión comprende extender el primer cebador específico de diana con una ADN polimerasa dependiente de ARN para formar un primer producto bicatenario, en el que el primer producto bicatenario comprende un híbrido ADNc:ARN. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana hibridado del segundo producto bicatenario formado por la extensión del segundo cebador específico de diana comprende una región saliente monocatenaria 3' que comprende al menos 1 nucleótido (por ejemplo, de 1 a 5, de 1-10, de 1-100 o de 1 a 1000), y el procedimiento comprende además: recortar la región saliente 3' del polinucleótido diana hibridado con una enzima que comprende actividad exonucleasa de ADN monocatenario 3' a 5'; y extender el extremo 3' recortado del polinucleótido diana hibridado con una ADN polimerasa, incorporando de este modo un complemento de la región saliente 5' monocatenaria del segundo cebador específico de diana extendido que comprende el código de barras en el polinucleótido diana del segundo producto bicatenario.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende: ligar un primer adaptador universal que comprende un primer sitio de unión de cebador universal al segundo producto bicatenario formado por la extensión del segundo cebador específico de diana, el segundo producto bicatenario recortado formado por la ligadura del primer y segundo

- adaptador universal, o el segundo producto bicatenario recortado y extendido formado por la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal, en el que el primer adaptador universal está ligado a un extremo 3' del segundo cebador específico de diana y el extremo 5' del polinucleótido diana; y ligar un segundo adaptador universal que comprende un segundo sitio de unión de cebador universal a la región saliente 5' monocatenario del segundo cebador específico de diana extendido del segundo producto bicatenario formado por la extensión del segundo cebador específico de diana, el segundo producto bicatenario recortado formado por la ligadura del primer y segundo adaptador universal, o el segundo producto bicatenario recortado y extendido formado por la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal.
- En algunos modos de realización, - la ligadura del segundo adaptador universal comprende ligar el segundo adaptador universal al segundo producto bicatenario formado por la extensión del segundo cebador específico de diana, o el segundo producto bicatenario recortado formado por la ligadura del primer y segundo adaptador universal; y - la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal comprende incorporar un complemento del código de barras y un complemento del segundo sitio de unión de cebador universal en el polinucleótido diana del segundo producto bicatenario. En algunos modos de realización, el segundo adaptador universal es un polinucleótido bicatenario que comprende una región saliente 5' monocatenaria, en el que la región saliente 5' monocatenaria es complementaria a al menos una parte de la región saliente 5' monocatenaria del segundo cebador específico de diana extendido. En algunos modos de realización, la ligadura del segundo adaptador universal comprende ligar un primer adaptador universal que es resistente a una actividad exonucleasa de ADN bicatenario 5' a 3', y el procedimiento comprende además: recuperar el polinucleótido diana que comprende el complemento del código de barras y el complemento del segundo sitio de unión de cebador universal del segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal al ponerse en contacto con el segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal con una enzima que comprende la actividad exonucleasa de ADN bicatenario 5' a 3', degradando de este modo el segundo cebador específico de diana extendido.
- En algunos modos de realización, la ligadura de los segundos adaptadores universales comprende ligar un primer adaptador universal que comprende un ligando de afinidad, en el que el ligando de afinidad está unido a una hebra del primer adaptador universal que está ligado al polinucleótido diana del producto bicatenario, y el procedimiento comprende además: recuperar el polinucleótido diana que comprende el complemento del código de barras y el complemento del segundo sitio de unión de cebador universal del segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal al primer adaptador universal mediante i) la inmovilización del segundo producto bicatenario en una superficie sólida que comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad; y ii) la elución del segundo cebador específico de diana extendido del segundo producto bicatenario para liberar el segundo cebador específico de diana extendido en solución.
- En algunos modos de realización, la elución comprende calentar el segundo producto bicatenario a una temperatura suficiente para liberar el segundo cebador específico de diana extendido en solución. En algunos modos de realización, la temperatura suficiente para liberar el segundo cebador específico de diana extendido en solución comprende una temperatura de al menos 75 °C, 80 °C, 90 °C o 95 °C. En algunos modos de realización, la elución comprende poner en contacto el segundo producto bicatenario con un agente desnaturalizante en condiciones que liberan el segundo cebador específico de diana extendido en solución. En algunos modos de realización, el agente desnaturalizante comprende una solución acuosa de un hidróxido alcalino.
- En algunos modos de realización, la ligadura de los segundos adaptadores universales comprende ligar un segundo adaptador universal que comprende un ligando de afinidad, en el que el ligando de afinidad está unido a una hebra del segundo adaptador universal que está ligado al segundo cebador específico de diana extendido, y el procedimiento comprende además: recuperar el polinucleótido diana que comprende el complemento del código de barras y el complemento del segundo sitio de unión de cebador universal del segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal al primer adaptador universal mediante i) la inmovilización del segundo producto bicatenario en una superficie sólida que comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad; y ii) la elución del polinucleótido diana del segundo producto bicatenario para liberar el polinucleótido diana en solución. En algunos modos de realización, la elución comprende calentar el segundo producto bicatenario a una temperatura suficiente para liberar el polinucleótido diana en solución. En algunos modos de realización, la temperatura suficiente para liberar el polinucleótido diana en solución comprende una temperatura de al menos 75 °C, 80 °C, 90 °C o 95 °C.
- En algunos modos de realización, la elución comprende poner en contacto el segundo producto bicatenario con un agente desnaturalizante en condiciones que liberan el polinucleótido diana en solución. En algunos modos de realización, el agente desnaturalizante comprende una solución acuosa de un hidróxido alcalino. En algunos modos de realización, la ligadura de los segundos adaptadores universales comprende ligar un primer o segundo adaptador universal que comprende un marcador del segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal al primer adaptador universal, y el procedimiento comprende además: recuperar el segundo producto bicatenario formado por la hibridación del primer cebador universal con el primer adaptador universal mediante i) la inmovilización del adaptador universal que comprende el marcador, inmovilizando de este modo el segundo producto bicatenario; ii) el lavado del segundo producto bicatenario inmovilizado; y iii) la elución del segundo producto

bicatenario en solución.

En algunos modos de realización, el marcador del primer o segundo adaptador universal marcado comprende un ligando de afinidad, la inmovilización comprende poner en contacto el ligando de afinidad con una superficie sólida que comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad, y la elución comprende poner en contacto el segundo producto bicatenario inmovilizado con un agente desnaturalizante en condiciones suficientes para interrumpir la interacción ligando de afinidad: elemento de afinidad y liberar el segundo producto bicatenario en solución. En algunos modos de realización, las condiciones suficientes para interrumpir la interacción ligando de afinidad: elemento de afinidad comprenden urea 8 M, guanidina 6 M, un pH de menos de 2,0 o un pH de más de 10,0 (por ejemplo, un pH de o aproximadamente 11 o 12).

En algunos modos de realización, el marcador del primer o segundo adaptador universal marcado se une covalentemente por medio de un conector a una superficie sólida antes o después de la ligadura al segundo producto bicatenario, y la elución comprende escindir el conector para liberar el segundo producto bicatenario en solución. En algunos modos de realización, el agente de escisión es un tiol que escinde un conector disulfuro para liberar el segundo producto bicatenario en solución. En algunos modos de realización, el segundo adaptador universal comprende un segundo código de barras, la ligadura del segundo adaptador universal que comprende el segundo código de barras liga el segundo código de barras al segundo cebador específico de diana extendido y la extensión del extremo 3' recortado del polinucleótido diana hibridado con la ADN polimerasa incorpora un complemento del segundo código de barras en el polinucleótido diana. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además hibridar un primer y segundo cebador universal con el primer y segundo adaptador universal respectivamente, y extender los cebadores universales con una polimerasa, amplificando de este modo el polinucleótido diana.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para enriquecer una pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes a partir de una muestra, en el que el procedimiento comprende realizar uno cualquiera de los modos de realización anteriores por cada polinucleótido diana estructuralmente diferente, en el que la hibridación del primer cebador específico de diana con el polinucleótido diana monocatenario comprende hibridar una pluralidad de primeros cebadores específicos de diana estructuralmente diferentes con la pluralidad de polinucleótidos diana monocatenarios estructuralmente diferentes en una única mezcla de reacción. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende unir un primer y un segundo adaptador universal a al menos una parte de la pluralidad de los polinucleótidos diana o una pluralidad de productos de extensión de segundos cebadores específicos de diana mediante ligadura o unión mediada por transposasa Tn5.

Aún en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para secuenciar una pluralidad de polinucleótidos diana de una muestra que comprende la pluralidad de polinucleótidos diana y una pluralidad de polinucleótidos no diana, comprendiendo el procedimiento: enriquecer los polinucleótidos diana de la muestra realizando uno o más de los procedimientos anteriores para producir una muestra enriquecida y unida al adaptador; y secuenciar la muestra enriquecida y unida al adaptador. En algunos modos de realización, el porcentaje de lecturas vinculadas a la diana de la muestra enriquecida y ligada al adaptador es de al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 %. En algunos modos de realización, el porcentaje de lecturas vinculadas a la diana de la muestra enriquecida y ligada al adaptador es de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 99 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 99 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 99 %, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 90 %, de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 85 %, de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 99 %, de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 90 % o de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 85 %.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende una etapa de eliminar el segundo cebador específico de diana extendido del segundo producto bicatenario usando una endonucleasa. En algunos modos de realización, la extensión del segundo cebador específico de diana hibridado se realiza en presencia de uno o más nucleótidos no convencionales. En algunos modos de realización, la base no convencional introduce un sitio abásico que se puede escindir específicamente sin escindir el ADN en la misma reacción. Enzimas ejemplares que escinden sitios abásicos incluyen, por ejemplo, endonucleasa IV, endonucleasa IV o endonucleasa VIII Tth. En algunos modos de realización, la base no convencional que introduce el sitio básico es 1',2'-didesoxirribosa Int. Se pueden seleccionar otras bases no convencionales entre, por ejemplo, desoxiuracilo y desoxiinosina. En algunos modos de realización, el segundo cebador específico de diana extendido contiene desoxiinosina y se elimina del segundo producto bicatenario usando endonucleasa V; y en otros modos de realización, el segundo cebador específico de diana extendido contiene desoxiuracilo y se elimina del segundo producto bicatenario usando uracil-N-ADN glucosilasa y endonucleasa VIII.

En algunos modos de realización, el adaptador universal comprende uno o más nucleótidos no convencionales seleccionados de desoxiuracilo, desoxiinosina y 1',2'-didesoxirribosa Int, y antes de la amplificación universal, la muestra se pone en contacto con una endonucleasa. En algunos modos de realización, el adaptador universal contiene desoxiinosina y se elimina del segundo producto bicatenario usando endonucleasa V; y en otros modos de

realización, el adaptador universal contiene desoxiuracilo y se elimina del segundo producto bicatenario usando uracil-N-ADN glucosilasa y endonucleasa VIII.

En algunos modos de realización, el primer cebador específico de diana forma parte de un oligonucleótido que tiene un extremo 3' y un extremo 5', el primer cebador específico de diana está en el extremo 3' del oligonucleótido y el oligonucleótido comprende además el segundo cebador específico de diana, el primer cebador específico de diana y el segundo cebador específico de diana están unidos en el oligonucleótido por uno o más nucleótidos no convencionales, y la hibridación del primer cebador específico de diana comprende hibridar el oligonucleótido con el polinucleótido diana monocatenario y antes de la hibridación del segundo cebador específico de diana, el procedimiento comprende además tratar el oligonucleótido para escindir y liberar el segundo cebador específico de diana del oligonucleótido, en el que el segundo cebador específico de diana liberado tiene un extremo 3' disponible para su extensión. En algunos modos de realización, el nucleótido no convencional es desoxiinosina y la endonucleasa es endonucleasa V. En algunos modos de realización, el nucleótido no convencional es desoxiuracilo y la endonucleasa es endonucleasa VIII y la muestra se pone en contacto además con uracil-N-ADN glucosilasa (UNG). En algunos modos de realización, el nucleótido no convencional es 1',2'-didesoxirribosa Int y la endonucleasa es endonucleasa IV, endonucleasa IV o endonucleasa VIII Tth.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende unir adaptadores universales a: polinucleótidos diana (por ejemplo, el polinucleótido diana monocatenario o polinucleótidos bicatenarios que posteriormente se desnaturalizan o se transforman de otro modo en monocatenarios) antes de la hibridación del primer cebador específico de diana con la diana monocatenaria; o el polinucleótido diana hibridado después de la extensión del primer cebador específico de diana hibridado y antes de la hibridación del segundo cebador específico de diana. En algunos modos de realización, la unión comprende ligadura. En algunos modos de realización, la unión comprende tagmentación. En algunos modos de realización, el adaptador universal comprende una o más secuencias de código de barras.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Lackie, *DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier (4.^a ed. 2007); Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Lab Press (Cold Spring Harbor, NY 1989). El término "un/o" o "una" pretende querer decir "uno/a o más". El término "comprender", y las variaciones del mismo, tal como "comprende" y "que comprende", cuando preceden la recitación de una etapa o un elemento, pretenden querer decir que la adición de otras etapas o elementos es opcional y no se excluye. Se puede usar cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de determinados términos usados con frecuencia en el presente documento y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente todo" en referencia a eliminar sustancialmente todo un componente de una mezcla de reacción significa eliminar al menos un 90 %, 95 %, 99 % del componente de la mezcla de reacción.

Como se usa en el presente documento, el término "código de barras" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se puede detectar e identificar. Los códigos de barras pueden ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más nucleótidos de largo. Los códigos de barras pueden emplear códigos de corrección de errores de modo que uno o más errores en la síntesis, replicación y/o secuenciación se puedan corregir para identificar la secuencia de código de barras. Los ejemplos de códigos de corrección de errores y su uso en códigos de barras e identificación y/o secuenciación de código de barras incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el documento U.S. 2010/0.323.348; y el documento U.S. 8.715.967. En algunos casos, los códigos de barras están diseñados para tener un número mínimo de nucleótidos distintos con respecto a todos los demás códigos de barras de una población. El número mínimo puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más. Por tanto, por ejemplo, una población de códigos de barras que tiene un número mínimo de al menos 5 nucleótidos distintos diferirá en al menos 5 posiciones de nucleótidos de todos los demás códigos de barras de la población.

Como se usa en el presente documento, el término "identificador múltiple", "MID" y similares, se refiere a un código de barras que identifica una fuente o muestra. Como tal, todos o sustancialmente todos los polinucleótidos con código de barras MID de una sola fuente o muestra compartirán un MID de la misma secuencia; mientras que todos, o sustancialmente todos (por ejemplo, al menos el 90 % o el 99 %), los polinucleótidos con código de barras MID de diferentes fuentes o muestras tendrán una secuencia de código de barras MID diferente. Los polinucleótidos de diferentes fuentes o muestras y que tienen diferentes MID se pueden mezclar a continuación y secuenciar en paralelo mientras se mantiene la información de fuente/muestra. Por tanto, las lecturas de secuencia se pueden asignar a muestras individuales.

Como se usa en el presente documento, el término "identificador universal", "identificador molecular universal",

"identificador molecular único", "UID" y similares, se refiere a un código de barras que identifica un polinucleótido al que está unido. Típicamente, todos, o sustancialmente todos (por ejemplo, al menos el 90 % o el 99 %), los códigos de barras UID en una mezcla de polinucleótidos con códigos de barras UID son únicos.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

"Polimerasa" se refiere a una enzima que realiza la síntesis de polinucleótidos dirigida por molde. Una ADN polimerasa puede añadir nucleótidos libres solo al extremo 3' de la hebra recién formada. Esto da como resultado el alargamiento de la hebra recién formada en una dirección 5'-3'. Ninguna ADN polimerasa conocida puede comenzar una nueva cadena (*de novo*). La ADN polimerasa puede añadir un nucleótido solo a un grupo -OH 3' preexistente y, por lo tanto, necesita un cebador en el que pueda añadir el primer nucleótido. Los ejemplos no limitantes de polimerasas incluyen ADN polimerasas procariotas (por ejemplo, Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV y Pol V), ADN polimerasa eucariota, ADN polimerasa arqueobacteriana, telomerasa, retrotranscriptasa y ARN polimerasa. La retrotranscriptasa es una ADN polimerasa dependiente de ARN que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN. La familia de la retrotranscriptasa contiene tanto la funcionalidad de la ADN polimerasa como la funcionalidad de la RNasa H, que degrada el ARN con par de base con el ADN. La ARN polimerasa es una enzima que sintetiza ARN usando ADN como molde durante el proceso de transcripción génica. La ARN polimerasa polimeriza ribonucleótidos en el extremo 3' de un transcrito de ARN.

En algunos modos de realización, se puede usar una polimerasa de las siguientes en una extensión de cebador mediada por polimerasa, modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido) o reacción de amplificación: arqueas (por ejemplo, *Thermococcus litoralis* (Vent, GenBank: AAA72101), *Pyrococcus furiosus* (Pfu, GenBank: D12983, BAA02362), *Pyrococcus woessii*, *Pyrococcus* GB-D (Deep Vent, GenBank: AAA67131), *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 (KOD, GenBank: BD175553, BAA06142; *Thermococcus* sp. cepa KOD (Pfx, GenBank: AAE68738)), *Thermococcus gorgonarius* (Tgo, Pdb: 4699806), *Sulfolobus solataricus* (GenBank: NC002754, P26811), *Aeropyrum pernix* (GenBank: BAA81109), *Archaeoglobus fulgidus* (GenBank: 029753), *Pyrobaculum aerophilum* (GenBank: AAL63952), *Pyrodictium occultum* (GenBank: BAA07579, BAA07580), *Thermococcus* 9 grados Nm (GenBank: AAA88769, Q56366), *Thermococcus fumicolans* (GenBank: CAA93738, P74918), *Thermococcus hydrothermalis* (GenBank: CAC18555), *Thermococcus* sp. GE8 (GenBank: CAC12850), *Thermococcus* sp. JDF-3 (GenBank: AX135456; WO0132887), *Thermococcus* sp. TY (GenBank: CAA73475), *Pyrococcus abyssi* (GenBank: P77916), *Pyrococcus glycovorans* (GenBank: CAC12849), *Pyrococcus horikoshii* (GenBank: NP14377), *Pyrococcus* sp. GE23 (GenBank: CAA90887), *Pyrococcus* sp. ST700 (GenBank: CAC 12847), *Thermococcus pacificus* (GenBank: AX411312.1), *Thermococcus zilligii* (GenBank: DQ3366890), *Thermococcus aggregans*, *Thermococcus barossii*, *Thermococcus celer* (GenBank: DD259850.1), *Thermococcus profundus* (GenBank: E14137), *Thermococcus siculi* (GenBank: DD259857.1), *Thermococcus thioeducens*, *Thermococcus onnurineus* NA1, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus tokodaii*, *Pyrobaculum caldifontis*, *Pyrobaculum islandicum* (GenBank: AAF27815), *Methanococcus jannaschii* (GenBank: Q58295), especies *Desulfurococcus* TOK, *Desulfurococcus*, *Pyrolobus*, *Pyrodictium*, *Staphylothermus*, *Vulcanisaetta*, *Methanococcus* (GenBank: P52025) y otras polimerasas arqueobacterianas B, tal como GenBank AAC62712, P956901, BAAA07579)), especies *Thermus* de bacterias termófilas (por ejemplo, *flavus*, *ruber*, *thermophilus*, *lacteus*, *rubens*, *aquaticus*), *Bacillus stearothermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Methanothermobacter fervidus*, polimerasa KOD, polimerasa TNA1, *Thermococcus* sp. 9 grados N-7, T4, T7, phi29, *Pyrococcus furiosus*, *P. abyssi*, *T. gorgonarius*, *T. litoralis*, *T. zilligii*, *T. sp.* GT, *P. sp.* GB-D, KOD, Pfu, *T. gorgonarius*, *T. zilligii*, *T. litoralis* y polimerasas 9N-7 de *Thermococcus* sp.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y retiene suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de polinucleótidos posteriores y no se desnaturaliza irreversiblemente (inactiva) cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y se ejemplifican, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188.

Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), una reacción de extensión de cebador o una reacción de modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido). La desnaturalización irreversible para los propósitos del presente documento se refiere a la pérdida permanente y completa de actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de

la combinación de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión de polinucleótidos que sean complementarios a una hebra de ácido nucleico molde. Las ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, especie sps17 de *Thermus*, especie Z05 de *Thermus*, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana*, *Thermosiphon africanus*, y otras ADN polimerasas termoestables divulgadas anteriormente.

En algunos casos, la polimerasa de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) puede ser una polimerasa de tipo A natural modificada. Otro modo de realización de la divulgación se refiere en general a un procedimiento en el que una polimerasa de tipo A modificada, por ejemplo, en una extensión de cebador, modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido) o reacción de amplificación, se puede seleccionar de cualquier especie del género *Meiothermus*, *Thermotoga* o *Thermomicrobium*. Otro modo de realización de la divulgación en general se refiere a un procedimiento en el que la polimerasa, por ejemplo, en una extensión de cebador, modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido), o reacción de amplificación, se puede aislar de cualquiera de *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus* o *Thermus filiformis*. Otro modo de realización de la divulgación en general engloba un procedimiento en el que la polimerasa de tipo A modificada, por ejemplo, en una extensión de cebador, modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido), o reacción de amplificación, se puede aislar de *Bacillus stearothermophilus*, *Sphaerobacter thermophilus*, *Dictoglomus thermophilum* o *Escherichia coli*. En otro modo de realización, la divulgación se refiere en general a un procedimiento en el que la polimerasa de tipo A modificada, por ejemplo, en una extensión de cebador, modificación de extremo (por ejemplo, transferasa terminal, degradación o pulido), o reacción de amplificación, puede ser una polimerasa Taq-E507K mutante. Otro modo de realización de la divulgación en general se refiere a un procedimiento en el que se puede usar una polimerasa termoestable para efectuar la amplificación del ácido nucleico diana.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que se une a una región específica de una molécula de ácido nucleico molde monocatenario e inicia la síntesis de ácido nucleico por medio de una reacción enzimática mediada por polimerasa, que se extiende desde el extremo 3' del cebador y complementaria a la secuencia de la molécula molde. Los cebadores de amplificación por PCR se pueden denominar cebadores "directos" e "inversos", uno de los cuales es complementario a una hebra de ácido nucleico y el otro es complementario al complemento de esa hebra. Típicamente, un cebador comprende menos de aproximadamente 100 nucleótidos y preferentemente comprende menos de aproximadamente 30 nucleótidos. Los cebadores ejemplares varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 nucleótidos. Los cebadores pueden comprender, por ejemplo, bases de ARN y/o ADN, así como bases naturales. La direccionalidad de la hebra recién formada (la hebra hija) es opuesta a la dirección en la que la ADN polimerasa se mueve a lo largo de la hebra molde. En algunos casos, un cebador específico de diana hibrida específicamente con un polinucleótido diana en condiciones de hibridación. Dichas condiciones de hibridación pueden incluir, pero no se limitan a, hibridación en tampón de amplificación isotérmica (Tris-HCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM), KCl 50 mM, MgSO₄ 2 mM, TWEEN® 20 al 0,1 %, pH 8,8 a 25 °C) a una temperatura de aproximadamente 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador universal" y "cebadores universales" se refiere a un cebador que se puede hibridar con y soportar la amplificación de polinucleótidos diana que tienen un sitio de unión de cebador universal complementario compartido. De forma similar, el término "par de cebadores universal" se refiere a un par de cebadores directo e inverso que se pueden hibridar con y soportar la amplificación por PCR de polinucleótidos diana que tienen sitios de unión de cebadores universales directos e inversos complementarios compartidos. Dicho(s) cebador(es) universal(es) y sitio(s) de unión de cebadores universales pueden permitir la amplificación universal mediada por cebador simple o doble (por ejemplo, PCR universal) de regiones polinucleótídicas diana de interés.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica que comprende moléculas de ácido nucleico, que típicamente comprenden ADN y/o ARN. Las muestras pueden ser tejidos, células o extractos de los mismos, o pueden ser muestras purificadas de moléculas de ácido nucleico. El uso del término "muestra" no implica necesariamente la presencia de una secuencia diana dentro de las moléculas de ácido nucleico presentes en la muestra.

Breve descripción de los dibujos

Las **FIGS. 1A-E** ilustran un modo de realización de enriquecimiento de diana de extensión de cebador doble unidireccional (UD-PETE). En el modo de realización ilustrada, el primer producto de extensión de cebador se hibrida con un polinucleótido diana y se extiende con una polimerasa (FIG. 1 A). El primer cebador, y por tanto el primer producto de extensión de cebador, está biotinilado. El primer cebador biotinilado, o el primer producto de extensión de cebador se captura en una superficie sólida recubierta con antibiotina (por ejemplo, estreptavidina) y la hibridación (FIG. 1B) y la extensión del segundo cebador específico de diana libera el polinucleótido diana lejos del primer producto de extensión de cebador inmovilizado (FIG. 1C). Un primer y segundo adaptador que contiene un primer y segundo sitio de unión de cebador universal, respectivamente, se pueden ligar al segundo producto de extensión de cebador específico de diana (FIG. 1D). El producto de extensión ligado al adaptador se puede amplificar mediante PCR universal (FIG. 1E).

Las **FIGS. 2A-E** ilustran un modo de realización alternativo de UD-PETE. En este modo de realización, un polinucleótido bicatenario que contiene el polinucleótido diana monocatenario hibridado con el segundo producto de extensión de cebador específico de diana se liga a un adaptador que contiene un sitio de hibridación de cebador universal (FIG. 2D) y se digiere en una región saliente monocatenaria 3' no hibridada del polinucleótido diana con una enzima que presenta actividad exonucleasa monocatenaria de 3' a 5' (FIG. 2E).

Las **FIGS. 3A-D** ilustran procedimientos para incorporar códigos de barras MID y UID en el polinucleótido diana original y recuperar el polinucleótido diana monocatenario original con código de barras y eliminar el segundo producto de extensión de cebador específico de diana hibridado.

La **FIG. 4** ilustra los resultados de incorporar nucleótidos escindibles de acuerdo con el procedimiento de la divulgación.

La **FIG. 5** ilustra un modo de realización alternativo de UD-PETE. En este modo de realización, un oligonucleótido que comprende una primera secuencia de cebador específico de diana se une a una segunda secuencia de cebador específico de diana mediante una o más bases no convencionales (también denominadas en el presente documento como "bases modificadas"). El oligonucleótido se hibrida con un polinucleótido diana y se extiende con una polimerasa para formar el primer producto de extensión de cebador (panel superior). El oligonucleótido, y por tanto el primer producto de extensión de cebador, está opcionalmente biotinilado. El oligonucleótido biotinilado o el primer producto de extensión de cebador se captura opcionalmente en una superficie sólida revestida con antibiotina (por ejemplo, estreptavidina). El primer cebador de extensión de cebador se pone en contacto con una endonucleasa que se dirige a la(s) base(s) no convencional(es) para liberar la segunda secuencia de cebador específico de diana que tiene un -OH 3'. El segundo cebador específico de diana a continuación puede hibridarse con el polinucleótido diana y extenderse con una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento catenario para generar un segundo producto de extensión de cebador. Por tanto, el primer producto de extensión de cebador se desplaza o se digiere. Posteriormente se pueden añadir adaptadores universales al segundo producto de extensión de cebador (no representado en la FIG. 5) como se muestra, por ejemplo, en las FIGS. 1D-E.

La **FIG. 6** ilustra un modo de realización alternativo de lo que se muestra en la FIG. 5, en el que un polinucleótido no diana se hibrida con el oligonucleótido. La primera secuencia de cebador hibrida con el polinucleótido no diana, pero esa segunda secuencia de cebador no hibrida y, por tanto, no se forma un segundo producto de extensión de cebador.

Las **FIGS. 7A-B** representan la tasa vinculada a la diana y la uniformidad de cobertura como se describe en el ejemplo 2.

Las **FIGS. 8A-B** representan resultados de secuenciación del ejemplo 3: tasa en diana y recuperación de genoma equivalente (GER) (FIG. 8A) y uniformidad de cobertura de sonda (FIG. 8B).

La **FIG. 9** representa los Ct de una reacción de amplificación del ejemplo 3.

Las **FIGS. 10A-B** representan resultados de secuenciación del ejemplo 4: tasa en diana y recuperación de genoma equivalente (GER) (FIG. 10A) y uniformidad de cobertura de sonda (FIG. 10B).

Las **FIGS. 11A-B** representan resultados de secuenciación del ejemplo 5: tasa en diana y recuperación de genoma equivalente (GER) (FIG. 11 A) y uniformidad de cobertura de sonda (FIG. 11B).

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención proporciona un procedimiento de enriquecimiento de diana de extensión de cebador (PETE) que incluye dos cebadores unidireccionales y composiciones para realizar y usar el procedimiento de PETE de doble cebador unidireccional (UD-PETE). El uso de dos cebadores unidireccionales incrementa la restricción de la etapa de enriquecimiento en comparación con los procedimientos que solo requieren un cebador único o un cebo único para el enriquecimiento de cada polinucleótido diana estructuralmente distinto. Por tanto, en algunos casos, el procedimiento de UD-PETE proporciona un enriquecimiento de diana mejorado o sinérgico en comparación con otros procedimientos de enriquecimiento de diana tales como, por ejemplo, procedimientos de enriquecimiento de diana de extensión de cebador único.

Además, a diferencia de los procedimientos basados en PCR múltiple en los que múltiples primeros y segundos cebadores de amplificación están en la misma mezcla de reacción al mismo tiempo, el procedimiento de UD-PETE puede incluir una etapa de eliminación de los primeros cebadores no extendidos antes de introducir los segundos cebadores en una mezcla de reacción. Por tanto, en algunos casos, el procedimiento puede reducir o eliminar la competencia entre el primer y el segundo cebador. Como tal, en algunos casos, el primer o segundo cebador, o ambos, se pueden usar a concentraciones significativamente más altas en la mezcla de reacción de UD-PETE en

comparación con, por ejemplo, procedimientos basados en PCR múltiple. Adicionalmente, o de forma alternativa, se puede usar un mayor número de primeros y segundos cebadores en la mezcla de reacción de FP-PETE en comparación con, por ejemplo, procedimientos basados en PCR múltiple.

En un modo de realización, un primer cebador se hibrida con una región 3' de un polinucleótido diana monocatenario y se extiende con una ADN polimerasa. Un segundo cebador se puede hibridar con una región 3' del mismo polinucleótido diana monocatenario que se encuentra en 3' de la región con la que hibridó el primer cebador. El segundo cebador se puede extender, a continuación, con una ADN polimerasa. Por tanto, el primer y el segundo cebador se hibridan ambos con el mismo extremo y se extienden en la misma dirección (es decir, unidireccionalmente) con respecto al polinucleótido diana.

En otro modo de realización, la primera secuencia de cebador específico de diana y la segunda secuencia de cebador específico de diana se pueden proporcionar como partes de un único oligonucleótido en el que la primera secuencia de cebador específico de diana y la segunda secuencia de cebador específico de diana están unidas y separadas por al menos una base no convencional (por ejemplo, seleccionada de desoxiuracilo, desoxiinosina, 1',2'-didesoxirribosa Int) que se puede escindir sin escindir el ADN natural en la misma reacción. El oligonucleótido se usa como primer cebador específico de diana en una primera reacción de extensión. Una vez que se completa la primera reacción de extensión, el oligonucleótido se puede tratar con una endonucleasa que se dirige a la(s) base(s) no convencional(es) para liberar la segunda secuencia de cebador específico de diana, que tendrá un extremo -OH 3' que está disponible para la extensión de cebador. El segundo cebador específico de diana se puede usar a continuación en una reacción de desplazamiento catenarico como se describe anteriormente y en otras partes del presente documento para generar el segundo producto de extensión de cebador específico de diana.

II. Procedimientos

En el presente documento se describen procedimientos de enriquecimiento de diana de extensión de cebador doble unidireccional (UD-PETE) para enriquecer un polinucleótido diana a partir de una muestra.

a. formación de un primer producto de extensión de cebador

En algunos modos de realización, los procedimientos incluyen a) proporcionar una mezcla de reacción que contiene la muestra y un primer cebador específico de diana, en el que la muestra contiene un polinucleótido diana monocatenario que tiene un extremo 3' y un 5' y una pluralidad de polinucleótidos no diana monocatenarios estructuralmente diferentes. En algunos modos de realización, los procedimientos incluyen además b) hibridar un primer cebador específico de diana con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción. En general, el primer cebador específico de diana se hibrida con una primera región de hibridación del polinucleótido diana monocatenario que está lo suficientemente lejos en la dirección 5' del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario de modo que un segundo cebador unidireccional se pueda hibridar con la segunda región de hibridación del polinucleótido diana que es 3' de la primera región de hibridación y no se solape con la primera región de hibridación. Por ejemplo, en algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con al menos 6 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario. En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario. En algunos modos de realización, el polinucleótido diana puede comprender secuencias adaptadoras universales en cualquier extremo del polinucleótido.

En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con el nucleótido más 5' del polinucleótido diana. En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con el penúltimo nucleótido 5' del polinucleótido diana, pero no con el nucleótido más 5' del polinucleótido diana. En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con una región que está dentro de los 10 o 100 nucleótidos del nucleótido más 5' del polinucleótido diana. En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con una región que está al menos a 6 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana y a más de 100 nucleótidos 3' del nucleótido más 5' del polinucleótido diana.

En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con una región del polinucleótido diana que tiene al menos 6 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 8 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 10 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 12 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 15 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana o al menos 20 nucleótidos y no más de 500 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana. En algunos casos, el primer cebador específico de diana hibrida con una región del polinucleótido diana que tiene al menos 6 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 8 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 10 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 12 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 15 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 20 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 6 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 8 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 10 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al

menos 12 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana, al menos 15 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana o al menos 20 nucleótidos y no más de 50 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana.

5 En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además c) extender el primer cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa para formar un primer producto bicatenario que comprende el polinucleótido diana hibridado con el primer cebador específico de diana extendido. El polinucleótido diana hibridado del producto bicatenario puede incluir una región saliente monocatenaria en el extremo 3'. La longitud de la región saliente monocatenaria en el extremo 3' se puede determinar, al menos en parte, por la distancia entre el extremo 3' y la
10 posición en la que el primer cebador específico de diana hibrida con el polinucleótido diana. Por tanto, un primer cebador específico de diana que hibrida con al menos 6 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario y posteriormente es extendido por una ADN polimerasa puede producir un producto bicatenario que tiene un polinucleótido diana hibridado con una región saliente monocatenaria de al menos 6 nucleótidos consecutivos en el extremo 3'.

15 Como tal, en algunos casos, la región saliente monocatenaria del producto bicatenario producido por extensión del primer cebador específico de diana puede tener una longitud de, o al menos de, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. En algunos casos, la región saliente monocatenaria del producto bicatenario producido por extensión del primer cebador específico de diana puede tener una longitud de, o al
20 menos de, 6 a 500, 8 a 500, 10 a 500, 12 a 500, 15 a 500, 20 a 500, 6 a 100, 8 a 100, 10 a 100, 12 a 100, 15 a 100, 20 a 100, 6 a 50, 8 a 50, 10 a 50, 12 a 50, 15 a 50 o de 20 a 50 nucleótidos. En algunos casos, la región saliente monocatenaria del producto bicatenario producido por extensión del primer cebador específico de diana puede tener una longitud de al menos 40; 50; 100; 250; 500; 1.000; o 10.000 nucleótidos.

25 En algunos modos de realización, el procedimiento incluye d) eliminar polinucleótidos diana y no diana monocatenarios que no hibridan con un cebador específico de diana extendido, si están presentes, de la mezcla de reacción. En algunos casos, la eliminación de d) incluye eliminar cebadores específicos de diana no extendidos. En algunos casos, la eliminación de d) incluye poner en contacto polinucleótidos diana y no diana monocatenarios con una exonucleasa monocatenaria de 5' a 3'. En algunos casos, la eliminación de d) incluye poner en contacto
30 polinucleótidos diana y no diana monocatenarios, incluyendo primeros cebadores específicos de diana no extendidos con una exonucleasa monocatenaria de 5' a 3'.

En algunos modos de realización, los primeros cebadores específicos de diana se marcan como primeros cebadores específicos de diana, en el que el marcador es un ligando de afinidad unido covalentemente al cebador. Los ligandos de afinidad ejemplares incluyen, pero no se limitan a, biotina o un derivado de la misma, tal como iminobiotina. En
35 algunos casos, los primeros cebadores específicos de diana marcados se inmovilizan en una superficie sólida. Los primeros cebadores específicos de diana marcados se pueden inmovilizar antes o después, o al mismo tiempo, de la hibridación con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción. De forma alternativa, los primeros cebadores específicos de diana marcados se pueden inmovilizar después de hibridarse con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción y extender el primer cebador específico de diana hibridado con la ADN
40 polimerasa.

En algunos modos de realización, el primer cebador específico de diana se une covalentemente a un ligando de afinidad, se hibrida con el polinucleótido diana y se extiende con una polimerasa para producir un producto bicatenario inmovilizado. En dichos modos de realización, la eliminación de polinucleótidos diana y no diana monocatenarios que
45 no se hibridan con el cebador específico de diana extendido de d) puede incluir el lavado de polinucleótidos no inmovilizados. En algunos casos, la eliminación de polinucleótidos diana y no diana monocatenarios que no se hibridan con el cebador específico de diana extendido de d) puede incluir eliminar el producto bicatenario inmovilizado de la mezcla de reacción; y, opcionalmente, colocar el producto bicatenario inmovilizado en una mezcla de reacción diferente.
50

En algunos modos de realización, los primeros cebadores específicos de diana no están marcados con un ligando de afinidad y se proporcionan al menos algunos nucleótidos libres que están unidos a un marcador de afinidad de modo que al menos algunos nucleótidos que se incorporan en el cebador específico de diana extendido están
55 covalentemente unidos a un marcador de afinidad, por ejemplo, un ligando de afinidad que incluye, pero no se limita a, biotina o un derivado de la misma, tal como iminobiotina.

En algunos modos de realización, las secuencias adaptadoras universales se pueden unir al producto bicatenario antes de la formación del segundo producto de extensión de cebador analizado a continuación. Por ejemplo, las
60 secuencias de adaptadores universales se pueden unir mediante ligadura. En algunos modos de realización, las secuencias del adaptador universal pueden incluir una o más secuencias de códigos de barras (por ejemplo, un código de barras de muestra (MID)).

En algunos modos de realización, la primera secuencia de cebador específico de diana (como se describe anteriormente) se proporciona como una secuencia 3' de un oligonucleótido que también comprende la segunda
65 secuencia de cebador específico de diana en el extremo 5' del oligonucleótido. La primera y la segunda secuencia de

cebadores específicos de diana están unidas y separadas por una o más bases no convencionales que se pueden escindir sin escindir el ADN en la reacción. Las bases no convencionales ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, desoxiuracilo, desoxiinosina y 1',2'-didesoxirribosa Int. El oligonucleótido puede hibridarse a continuación con un polinucleótido diana y extenderse con una polimerasa para formar el primer producto de extensión de cebador. Como se analiza en otra parte posteriormente, el oligonucleótido se puede escindir para liberar el segundo cebador específico de diana del oligonucleótido, permitiendo de este modo que el segundo cebador específico de diana esté disponible para la extensión de cebador.

b. formación de un segundo producto de extensión de cebador

En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además e) hibridar una región de hibridación 3' de un segundo cebador específico de diana con la región saliente monocatenaria en el extremo 3' del polinucleótido diana hibridado. En algunos casos, el segundo cebador específico de diana contiene una región de hibridación 3' que hibrida con el polinucleótido diana y una región 5' que no hibrida con el polinucleótido diana. En algunos casos, la región 5' que no hibrida con el polinucleótido diana contiene una región de código de barras (por ejemplo, un código de barras UID). En algunos casos, el segundo cebador específico de diana contiene un fosfato 5' terminal. En dichos modos de realización, un producto de extensión de polimerasa del segundo cebador específico de diana puede contener, por lo tanto, un fosfato 5' terminal.

En algunos casos, la región 5' que no hibrida con el polinucleótido diana contiene, adicionalmente o de forma alternativa, una región [PUENTE]. La región [PUENTE] puede incluir un sitio de hibridación del adaptador de al menos 2 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el sitio de hibridación del adaptador tiene al menos 4 nucleótidos de longitud, al menos 6 nucleótidos de longitud, al menos 8 nucleótidos de longitud, de 2 a 10 nucleótidos de longitud o de 2 a 8 nucleótidos de longitud. La región [PUENTE] puede ser complementaria a una región saliente 5' monocatenaria de un adaptador bicatenario, de modo que cuando la región saliente 5' monocatenaria del adaptador bicatenario hibrida con la región [PUENTE], un -OH 3' del adaptador se puede ligar a un fosfato terminal 5' de un segundo cebador específico de diana o a un segundo cebador específico de diana extendido (por ejemplo, un segundo cebador específico de diana extendido hibridado con un polinucleótido diana). En algunos modos de realización, [PUENTE] comprende o consiste en 6 nucleótidos consecutivos que son complementarios a una región saliente 5' monocatenaria de un adaptador bicatenario. En algunos modos de realización, [PUENTE] comprende o consiste en la secuencia CGA TCT.

En algunos modos de realización, el nucleótido en el extremo 3' del segundo cebador específico de diana hibrida con el nucleótido más 5' de la región saliente monocatenaria. En algunos casos, el nucleótido en el extremo 3' del segundo cebador específico de diana hibrida con un nucleótido de la región saliente monocatenaria del polinucleótido diana hibridado que es al menos 1 nucleótido 3' del nucleótido más 5' de la región saliente monocatenaria. En algunos casos, el nucleótido en el extremo 3' del segundo cebador específico de diana hibrida con un nucleótido de la región saliente monocatenaria del polinucleótido diana hibridado que es de, o es al menos de, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos 3' del nucleótido más 5' de la región saliente monocatenaria.

En algunos casos, el hueco en el polinucleótido diana entre el extremo 3' del segundo cebador específico de diana hibridado con el polinucleótido diana y el nucleótido más 5' del primer cebador específico de diana (por ejemplo, el primer cebador específico de diana extendido) que se hibrida con el polinucleótido diana es de 0 a aproximadamente 10.000 o más nucleótidos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 o más nucleótidos, de 0 a aproximadamente 1.000 o más nucleótidos, de 1 a aproximadamente 1.000 o más nucleótidos, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 500 nucleótidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 nucleótidos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el hueco es inferior a 1.000; 500; 250; 100; 50; o 10 nucleótidos de longitud.

En algunos casos, el segundo cebador específico de diana hibrida con una región del polinucleótido diana que se solapa con la región con la que hibrida el primer cebador específico de diana. El número de nucleótidos dirigidos superpuestos (nucleótidos del polinucleótido diana que hibridan tanto con el primer como con el segundo cebador específico de diana) puede ser 0 (es decir, sin superposición), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además f) extender el segundo cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa, formando de este modo un segundo producto bicatenario que contiene el polinucleótido diana hibridado con un segundo cebador específico de diana extendido. El segundo producto bicatenario puede tener una región saliente monocatenaria 3', una región saliente monocatenaria 5' o una combinación de las mismas.

Por ejemplo, en algunos casos, el segundo cebador específico de diana hibrida con una región del polinucleótido diana que es, o es al menos, un nucleótido 5' del extremo 3' del polinucleótido diana. En dichos casos, el segundo producto bicatenario puede contener una región saliente monocatenaria 3' que tiene una longitud de, o al menos, un nucleótido.

En algunos casos, la región saliente monocatenaria 3' del segundo producto bicatenario puede tener una longitud de, o al menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. En algunos casos, la región saliente monocatenaria 3' del segundo producto bicatenario puede tener una longitud de, o al menos, 6 a 500, 8 a 500, 10 a 500, 12 a 500, 15 a 500, 20 a 500, 6 a 100, 8 a 100, 10 a 100, 12 a 100, 15 a 100, 20 a 100, 6 a 50, 8 a 50, 10 a 50, 12 a 50, 15 a 50 o 20 a 50 nucleótidos.

Como se describe anteriormente, el segundo cebador específico de diana puede contener una región de hibridación 3' que hibrida con el polinucleótido diana y una región 5' que no hibrida con el polinucleótido diana. En dichos casos, el segundo producto bicatenario producido extendiendo el segundo cebador específico de diana hibridado puede contener una región saliente monocatenaria 5' correspondiente a la región 5' del cebador que no hibrida con el polinucleótido diana. En algunos casos, la región 5' del cebador que no hibrida con el polinucleótido diana contiene un código de barras (por ejemplo, un código de barras UID). En dichos casos, la extensión del segundo cebador específico de diana puede producir un segundo producto bicatenario que contiene el polinucleótido diana hibridado con el segundo cebador específico de diana extendido, en el que el segundo cebador específico de diana extendido comprende un complemento de al menos una parte del polinucleótido diana, y una región saliente 5' monocatenaria que comprende el código de barras.

En algunos casos, la ADN polimerasa presenta actividad de desplazamiento catenarío. En algunos casos, la ADN polimerasa presenta actividad exonucleasa de ADN de 5'-3' que digiere una hebra sencilla de un sustrato de ADN bicatenario (denominado en el presente documento actividad exonucleasa de ADN bicatenario de 5'-3') o actividad exonucleasa de ADN bicatenario. En algunos casos, la ADN polimerasa presenta tanto desplazamiento catenarío como actividad exonucleasa de ADN bicatenario de 5'-3'. En algunos casos, el desplazamiento catenarío, la actividad exonucleasa de ADN bicatenario de 5'-3', o una combinación de los mismos, puede desplazar el polinucleótido diana (por ejemplo, la molécula de polinucleótido diana original de una muestra proporcionada) a la solución.

Por ejemplo, en algunos casos, un primer producto bicatenario que contiene el polinucleótido diana hibridado con el primer cebador específico de diana extendido se inmoviliza en una superficie sólida, por ejemplo, mediante captura por afinidad de un ligando (por ejemplo, biotina o un derivado de la misma) unido covalentemente al primer cebador específico de diana extendido. En dichos casos, la actividad de desplazamiento catenarío de la ADN polimerasa que extiende el segundo cebador específico de diana hibridado desplaza el polinucleótido diana de la muestra a la solución. De forma alternativa, la actividad exonucleasa de 5'-3' puede degradar el primer cebador específico de diana extendido que se inmoviliza mediante captura por afinidad y se hibrida con el polinucleótido diana, en el que la actividad exonucleasa de 5'-3' libera de este modo el polinucleótido diana en solución.

En algunos casos, el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario se puede recuperar del segundo producto bicatenario, produciendo un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. En algunos casos, el segundo cebador específico de diana extendido se puede recuperar del segundo producto bicatenario antes de la unión de un primer o segundo adaptador universal. En algunos casos, el segundo cebador específico de diana extendido se puede recuperar del segundo producto bicatenario después de la unión de un primer adaptador universal y antes de la unión de un segundo adaptador universal. En algunos casos, el segundo cebador específico de diana extendido se puede recuperar del segundo producto bicatenario después de la unión de un primer adaptador universal y un segundo adaptador universal.

Por ejemplo, en algunos casos, el segundo cebador específico de diana se bloquea en un extremo 5', de modo que el segundo cebador específico de diana extendido es resistente a la actividad exonucleasa de 5'-3'. En dichos casos, el segundo producto bicatenario se puede poner en contacto con una exonucleasa de 5'-3' monocatenaria, bicatenaria o monocatenaria y bicatenaria para degradar el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario. En algunos casos, la exonucleasa de 5'-3' monocatenaria y bicatenaria es proporcionada por la misma enzima. En otros casos, el contacto del segundo producto bicatenario con una exonucleasa de 5'-3' monocatenaria y bicatenaria se realiza poniendo en contacto el segundo producto bicatenario con dos enzimas diferentes. En algunos casos, el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario se degrada al ponerse en contacto con la actividad exonucleasa de 5'-3' y purificar el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario (por ejemplo, por columna, microesfera, resina, lote, gel o procedimientos de purificación de ácido nucleico basados en membrana incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI)).

En algunos modos de realización, el polinucleótido diana es ARN (por ejemplo, ARNm). En dichos modos de realización, la extensión del primer cebador específico de diana hibridado se realiza con una ADN polimerasa dependiente de ARN, y el primer producto bicatenario formado de este modo es un híbrido de ADNc/ARN. De forma similar, la extensión del segundo cebador específico de diana hibridado forma, por tanto, un segundo producto bicatenario que también es un híbrido de ADNc/ARN. En dichos casos, el segundo cebador específico de diana extendido se puede recuperar digiriendo el ARN del híbrido de ADNc/ARN con una enzima que presenta actividad de RNasa H.

En dichos modos de realización en los que el primer y el segundo cebador específico de diana se proporcionan como partes de un único oligonucleótido (siendo la secuenciación del primer cebador específico de diana en el extremo 3' del oligonucleótido), las secuencias del primer y segundo cebador específico de diana se pueden separar después del

cebado inicial basado en la secuencia del primer cebador específico de diana. Véase, por ejemplo, la FIG. 5. Por ejemplo, una o más bases no convencionales que separan la primera y la segunda secuencia de cebadores específicos de diana se pueden escindir para separar la segunda secuencia de cebadores específicos de diana de la primera secuencia de cebadores específicos de diana, dejando un resto -OH 3' en el segundo cebador específico de diana para permitir la extensión de cebador posterior a partir del segundo cebador específico de diana. Por ejemplo, se puede usar una endonucleasa que se dirija a la base no convencional para liberar el segundo cebador del oligonucleótido de modo que el segundo cebador tenga un -OH 3' libre. Las endonucleasas ejemplares endonucleasa IV, endonucleasa IV o endonucleasa VIII Tth pueden incluir, pero no se limitan a, endonucleasa IV, endonucleasa IV o endonucleasa VIII Tth de *E. coli* (que escinden en sitios abásicos) o endonucleasa V de *E. coli* (que escinde en sitios de desoxiinosina). En el modo de realización donde se incorpora desoxiuracilo, la mezcla de reacción puede ponerse en contacto con uracil-N-ADN glucosilasa (UNG). UNG escinde el uracilo del ADN dejando un sitio abásico. En algunos modos de realización, la base no convencional que introduce el sitio abásico es 1',2'-didesoxirribosa Int. A continuación, la muestra se puede poner en contacto además con una endonucleasa que escinde el ADN en sitios abásicos. El segundo cebador específico de diana liberado se puede hibridar a continuación con el polinucleótido diana y extenderse con una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento catenario como se describe anteriormente, liberando o eliminando de este modo el primer producto de extensión de cebador y generando el segundo producto de extensión de cebador.

c. unión de adaptadores universales

En algunos modos de realización, los procedimientos incluyen además unir un primer adaptador universal, o un primer y segundo adaptador universal al segundo producto bicatenario. Adicionalmente o de forma alternativa, los procedimientos incluyen además unir un primer adaptador universal, o un primer y segundo adaptador universal a un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. En algunos casos, el primer adaptador universal se une al segundo producto bicatenario, el segundo cebador específico de diana extendido unido al primer adaptador se recupera del producto bicatenario y un segundo adaptador universal se une al segundo cebador específico de diana extendido monocatenario unido al primer adaptador y recuperado.

En algunos casos, la unión de un primer adaptador universal, segundo adaptador universal o la combinación de los mismos incluye ligar los uno o más adaptadores al segundo producto bicatenario, o segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. En algunos casos, la ligadura puede requerir un fosfato 5' terminal en una hebra donante. En algunos casos, se proporciona un fosfato 5' terminal usando un segundo cebador específico de diana que tiene un fosfato 5' terminal. En algunos casos, se proporciona un fosfato 5' terminal al poner en contacto el segundo producto bicatenario, o el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado con una enzima que puede anexar un fosfato 5' terminal a un polinucleótido (por ejemplo, polinucleótido quinasa T4 o una fosfatasa 3' menos un derivado de la misma).

En algunos casos, se une un primer adaptador universal a un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado mediante ligadura. Por ejemplo, un primer adaptador universal puede ser un adaptador de puente que está ligado a un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. Los adaptadores de puente pueden contener una región bicatenaria y una región saliente monocatenaria 5', en los que la región saliente monocatenaria 5' es complementaria a e hibrida en condiciones de hibridación con la región [PUENTE] del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. El adaptador de puente se puede configurar para hibridar con la región [PUENTE] de modo que un -OH 3' del adaptador (por ejemplo, en la hebra opuesta como la región saliente monocatenaria 5' del adaptador de puente) se pueda ligar a un fosfato 5' terminal del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. La región saliente monocatenaria 5' del adaptador de puente puede tener al menos 2 nucleótidos de longitud, al menos 4 nucleótidos de longitud, al menos 6 nucleótidos de longitud, al menos 8 nucleótidos de longitud, de 2 a 10 nucleótidos de longitud o de 2 a 8 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, la región saliente monocatenaria 5' comprende o consiste en 6 nucleótidos consecutivos que son complementarios a una región [PUENTE] del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. En algunos modos de realización, la región saliente monocatenaria 5' comprende o consiste en la secuencia AGA TCG.

En algunos casos, el primer adaptador universal puede contener un código de barras. Por ejemplo, el primer adaptador universal puede contener un código de barras MID. Por tanto, la unión (por ejemplo, ligadura) de un primer adaptador universal puede unir un código de barras MID, un primer sitio de unión de cebador universal, o una combinación de los mismos, al segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado. En algunos casos, la unión (por ejemplo, ligadura) de un primer adaptador universal puede unir un código de barras MID, un primer sitio de unión de cebador universal, o una combinación de los mismos, al segundo producto bicatenario.

En algunos casos, se une un segundo adaptador universal a un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado (por ejemplo, después de la unión del primer adaptador universal) mediante ligadura. Por ejemplo, un extremo 3' de un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado (por ejemplo, después de la unión del primer adaptador universal) puede ponerse en contacto con una transferasa terminal, añadiendo, por lo tanto, una región de cola 3' al extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado y generar un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola. El

segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola se puede poner en contacto con un segundo adaptador universal que es un adaptador de puente que tiene una región bicatenaria y una región saliente monocatenaria 3' que es complementaria a la región de cola 3' del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola, hibridando, por lo tanto, el segundo adaptador universal con el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola. El segundo adaptador universal hibridado se puede hibridar de modo que un fosfato 5' terminal del adaptador sea contiguo a, y se pueda ligar con, un OH 3' terminal del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario con cola. Por tanto, el extremo 5' del segundo adaptador universal hibridado puede ponerse en contacto con una ligasa y ligarse a la región de cola 3' del cebador específico de diana extendido monocatenario con cola.

En algunos casos, la región de cola 3' contiene, o contiene al menos aproximadamente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos consecutivos de la misma secuencia. En algunos casos, la región de cola 3' contiene de 2 a aproximadamente 20, de 2 a aproximadamente 15, de 2 a aproximadamente 12, de 2 a aproximadamente 10 o de 2 a aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de la misma secuencia. En algunos casos, la región de cola 3' contiene de 3 a aproximadamente 20, de 3 a aproximadamente 15, de 3 a aproximadamente 12, de 3 a aproximadamente 10 o de 3 a aproximadamente 8 nucleótidos consecutivos de la misma secuencia.

El primer, segundo o primer y segundo adaptador universal se pueden unir mediante tagmentación. Los procedimientos y composiciones para la tagmentación incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes de EE. UU. n.º 5.965.443; 6.437.109; 7.083.980; 7.608.434; y 9.238.671. En un modo de realización ejemplar, un segundo producto bicatenario se pone en contacto con una transposasa (por ejemplo, una transposasa Tn5 o mutante de la misma) cargada con un primer y segundo adaptador o un grupo de la primera transposasa cargada con adaptador y la segunda transposasa cargada con adaptador. Se permite que la transposasa cargada con adaptador o el grupo de transposasas cargadas con adaptador fragmente el segundo producto bicatenario y el primer o segundo adaptador de enlace covalente en el extremo de los fragmentos, lo que da como resultado un grupo de: i) fragmentos que tienen primeros adaptadores en ambos terminales; ii) fragmentos que tienen segundos adaptadores en ambos extremos; iii) fragmentos que tienen un primer adaptador en un primer extremo y un segundo adaptador en un segundo extremo.

El segundo producto bicatenario unido al adaptador, el segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado, o los fragmentos de tagmentación de los mismos, pueden contener un primer sitio de unión del cebador universal y un segundo sitio de unión del cebador universal o un complemento del mismo. Por tanto, el polinucleótido unido al adaptador se puede amplificar mediante PCR universal. En un modo de realización, un polinucleótido monocatenario (por ejemplo, un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado) contiene un sitio de unión de cebador universal en un extremo 3' y un complemento de un sitio de unión de cebador universal diferente en el extremo 5'. En dichos modos de realización, un cebador universal puede hibridarse con el sitio de unión del cebador universal y extenderse con una polimerasa, produciendo de este modo un producto bicatenario que tiene un primer y un segundo sitio de unión de cebador universal. En algunos modos de realización, el polinucleótido monocatenario tiene un segundo sitio de unión de cebador universal en un extremo 3' (por ejemplo, unido mediante ligadura del segundo adaptador universal) y un complemento de un primer sitio de unión de cebador universal en un extremo 5' (por ejemplo, unido mediante ligadura del primer adaptador universal).

d. codificación de barras de polinucleótido diana original

Se describen anteriormente procedimientos de UD-PETE en los que un segundo cebador específico de diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID) se hibrida con el polinucleótido diana, se extiende y se recupera el producto de extensión. En dichos modos de realización, el código de barras se incorpora en el segundo cebador específico de diana extendido. Por tanto, los errores de polimerasa que se introducen durante la extensión del segundo cebador específico de diana no se pueden distinguir de las verdaderas variantes en la muestra a partir de la cual se proporciona el polinucleótido diana. En el presente documento se describen procedimientos de UD-PETE en los que se usa un segundo cebador específico de diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID) para unir un código de barras (por ejemplo, un código de barras UID) directamente al polinucleótido diana original. Por tanto, no se introducen errores de polimerasa en la secuencia polinucleotídica diana.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir etapas preliminares de primera hibridación específica de diana, extensión y segunda hibridación específica de diana como se describe anteriormente. Además, los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir etapas posteriores de unión de adaptador universal (por ejemplo, ligadura, tagmentación, etc.) como se describe anteriormente.

En algunos modos de realización, el segundo cebador específico de diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID) se hibrida con el polinucleótido diana y se extiende para producir un segundo producto bicatenario en el que el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario contiene una región saliente monocatenaria 3' que tiene una longitud de al menos 1 nucleótido. De forma alternativa, el segundo cebador específico de diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID) se puede hibridar con el polinucleótido diana y se extiende para producir un segundo producto bicatenario en el que el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario no tiene una región saliente monocatenaria 3'. Por ejemplo, el segundo cebador específico de diana con

código de barras (por ejemplo, con código de barras UID) se puede hibridar con el polinucleótido diana de modo que el nucleótido 3' terminal del polinucleótido diana se hibrida con un nucleótido de la región de hibridación 3' (por ejemplo, el nucleótido 5' terminal de la región de hibridación 3') del segundo cebador específico de diana.

En modos de realización en los que el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario contiene una región saliente monocatenaria 3' que tiene una longitud de al menos 1 nucleótido, la región saliente monocatenaria 3' puede ponerse en contacto con una exonucleasa de ADN monocatenario 3'-5' para eliminar la región saliente. Por ejemplo, la región saliente monocatenaria 3' se puede poner en contacto con Exo I para digerir la región saliente. Como otro ejemplo, la región saliente monocatenaria 3' se puede poner en contacto con polimerasa T4 para digerir la región saliente.

El segundo producto bicatenario en el que el polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario no tiene una región saliente monocatenaria 3' (por ejemplo, después de la digestión con una exonucleasa de ADN monocatenario 3'-5') se puede poner en contacto con una ADN polimerasa para extender el extremo 3' del polinucleótido diana original. La reacción de extensión se puede moldear mediante la región saliente 5' del segundo cebador específico de diana extendido. Por tanto, si el segundo cebador específico de diana tiene un código de barras (por ejemplo, con código de barras UID), la extensión puede unir el código de barras (es decir, un complemento de la secuencia de código de barras del segundo cebador específico de diana) a un extremo 3' de la hebra molde original. De forma similar, si el segundo cebador específico de diana contiene una región [PUENTE], la extensión puede unir una región [PUENTE] (es decir, un complemento de la región [PUENTE] del segundo cebador específico de diana) a un extremo 3' de la hebra molde original. En algunos casos, la extensión incorpora un código de barras y una región [PUENTE] en un extremo 3' de la hebra molde original. En algunos casos, la extensión incorpora de 5' a 3' un código de barras y una región [PUENTE] en un extremo 3' de la hebra molde original.

En algunos modos de realización, se une un primer adaptador universal al segundo producto bicatenario antes de la digestión de la región saliente monocatenaria 3', si está presente. En otros modos de realización, se une un primer adaptador universal al segundo producto bicatenario después de la digestión de la región saliente monocatenaria 3', si está presente. En algunos casos, se une un primer adaptador universal al segundo producto bicatenario después de la incorporación de un código de barras (por ejemplo, un código de barras UID), una región [PUENTE] o un código de barras y una región [PUENTE] mediante la extensión mediada por polimerasa del extremo 3' del polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario. En algunos casos, se une un primer adaptador universal al segundo producto bicatenario antes de la incorporación de un código de barras (por ejemplo, un código de barras UID), una región [PUENTE] o un código de barras y una región [PUENTE] mediante la extensión mediada por polimerasa del extremo 3' del polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario.

En un modo de realización ejemplar, un primer adaptador universal (por ejemplo, el primer adaptador universal bicatenario) se une (por ejemplo, se liga) a un extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido y el extremo 5' del polinucleótido diana. En algunos casos, un primer adaptador universal bicatenario que tiene un extremo romo se liga al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido en una reacción de ligadura de extremo romo. De forma alternativa, un primer adaptador universal bicatenario que tiene un extremo cohesivo (es decir, un saliente monocatenario complementario) se puede ligar a un extremo cohesivo compatible del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido en una reacción de ligadura de extremo cohesivo.

Por ejemplo, en algunos casos, el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido contiene uno, al menos uno, dos o al menos dos nucleótidos de adenina consecutivos y el primer adaptador universal bicatenario contiene uno, al menos uno, dos o al menos dos nucleótidos de timina consecutivos para la ligadura de T-A al extremo del segundo producto bicatenario. En algunos casos, se selecciona una ADN polimerasa para la extensión del segundo cebador específico de diana para producir preferentemente extremos romos o cohesivos y se usa un primer adaptador universal de extremo romo o cohesivo correspondiente. La ligadura se puede realizar poniendo en contacto el primer adaptador universal y el segundo producto bicatenario con una ligasa (por ejemplo, ADN ligasa T4).

Un primer adaptador universal y un segundo adaptador universal se unen típicamente (por ejemplo, se ligan) a extremos opuestos del segundo producto bicatenario. En algunos casos, el primer y segundo adaptador universal se unen antes de la extensión del extremo 3' del polinucleótido diana en el segundo producto bicatenario. En algunos casos, el primer adaptador universal se une antes de la extensión y el segundo adaptador universal se une después de la extensión. En algunos casos, el primer adaptador universal se une al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido, y el segundo adaptador universal se une al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 5' del segundo cebador específico de diana extendido. De forma alternativa, el primer adaptador universal se une al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 5' del segundo cebador específico de diana extendido, y el segundo adaptador universal se une al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido.

En algunos modos de realización, el segundo cebador específico de diana contiene un código de barras UID y una

región [PUENTE] y un adaptador universal que contiene un código de barras MID y un sitio de unión de cebador universal se une (por ejemplo, se liga) al extremo 5' del segundo cebador específico de diana extendido en el segundo producto bicatenario. En dichos casos, la unión del adaptador universal con código de barras MID antes de la extensión del extremo 3' del polinucleótido diana puede incorporar el sitio de cebador universal y el código de barras MID en el polinucleótido diana original. En algunos casos, el adaptador universal con código de barras MID se une primero, y un adaptador universal diferente se une al otro extremo del segundo producto bicatenario. Sin embargo, el orden relativo en el que se unen los adaptadores universales a los extremos opuestos del segundo producto bicatenario es intercambiable para diferentes flujos de trabajo.

e. recuperación de polinucleótido diana original

En algunos modos de realización, después de ligar el primer y segundo adaptador, se recupera el polinucleótido diana monocatenario original. En algunos casos, el polinucleótido diana monocatenario original recuperado tiene un código de barras. El polinucleótido diana monocatenario original con código de barras recuperado puede contener un UID, un MID o un UID y un MID. En un modo de realización ejemplar, el polinucleótido diana monocatenario original con código de barras recuperado contiene de 5' a 3': un segundo sitio de unión de cebador universal o complemento del mismo, una región polinucleotídica diana original que contiene nucleótidos consecutivos de la molécula polinucleotídica diana original, un código de barras UID, un código de barras MID y un primer sitio de unión de cebador universal o complemento del mismo.

En algunos modos de realización, el polinucleótido diana monocatenario original con código de barras se recupera del segundo producto bicatenario mediante digestión exonucleasa bicatenaria de 5' a 3' (por ejemplo, digestión del producto bicatenario con una enzima exonucleasa que degrada un sustrato de ADN monocatenario o bicatenario para producir un producto monocatenario). En dichos modos de realización, el adaptador universal unido al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido se puede bloquear en un extremo 5' de modo que el extremo 5' del polinucleótido diana original unido al adaptador se bloquea desde la digestión exonucleasa bicatenaria de 5' a 3'.

De forma alternativa, el adaptador universal unido al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 3' del segundo cebador específico de diana extendido se puede marcar (por ejemplo, en un extremo 5') con un ligando de afinidad (por ejemplo, biotina) de modo que el segundo producto bicatenario que contiene el polinucleótido diana original unido al adaptador se pueda capturar y la hebra copiada se pueda eluir, por ejemplo, mediante calentamiento. Como aún otra alternativa, el adaptador universal unido al extremo del segundo producto bicatenario que contiene el extremo 5' del segundo cebador específico de diana extendido se puede marcar (por ejemplo, en un extremo 5') con un ligando de afinidad (por ejemplo, biotina) de modo que el segundo producto bicatenario que contiene el polinucleótido diana original unido al adaptador se pueda capturar y la hebra molde original se pueda eluir, por ejemplo, mediante calentamiento o elución química (por ejemplo, poniéndola en contacto con un ácido o base o nucleófilo para interrumpir la afinidad entre el ligando y el agente de captura o escindir un enlace entre el ligando de afinidad y el ácido nucleico), y recuperar.

En algunos modos de realización, el polinucleótido diana monocatenario original con código de barras se recupera del segundo producto bicatenario a través del uso de endonucleasas. Específicamente, se usan endonucleasas para degradar el segundo producto de extensión de cebador sin degradar la hebra original. Se conoce que determinadas endonucleasas escinden la cadena principal de ácido nucleico (enlaces fosfodiéster) en sitios específicos. Por ejemplo, la endonucleasa VIII de *E. coli* escinde en sitios abásicos mientras que la endonucleasa V de *E. coli* escinde en sitios de desoxiinosina. En algunos modos de realización, la base no convencional introduce un sitio abásico que se puede escindir específicamente sin escindir el ADN en la misma reacción. Enzimas ejemplares que escinden sitios abásicos incluyen, por ejemplo, endonucleasa IV, endonucleasa IV o endonucleasa VIII Tth. En algunos modos de realización, la base no convencional que introduce el sitio abásico es 1',2'-didesoxirribosa Int. En algunos modos de realización, una o ambas la primera y segunda reacción de extensión de cebador se realizan en presencia de nucleótidos no convencionales que pueden incorporarse mediante la extensión de la ADN polimerasa y permiten la digestión posterior de endonucleasas. En algunos modos de realización, la reacción de extensión se realiza en presencia de trifosfato de desoxiuracilo (dUTP). En algunos modos de realización, el dUTP reemplaza completamente el dTTP en la reacción de extensión. En otros modos de realización, se usa una mezcla de dUTP y dTTP. La proporción de dUTP a dTTP puede estar entre 0:1, 1:1, 1:100. Después de la incorporación de dU en lugar de algunos o todos los nucleótidos dT en uno o ambos del primer y segundo producto de extensión de cebador, se permite que se digieran con uracil-N-ADN glucosilasa (UNG). UNG escinde el uracilo del ADN dejando un sitio abásico. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción que comprende uno o ambos del primer y segundo producto de extensión de cebador con sitios abásicos se puede tratar con una endonucleasa que escinde ADN en sitios abásicos. En algunos modos de realización, la endonucleasa es endonucleasa VIII de *E. coli*. En algunos modos de realización, uno o ambos del primer y segundo producto de extensión de cebador con sitios abásicos se pueden escindir de forma no enzimática, por ejemplo, mediante tratamiento térmico. En algunos modos de realización, la eficacia de la escisión térmica puede incrementarse mediante la adición de compuestos de poliamina tales como espermidina, espermina, trietilentetramina y trimetilendiamina, véase la patente de EE. UU. n.º 8.669.061. En otros modos de realización, la reacción de extensión se realiza en presencia de trifosfato de desoxiinosina (dTTP).

Debido a que el dITP se incorpora mediante ADN polimerasas opuestas a cualquier base, el dITP en la mezcla de reacción puede reemplazar parcial o completamente a cualquiera de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. En algunos modos de realización, dITP simplemente se añade a la mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP sin reducir la cantidad de cualquiera de las cuatro bases. En algunos modos de realización, la mezcla de reacción que comprende uno o ambos del primer y segundo producto de extensión de cebador con desoxiinosinas (dl) se puede tratar con una endonucleasa que escinde ADN en sitios dl. En algunos modos de realización, la endonucleasa es endonucleasa V de *E. coli*. En algunos modos de realización, los fragmentos de ADN resultantes de la digestión con exonucleasa se digieren además con exonucleasa o se eliminan de la mezcla de reacción por cualquier otro medio (por ejemplo, separación por tamaño).

En algunos modos de realización, la hebra emparejada con el polinucleótido diana monocatenario original con código de barras (el segundo producto de extensión de cebador) no se elimina mediante endonucleasas, sino que se vuelve no amplificable en la etapa de amplificación. En este modo de realización, solo el sitio de unión de cebador contiene nucleótidos no convencionales tales como desoxiuracilo o desoxiinosina o 1',2'-didesoxirribosa Int. La digestión con endonucleasa degrada la parte del sitio de unión de cebador del segundo producto de extensión de cebador evitando el recocido y amplificación del cebador. En modos de realización, el cebador es un cebador universal. En este modo de realización, un oligonucleótido que contiene el sitio de unión de cebador se sintetiza mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica que permite incorporar nucleótidos no convencionales tales como desoxiuracilo (dU) o desoxiinosina (dl) o 1',2'-didesoxirribosa Int. En el modo de realización donde se incorpora dU, la mezcla de reacción se pone en contacto con uracil-N-ADN glucosilasa (UNG). UNG escinde el uracilo del ADN dejando un sitio abásico. La muestra se pone en contacto además con una endonucleasa que escinde el ADN en sitios abásicos. En algunos modos de realización, la endonucleasa es endonucleasa VIII de *E. coli*. Después de la digestión con endonucleasa, el sitio de unión de cebador ya no admite la unión y extensión del cebador.

En el modo de realización donde dl se incorpora, la mezcla de reacción se pone en contacto con una endonucleasa tal como la endonucleasa V de *E. coli*. Después de la digestión con endonucleasa, el sitio de unión de cebador ya no admite la unión y extensión del cebador.

f. UD-PETE para construcción y análisis de colecciones

En el presente documento se describen procedimientos unidireccionales de enriquecimiento de diana de extensión de doble cebador (UD-PETE) para enriquecer una pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes a partir de una muestra. Los polinucleótidos diana enriquecidos pueden ser una colección para análisis posterior (por ejemplo, una colección de secuenciación de alto rendimiento). En algunos modos de realización, la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes incluye polinucleótidos diana que codifican, o que codifican al menos, 100; 1.000; 5.000; 15.000; 20.000; 30.000; 40.000; 50.000; 100.000; 250.000; 500.000; o 1.000.000 secuencias diana diferentes. En algunos casos, al menos alguna proporción de las diferentes secuencias diana se superponen en al menos 1 nucleótido, pero no se superponen en todos los nucleótidos.

La pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes puede ser, por ejemplo, o incluir un panel de polinucleótidos diana que están implicados en, o son útiles para, el diagnóstico o la monitorización del cáncer. Como otro ejemplo, la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes puede ser, por ejemplo, o incluir un panel de polinucleótidos diana que están implicados en, o son útiles para, el diagnóstico o monitorización de una enfermedad autoinmunitaria, tal como esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico. Como aún otro ejemplo, la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes puede ser, por ejemplo, un subconjunto, o todos, o sustancialmente todos (por ejemplo, > 90 %), dianas de receptores inmunes (por ejemplo, receptores de linfocitos B (BCR), receptores de linfocitos T (TCR), TCR γ/δ , TCR α/β , cadenas β de TCR, cadenas δ de TCR, cadenas α de TCR, cadenas γ de TCR, cadenas pesadas de BCR, cadenas ligeras de BCR, cadenas κ de BCR, cadenas λ de BCR o una combinación o subconjunto de una combinación de uno o más de los mismos). En algunos casos, la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes pueden ser todos o sustancialmente todos (por ejemplo, > 90 %), exomas en una muestra genómica. En algunos casos, la combinación de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes codifica toda o sustancialmente toda (por ejemplo, > 90 %) la secuencia genómica en una muestra. En algunos casos, la combinación de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes codifica una fracción (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 45 %), una fracción sustancial (por ejemplo, aproximadamente o al menos aproximadamente un 50 %, 75 % o 90 %) o sustancialmente todas (por ejemplo, al menos un 95 %, 99 %, 99,9 % o 99,99 %), de las secuencias de ARNm en la muestra.

En general, los procedimientos implican realizar una o más de las reacciones de extensión e hibridación de primeros cebadores específicos de diana anteriores en una mezcla de reacción (por ejemplo, en una sola mezcla de reacción) usando una pluralidad de primeros cebadores específicos de diana estructuralmente diferentes que hibridan con una pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes para generar de este modo una pluralidad de primeros cebadores específicos de diana extendidos. En algunos casos, los polinucleótidos monocatenarios diana o no diana, o ambos, en una mezcla de reacción se eliminan usando uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la eliminación puede incluir digestión con exonucleasa monocatenaria. Adicionalmente o de forma alternativa, la eliminación puede incluir la inmovilización de productos bicatenarios que contienen un primer

producto de extensión de cebador específico de diana ligado por afinidad (por ejemplo, biotinilado) y el lavado de polinucleótidos no inmovilizados. En algunos casos, el primer cebador específico de diana se inmoviliza porque está unido covalentemente a una superficie sólida (por ejemplo, antes o después de la hibridación con el polinucleótido diana o antes o después de la extensión del primer cebador específico de diana que se hibrida con el polinucleótido diana). En dichos casos, los productos bicatenarios que contienen el primer cebador específico de diana inmovilizado pueden lavarse para eliminar los polinucleótidos no inmovilizados. Los procedimientos y composiciones para unir covalentemente un cebador específico de diana a una superficie sólida son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aquellos que utilizan químicas basadas en N-hidroxisuccinimida, epoxi o aldehído. En algunos casos, la eliminación también elimina primeros cebadores específicos de diana no extendidos (por ejemplo, digestión con exonucleasa monocatenaria).

De forma similar, el procedimiento puede incluir además realizar una o más de las reacciones de extensión e hibridación de segundos cebadores específicos de diana anteriores (por ejemplo, en una sola mezcla de reacción) usando una pluralidad de segundos cebadores específicos de diana estructuralmente diferentes que hibridan con la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes para generar de este modo una pluralidad de segundos cebadores específicos de diana extendidos.

En algunos modos de realización, el procedimiento puede incluir recortar regiones salientes 3' de la pluralidad de polinucleótidos diana hibridados estructuralmente diferentes producidos por la extensión del segundo cebador específico de diana como se describe en el presente documento (por ejemplo, con una exonucleasa de ADN monocatenario de 3' a 5'). De forma alternativa, el procedimiento puede incluir hibridar los segundos cebadores específicos de diana de modo que las regiones salientes 3' de la pluralidad de polinucleótidos diana hibridados estructuralmente diferentes estén ausentes (es decir, el nucleótido 3' terminal del polinucleótido diana se hibrida con el segundo cebador específico de diana). En dichos modos de realización, el procedimiento puede incluir extender un extremo 3' del polinucleótido diana hibridado (por ejemplo, un extremo 3' recortado), incorporando de este modo la secuencia 5' adicional del segundo producto de extensión de cebador (por ejemplo, un código de barras tal como un código de barras UID) como se describe en el presente documento. En algunos casos, la extensión del extremo 3' del polinucleótido diana hibridado se realiza después de la unión (por ejemplo, ligadura) de un primer o de un primer y segundo adaptador, incorporando, por tanto, una secuencia adaptadora que incluye, pero no se limita a, una secuencia de unión de cebador universal, un código de barras (por ejemplo, un código de barras MID) o la combinación de los mismos.

En algunos modos de realización, la pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes que tienen uno o más códigos de barras incorporados, uno o más sitios de unión de cebadores universales, o una combinación de los mismos, se puede recuperar de productos bicatenarios que los contienen. Los procedimientos para recuperar dichos polinucleótidos diana se describen anteriormente. En algunos casos, los polinucleótidos diana se recuperan mediante digestión con exonucleasa de ADN bicatenario de 5' a 3' de polinucleótidos diana bloqueados en 5' (por ejemplo, polinucleótidos diana unidos en el extremo 5' a un adaptador universal bloqueado en 5'). En algunos casos, los polinucleótidos diana se recuperan por inmovilización del polinucleótido diana marcado con ligando de afinidad (por ejemplo, biotinilado) (por ejemplo, polinucleótidos diana unidos en el extremo 5' a un adaptador universal marcado con ligando de afinidad) o un polinucleótido diana inmovilizado de otro modo y mediante lavado, derretido, o derretido y lavado, del producto de extensión del segundo cebador específico de diana hibridado. En algunos casos, los polinucleótidos diana se recuperan por inmovilización del producto de extensión del segundo cebador específico de diana marcado con ligando de afinidad (por ejemplo, biotinilado) (por ejemplo, productos de extensión del segundo cebador específico de diana unidos en el extremo 5' a un adaptador universal marcado con ligando de afinidad) o un polinucleótido diana inmovilizado de otro modo, lavando, fundiendo o fundiendo y lavando, el polinucleótido diana hibridado, y recuperando el polinucleótido diana monocatenario en solución. En algunos casos, el polinucleótido diana inmovilizado se une en el extremo 5' a un adaptador universal que se une covalentemente a una superficie sólida (por ejemplo, por medio de química basada en N-hidroxisuccinimida, aldehído o epoxi).

En algunos modos de realización, se recuperan productos bicatenarios que contienen primeros cebadores específicos de diana y/o segundos cebadores específicos de diana que se hibridan con polinucleótidos diana. Por ejemplo, los productos bicatenarios se pueden inmovilizar mediante la inmovilización del producto de extensión del segundo cebador específico de diana marcado que se hibrida con el polinucleótido diana. En algunos casos, el producto de extensión del segundo cebador específico de diana marcado es un producto de extensión del segundo cebador específico de diana unido en el extremo 5' a un adaptador universal marcado, en el que el marcador es un ligando de afinidad (por ejemplo, biotina) o un marcador adecuado para la unión covalente a una superficie sólida. A continuación, el producto bicatenario inmovilizado se puede lavar y eluir. Por ejemplo, una unión covalente entre el marcador y la superficie sólida se puede escindir para eluir el producto bicatenario.

En algunos modos de realización, el procedimiento incluye unir (por ejemplo, ligar) un primer y segundo adaptador universal (por ejemplo, que contiene sitios de unión de cebador universal directo e inverso respectivamente) a extremos opuestos de una pluralidad de productos bicatenarios estructuralmente diferentes generados por la hibridación y extensión del segundo cebador específico de diana. En algunos modos de realización, los segundos cebadores específicos de diana extendidos se recuperan de los productos bicatenarios generados por hibridación y extensión del segundo cebador específico de diana como se describe en el presente documento. En dichos modos de

realización, el procedimiento puede incluir además unir (por ejemplo, ligar) un primer y segundo adaptador universal (por ejemplo, que contiene sitios de unión de cebador universal directo e inverso respectivamente) a extremos opuestos de una pluralidad de segundos cebadores específicos de diana extendidos y recuperados estructuralmente diferentes.

En algunos modos de realización, un primer, un segundo o un primer y segundo adaptador universal se une mediante ligadura de puente usando un adaptador que hibrida, por ejemplo, con una región puente de un segundo cebador específico de diana o una región de cola generada por una reacción de transferasa terminal, como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, un primer, un segundo o un primer y segundo adaptador universal se une mediante tagmentación (por ejemplo, unión de adaptador mediada por transposasa), como se describe en el presente documento.

Uno o más de la pluralidad anterior de i) productos bicatenarios unidos al adaptador; ii) productos de extensión de segundos cebadores específicos de diana unidos al adaptador; o iii) los polinucleótidos diana unidos al adaptador pueden amplificarse mediante amplificación universal (por ejemplo, PCR universal). Los productos bicatenarios unidos al adaptador que pueden amplificarse mediante amplificación universal incluyen los que contienen productos de extensión de segundo cebador, los que contienen un polinucleótido diana (por ejemplo, polinucleótido diana recortado, polinucleótido diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID, con código de barras MID o la combinación de los mismos), o polinucleótido diana recortado y con código de barras) o los que contienen un producto de extensión de segundo cebador específico de diana hibridado con uno de los polinucleótidos diana anteriores.

Los productos de extensión de segundo cebador específico de diana unidos al adaptador que pueden amplificarse mediante amplificación universal incluyen, pero no se limitan a, productos de extensión de segundo cebador específico de diana con cola unidos al adaptador, productos de extensión de segundo cebador específico de diana recuperados y unidos al adaptador, o productos de extensión de segundo cebador específico de diana con cola unidos al adaptador y recuperados, como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos diana unidos al adaptador que pueden amplificarse mediante amplificación universal incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos diana recortados unidos al adaptador, polinucleótidos diana con código de barras (por ejemplo, con código de barras UID, con código de barras MID o una combinación de los mismos) o polinucleótido diana recortada y con código de barras, como se describe en el presente documento.

En el presente documento se describen procedimientos para analizar secuencias polinucleotídicas diana enriquecidas a partir de una muestra. En general, los procedimientos incluyen realizar uno o más de los procedimientos de UD-PETE descritos en el presente documento para obtener una muestra enriquecida para un polinucleótido diana, una pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes, segundos cebadores específicos de diana extendidos, una pluralidad de segundos cebadores específicos de diana extendidos estructuralmente diferentes o productos de amplificación de los mismos. En algunos casos, los polinucleótidos enriquecidos, cebadores extendidos o productos de amplificación de los mismos contienen una región adaptadora específica de plataforma de secuenciación en uno o ambos extremos que es compatible para la secuenciación con una o más plataformas de secuenciación de alto rendimiento conocidas (por ejemplo, una plataforma de secuenciación de Illumina, Complete Genomics, BGI, 454 Life Sciences, Ion Torrent, Pacific Biosciences, Genia u Oxford Nanopore). En algunos casos, la región adaptadora específica de plataforma de secuenciación se une uniendo un primer, un segundo, o un primer y segundo adaptador(es) universal(es) como se describe anteriormente. Los polinucleótidos enriquecidos, cebadores extendidos o productos de amplificación de los mismos contienen una región adaptadora específica de plataforma de secuenciación en uno o ambos extremos que es compatible para la secuenciación con una o más plataformas de secuenciación de alto rendimiento conocidas que pueden secuenciarse usando la plataforma y los protocolos apropiados.

Los procedimientos de UD-PETE descritos en el presente documento pueden proporcionar enriquecimiento de polinucleótidos diana, copias de los mismos (por ejemplo, productos de extensión de segundo cebador específico de diana) o productos de amplificación de los mismos a partir de una muestra, de modo que la secuenciación de alto rendimiento de la muestra enriquecida proporcione un alto número de lecturas vinculadas a la diana (por ejemplo, un gran número de lecturas vinculadas a la diana en comparación con PETE de un solo cebador, captura híbrida o PCR múltiple, o una combinación de los mismos). Como se usa en el presente documento, "lecturas vinculadas a la diana" se refiere a lecturas de secuencia de polinucleótidos que contienen una región que es sustancialmente igual o complementaria a la región de hibridación 3' de los segundos cebadores específicos de diana usados en la reacción de extensión del segundo cebador específico de diana.

En algunos casos, "lecturas vinculadas a la diana" se refiere adicionalmente o de forma alternativa a lecturas de secuencia de polinucleótidos que contienen una región que es sustancialmente igual o complementaria a la región de hibridación 3' de los primeros cebadores específicos de diana usados en la reacción. Típicamente, la región es la misma o complementaria a una secuencia de un polinucleótido que se espera que hibride con el primer, el segundo o el primer y el segundo cebador específico de diana en condiciones típicas de hibridación (por ejemplo, condiciones de hibridación de cebador específico de diana) usado en aplicaciones de PETE. Dichas condiciones de hibridación pueden incluir, pero no se limitan a, hibridación en tampón de amplificación isotérmica (Tris-HCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM), KCl 50 mM, MgSO₄ 2 mM, TWEEN® 20 al 0,1 %, pH 8,8 a 25 °C) a una temperatura de aproximadamente

40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C o 70 °C.

En algunos casos, las lecturas vinculadas a la diana producidas por la secuenciación de alto rendimiento de una muestra generada por uno o más de los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser de al menos, o de al menos aproximadamente, un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más.

La invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, con propósitos de claridad y entendimiento.

Cuando exista un conflicto entre la presente solicitud y una referencia proporcionada en el presente documento, prevalecerá la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1. Eliminación del segundo producto de extensión de cebador de la hebra original.

En este ejemplo, las etapas de hibridar y extender un primer cebador específico de diana para formar un primer producto bicatenario, eliminar polinucleótidos diana y no diana monocatenarios que no están hibridados con el cebador específico de diana extendido, hibridar y extender un segundo cebador específico de diana para formar un segundo producto bicatenario que comprende un código de barras se realizan como se describe en general en el presente documento, excepto que el segundo producto de extensión de cebador se ha sintetizado en presencia de desoxiuracilo y se usa una mezcla de UNG y endonucleasa VIII para eliminarlo como se describe a continuación.

20 µl de la reacción de extensión de cebador se mezcló con el tampón y la mezcla de dos enzimas (USER®, New England BioLabs, Mass.) según lo recomendado por el fabricante y se incubó durante 10 minutos a 37 grados. El ADN no degradado (la hebra original) se separó de los productos de degradación y la mezcla de reacción usando microesferas KapaPure SPRI (KAPA). El ADN purificado se analizó mediante qPCR.

La FIG. 4 muestra valores de Ct de la PCR (Cq) de la reacción de amplificación realizada con y sin la eliminación de la segunda hebra. Con la digestión, la cantidad total de hebras amplificables de ADN se reduce a la mitad (solo 1 hebra de las 2 en el ADN bicatenario tiene un uracilo incorporado). Como se esperaba, los datos muestran esta reducción del 50 % como un incremento de 1 ciclo en Ct de la PCR.

Ejemplo 2

Las colecciones se prepararon a partir de 50 ng de ADN genómico humano masculino Promega, se cortaron usando Covaris E220 y una mezcla de 117 cebadores específicos de diana. Estas colecciones se secuenciaron para determinar el éxito del enriquecimiento de las regiones diana durante la preparación de la colección.

La preparación de la colección comenzó con el corte de ADN de alta calidad usando corte físico de Covaris a través de sonicación como se muestra a continuación.

Para cortar físicamente el ADN genómico humano, se usó un sistema Covaris E220. El baño de agua del instrumento se llena hasta el nivel de agua 6 y se deja degasificar y enfriar a 7 °C. Una vez completado, se carga un máximo de 5 µg y 130 µl de ADN genómico (promega masculino, catálogo n.º G152A) en Tris 10 mM - EDTA 1 mM, pH 8,0 en un tapón de ajuste de fibra AFA de microTUBO (PN 520045). A continuación, las muestras se colocan en una bandeja de 96 placas de microTUBO de tapón roscado (PN 500282). La bandeja se coloca en la posición inicial y comienza el corte según las pautas de tamaño proporcionadas por Covaris. Se usó un intensificador (PN 500141), pero no el difuminado en Y, según las pautas de Covaris. Para un tamaño de pico diana medio de 300 pb, se establecieron los siguientes parámetros: La potencia de incidencia pico (W) se establece en 140, el factor de trabajo se establece en el 10 %, los ciclos por ráfaga se establecen en 200 y el tiempo de tratamiento se establece en 80 s. Una vez completado, se retiran las muestras del Covaris E220 y se transfiere el ADN cortado a tubos de microcentrifugadora.

El ADN fragmentado se procesó en un bioanalizador AGILENT para evaluar el éxito de corte.

A continuación, se usó ADN cortado como el ADN de entrada en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1 descrita en la tabla 2.

Tabla 2

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	Total 50 ng	1 ng/ul
Mezcla maestra múltiple KAPA 2G	10	1x

Componente	ul en reacciones	Concentración final
117 cebadores biotinilados específicos de diana	1,5	300 nM en total, 2,56 nM cada uno
dATP	1,9	3,8 mM
MgCl ₂	5	5 mM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

A continuación, las muestras se incubaron como se describe en la tabla 3.

Tabla 3

Etapas	°C	Tiempo	Rampa de temperatura
Desnaturalización	95	5 min	Estándar a 80 °C
	80	1 segundo	0,1-0,3 °C/segundo a 60 °C
Hibridación	60	10 min	Estándar a 65 °C
Extensión	65	2 min	Estándar a 4 °C
	4	FIJO	

Después de la hibridación y extensión con cebadores biotinilados, las muestras se mezclaron en una proporción de 1:1 con microesferas T1 de estreptavidina Dynabeads™ MyOne™. Estas microesferas se prepararon antes de la adición a las muestras de ADN lavando cuatro veces con tampón de unión y lavado 1x (B&W) y volviendo a suspender en tampón 2x B&W. La composición del tampón B&W se describe en la tabla 4.

Tabla 4

Componente	Final en tampón 2x	Final en tampón 1x
Tris-HCl (pH 7,5)	40 mM	20 mM
EDTA	2 mM	1 mM
NaCl	2 M	1 M
Tween	0,1 %	0,05 %
Agua	-	-

Las muestras se incubaron con 50 ul de microesferas MyOne™ durante 10 minutos a temperatura ambiente en un rotor. Una vez que el ADN biotinilado se unió a las microesferas, las muestras se colocaron en un imán durante 3 minutos y a continuación se eliminó y desechó el sobrenadante. Las microesferas se lavaron con el tampón 1x B&W descrito en la tabla 4 cuatro veces para eliminar el ADN no biotinilado. A continuación, las muestras se lavaron con Tris 10 mM pH 7,5 para eliminar el exceso de sales y a continuación, se volvieron a suspender en 20 ul de Tris 10 mM, pH 7,5.

A continuación, las microesferas resuspendidas se llevaron a la reacción de ligadura para ligar las secuencias adaptadoras al extremo 3' del ADN extendido en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1. La composición de la reacción de ligadura se describe en la tabla 5.

Tabla 5

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Adaptador TA	1	20 mM
Tampón de ligadura KAPA*	10	1x
Enzima de ligadura KAPA*	5	1x
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

*Del kit de preparación de la colección de KAPA LTP

Se incubaron reacciones de ligadura a 20 °C durante 30 minutos.

Después de la ligadura, las muestras se colocaron en un imán a temperatura ambiente durante 1-3 minutos, se eliminó el sobrenadante y las muestras se lavaron dos veces con el tampón 1x B&W descrito en la tabla 4.

A continuación, las muestras se lavaron con Tris 10 mM pH 8,0 para eliminar el exceso de sales y a continuación, se volvieron a suspender en 20 µl de Tris 10 mM, pH 7,5.

- 5 A continuación, estas muestras se llevaron a la reacción de hibridación del cebador 2 que se describe en la tabla 6. Durante esta reacción, los cebadores específicos de diana con partes no internas, equivalentes al adaptador de secuenciación, se hibridan en dirección 5' de los cebadores añadidos en la hibridación y extensión del cebador 1.

Tabla 6

10

Componente	µl en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Tampón A KAPA2G	10	1x
117 cebadores específicos de diana no internos	1,5	300 nM en total, 2,56 nM cada uno
Agua	Hasta 50 µl	n.d.

Las reacciones de hibridación del cebador 2 se incubaron a 50 °C durante 90 minutos. A continuación, las muestras se lavaron como se describe para las reacciones de ligadura. Las muestras se volvieron a suspender en 20 µl de Tris 10 mM, pH 7,5.

15

Las microesferas resuspendidas se llevaron a continuación a la reacción de extensión 2. Esta reacción permitió la extensión del cebador 2 y dio como resultado la liberación de moléculas de ADN diana en solución. La composición de la reacción de extensión 2 se describe en la tabla 7.

Tabla 7

20

Componente	µl en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Tampón A KAPA2G	10	1x
dNTP	1	0,2 mM cada uno
ADN polimerasa rápida KAPA2G	1	5 U
Agua	Hasta 50 µl	n.d.

Las muestras de reacción de extensión 2 se incubaron a 50 °C durante 2 minutos y se colocaron a continuación directamente en un imán sobre hielo durante 1-3 minutos.

25

A continuación, se eliminó el sobrenadante (45 µl) sin alterar las microesferas y se añadió a un volumen igual (45 µl) de microesferas SPRI®. Se realizó una limpieza 1x y las muestras se eluyeron en 25 µl de Tris 10 mM, pH 7,5.

- 30 Se realizó una reacción de qPCR para determinar el número de ciclos (Ct + 5) necesarios para amplificar las moléculas capturadas para la secuenciación. Las muestras cruzaron el umbral después de 24 ciclos.

Tabla 8

Componente	µl en reacciones	Concentración final
ADN	2	
Mezcla KAPA HiFi SybrFast Optimizada para Roche LC480 Mezcla lista para inicio en caliente	5	1x
Cebador P1	1,5	750 nM
Cebador de adaptador indexado	1,5	750 nM
Agua	Hasta 50 µl	n.d.

- 35 La última etapa de la preparación de la colección fue la reacción de amplificación. Esta reacción incrementó la concentración de las muestras, completó las secuencias del adaptador de secuenciación y añadió índices de muestra. Los parámetros de reacción de amplificación y de ciclo se describen en las tablas 9 y 10.

Tabla 9

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	20	
Mezcla lista para inicio en caliente KAPA HiFi	25	1x
Cebador P1	1,25	250 nM
Cebador de adaptador indexado	1,25	250 nM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Tabla 10

Etapas	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	1 min	n.d.
Desnaturalización	98	15 s	26 (10 ng) o 28 (50 ng)
Hibridación	60	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	1 min	n.d.
	4	FIJO	n.d.

A continuación, se realizó una limpieza 1x SPRI® del producto de PCR y la colección se eluyó en 25 µl de Tris 10 mM, pH 7,5.

- 10 Las colecciones se secuenciaron en el sistema Illumina MiSeq usando químicas v3. Las colecciones se prepararon usando pautas estándar para desnaturalización y dilución.

15 Los resultados de la secuenciación para 50 ng de ADN cortado por Covaris incluidos son tasa vinculada a la diana y uniformidad de cobertura. Véase la FIG. 7A-B. La tasa vinculada a la diana se calculó como el porcentaje de lecturas con cebadores que se encontraron cartografiados en la localización correcta y un número de bases en dirección 3' del cebador que coinciden con una secuencia esperada. La uniformidad de cobertura se calcula como un porcentaje del total de sondas que se encuentran dentro de un intervalo de 0,5X y 2X de la uniformidad de cobertura media.

20 Los siguientes oligos se usaron durante la preparación de colecciones:

Para la ligadura	
20170324P5 TA [N/S/E] 501	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCGCTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGT (SEQ ID NO: 1)
20170324P5 C TA33	/5Phos/CTGTCTCTTATACACATCTGACGCTGCGGACGA (SEQ ID NO: 2)
Para qPCR	
Cebador universal C5	AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 3)
20170324P7_N7 0X	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [índice] GTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 4)
Para amplificación final	
20170324P7 N7 0X	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [índice] GTCTCGTGGGCTCGGA GATGTGTATAAGAGACAG (SEQ ID NO: 5)
Cebador universal C5	AATGATACGGCGACCACCGA (SEQ ID NO: 6)

Cebadores internos (cebador 1) usados:

sequencia
/5Biosg/TGAAAGCTGTACCATACCTGT (SEQ ID NO:7)
/5Biosg/AGGTTAATATCCGCAATGACTTG (SEQ ID NO:8)
/5Biosg/AGATGATCCGACAACTGAGAG (SEQ ID NO:9)
/5Biosg/TACGTCTCTCCGACCAC (SEQ ID NO:10)
/5Biosg/CGCAGCCTGTACCCAGTG (SEQ ID NO:11)
/5Biosg/GCGGAAGATGAGATTTCGGAT (SEQ ID NO:12)
/5Biosg/GTtagctcatTTTTGTTAATGGTGG (SEQ ID NO:13)
/5Biosg/TTAACTTTTCTTTTAGTTGTGCTGA (SEQ ID NO:14)
/5Biosg/GTATGCAACATTTCTAAAGTTACCTAC (SEQ ID NO:15)
/5Biosg/AGACCATATACCCACCACAG (SEQ ID NO:16)
/5Biosg/CTGGAAGGGGACGAACTGGT (SEQ ID NO:17)
/5Biosg/CGACCCAGTTACCATAGCAA (SEQ ID NO:18)
/5Biosg/AGAAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAG (SEQ ID NO:19)
/5Biosg/CAITTTAAATTTTCTTTCTAGGTGAAG (SEQ ID NO:20)
/5Biosg/GGCTTGGCCGAGGTCTC (SEQ ID NO:21)
/5Biosg/CAGCACCATGGGCACGTC (SEQ ID NO:22)
/5Biosg/GAGAGGTGGAAGCGAGAG (SEQ ID NO:23)
/5Biosg/CACTCTTGCCACACCGC (SEQ ID NO:24)
/5Biosg/CTGTATTTATTTCAAGTGTACTTACCTG (SEQ ID NO:25)
/5Biosg/TTATATTCAATTTAAACCCACCTATAATGG (SEQ ID NO:26)
/5Biosg/GTATCAAAGAATGGTCTCGCAC (SEQ ID NO:27)
/5Biosg/ACACACACAAATAGCCGTATA (SEQ ID NO:28)
/5Biosg/TCTATTTCTTTCTTTGTAGTGCCA (SEQ ID NO:29)
/5Biosg/TGATTTCTGTTTTTACCTCCTAAAGAA (SEQ ID NO:30)
/5Biosg/ATCTTTAAAGAGAAATTTGCTAAAGCTGTG (SEQ ID NO:31)
/5Biosg/ACGTGTTTTGATCAAAGAAGAGG (SEQ ID NO:32)
/5Biosg/AGCCTCACGTTGTGCCAC (SEQ ID NO:33)

/5Bioag/GGATGGCTAGGCGAGGAG (SEQ ID NO:34)
/5Bioag/AGGGACTAGGCGTGGAT (SEQ ID NO:35)
/5Bioag/CCAGCCCTAGGGTGGT (SEQ ID NO:36)
/5Bioag/ACGCTCTTCTCACTCATATCC (SEQ ID NO:37)
/5Bioag/AAGAAATCTTAGACGTAAGCCCCC (SEQ ID NO:38)
/5Bioag/TCCCATACCTCTCAGCG (SEQ ID NO:39)
/5Bioag/GGATGAGTACTCTGGAGAT (SEQ ID NO:40)
/5Bioag/ATTTTGAGTTAGACTGGAACT (SEQ ID NO:41)
/5Bioag/GGGCAGTGTAGGAAAGAG (SEQ ID NO:42)
/5Bioag/TGCTTACCTCGCTTAGTGC (SEQ ID NO:43)
/5Bioag/GCCGGGATGTGATGAGA (SEQ ID NO:44)
/5Bioag/CAGGGGTAGAGGCAAGC (SEQ ID NO:45)
/5Bioag/AGGGCACTGACCAACCAC (SEQ ID NO:46)
/5Bioag/TGTTTCTGTCATCCAATACTCC (SEQ ID NO:47)
/5Bioag/AGTGAGGAATCAGAGGCT (SEQ ID NO:48)
/5Bioag/GTGCTGTGACTGCTGTAGA (SEQ ID NO:49)
/5Bioag/ACGCCAGGCATTGAAGT (SEQ ID NO:50)
/5Bioag/AAACCGTAGCTGCCCTGG (SEQ ID NO:51)
/5Bioag/TCAAAATGCTTCAGAAATGGAG (SEQ ID NO:52)
/5Bioag/ACAGGTGGAGAGAGTAAAC (SEQ ID NO:53)
/5Bioag/GCCATCGTTGTCCACTGAA (SEQ ID NO:54)
/5Bioag/TGGTGTCCATTGCTTACTTG (SEQ ID NO:55)
/5Bioag/GCAGAGAAGTTATATGCTGAGGAG (SEQ ID NO:56)
/5Bioag/CTGCTGTGAATTGGTGT (SEQ ID NO:57)
/5Bioag/TCAAGAAACACCTTGTTGA (SEQ ID NO:58)
/5Bioag/CACCGCATCGACTCCACC (SEQ ID NO:59)
/5Bioag/CAGCTGTTCCGGAAGAAA (SEQ ID NO:60)
/5Bioag/TGCAGATTGGGCTTGGG (SEQ ID NO:61)
/5Bioag/TGGAAATTTCTGGGCCATGA (SEQ ID NO:62)
/5Bioag/ACAGAGAAATGTTGACAGATTGAG (SEQ ID NO:63)
/5Bioag/TCAATAGTGCAGATGGGAGG (SEQ ID NO:64)
/5Bioag/GCGGGTCTCTCGGAGGAA (SEQ ID NO:65)
/5Bioag/AGAAGCAGAGAAATACCCCT (SEQ ID NO:66)
/5Bioag/CGACTTTGTGACCTTCGGC (SEQ ID NO:67)
/5Bioag/CCAATGACTGTTTACAATGCC (SEQ ID NO:68)
/5Bioag/TTATTTATTTACAGAGTAACAGACTAGC (SEQ ID NO:69)
/5Bioag/CCAACTGACCAAACTGTTCTTATAC (SEQ ID NO:70)
/5Bioag/TGATGCTTGGCTCTGGAAT (SEQ ID NO:71)
/5Bioag/CGAAGACCTAGCCTTAGAT (SEQ ID NO:72)
/5Bioag/GTTCGTATTATAGTCTGATTGATGG (SEQ ID NO:73)
/5Bioag/CTTATGATTCATCAGGAGAGCAITTA (SEQ ID NO:74)
/5Bioag/TCGGATCCCAACCTTTAC (SEQ ID NO:75)
/5Bioag/GCTATGGCTTCTCTAGATAGAAAC (SEQ ID NO:76)
/5Bioag/TTTTCATGAAGATGCATACAACG (SEQ ID NO:77)
/5Bioag/GAAGAATGTAATTGATAATCTTACCTCTT (SEQ ID NO:78)
/5Bioag/GCTGCTCGCAACGTCTCTC (SEQ ID NO:79)
/5Bioag/CGTTTGGAAAGCTAGTGGTTC (SEQ ID NO:80)
/5Bioag/TCCTCAGAGTGTCTTAATGAC (SEQ ID NO:81)
/5Bioag/CCATCACCACTTACCTTGTG (SEQ ID NO:82)
/5Bioag/CAGAGACTTGGCAGCCAG (SEQ ID NO:83)
/5Bioag/AGAAATATCTCTTACTCATGGT (SEQ ID NO:84)
/5Bioag/GCTTTTACTGATTACGTAATAACAGAT (SEQ ID NO:85)
/5Bioag/CTTTTAAAGTGTAGCCATAGTATGAT (SEQ ID NO:86)
/5Bioag/TTCAGCAATCGAAAGGACAT (SEQ ID NO:87)
/5Bioag/ATGTGTTTTCATACAGACACTTCATT (SEQ ID NO:88)

/SBiosg/TCAACTACAGATGGACCA (SEQ ID NO:89)
/SBiosg/TGAGGAATTGTCTTGGCGAG (SEQ ID NO:90)
/SBiosg/CCAAGGCATCTCATCTAGTA (SEQ ID NO:91)
/SBiosg/GTCAGACAATTTAATACTGGCAC (SEQ ID NO:92)
/SBiosg/GTICTGAAAAAGATAGAAGTTGGAG (SEQ ID NO:93)
/SBiosg/TTGCAGATCTCCACCACTG (SEQ ID NO:94)
/SBiosg/GGICTACCACTGAATTACATTGTG (SEQ ID NO:95)
/SBiosg/CGGAAATTCAAATAGGACATGTTCTATG (SEQ ID NO:96)
/SBiosg/GAATGAAAGATGGGCAAGACC (SEQ ID NO:97)
/SBiosg/CACATTTGGACAGCAGGAAT (SEQ ID NO:98)
/SBiosg/AGGCAGATCAGCTCCATCC (SEQ ID NO:99)
/SBiosg/GACTTATTGTGTAGAGATACTCCAATA (SEQ ID NO:100)
/SBiosg/TCAGACGACACAGGAAGC (SEQ ID NO:101)
/SBiosg/AGCACCTAGAACCAATCC (SEQ ID NO:102)
/SBiosg/CGAAATCTCCCTCCAAAGTG (SEQ ID NO:103)
/SBiosg/TGAGAGTCGTTGATTGCCA (SEQ ID NO:104)
/SBiosg/GACAAACCATGCCACCAAG (SEQ ID NO:105)
/SBiosg/TGAAAAGAGAGAGAGTGGACC (SEQ ID NO:106)
/SBiosg/ACGGAAAGTACTCCAGATGG (SEQ ID NO:107)
/SBiosg/GTTCAGGAAATGACAAATGGGA (SEQ ID NO:108)
/SBiosg/GTCTTTCTGTAGGCTGGAT (SEQ ID NO:109)
/SBiosg/CACAAATGGATCCAGACAAT (SEQ ID NO:110)
/SBiosg/AGTTGTTAAACATATCTATTATGACTTG (SEQ ID NO:111)
/SBiosg/GTGAGGGCTGAGGTGACC (SEQ ID NO:112)
/SBiosg/GCCAGTTAACGTCTCTCTTCT (SEQ ID NO:113)
/SBiosg/TTCTGGCCACCATGCGAA (SEQ ID NO:114)
/SBiosg/CTCAGCAGGCTCTTCTC (SEQ ID NO:115)
/SBiosg/TCAGATCACAGATTTGGGC (SEQ ID NO:116)
/SBiosg/CACGTGTGAAGTCTCCT (SEQ ID NO:117)
/SBiosg/CTCCGGGCTGAATTC (SEQ ID NO:118)
/SBiosg/TGCGGCATGGTACTGC (SEQ ID NO:119)
/SBiosg/CGATGGCCAGCTCTCA (SEQ ID NO:120)
/SBiosg/CACGGTCTGGTGAGAGT (SEQ ID NO:121)
/SBiosg/TTTITCTTAGTCTTTCTTTGAAGC (SEQ ID NO:122)
/SBiosg/TCATATTCATAAGCGCTACTAGA (SEQ ID NO:123)

Cebadores externos (cebador 2) usados:

secuencia
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWTTAATCAACTGATGCAAACTCTTG (SEQ ID NO:124)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWAAATAATGCTCTAGTACCTGTAGA (SEQ ID NO:125)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWTCCTTTAATACAGAATATGGGTAAGAT (SEQ ID NO:126)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWGTAAACCTTGCAACAACCTC (SEQ ID NO:127)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCCATGAGGCAGAGCATACG (SEQ ID NO:128)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWACATCTGCTAGCTGAGGG (SEQ ID NO:129)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWGTCTTTTGTGTTTCTTGATAGTATTAATG (SEQ ID NO:130)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWTTCTCTAAGTGCAAAAGATAACT (SEQ ID NO:131)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWAGTGTCTTTTAAATACCTGTTAAGTTT (SEQ ID NO:132)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCCAGATGCAATATCTTTT (SEQ ID NO:133)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWTCAGCAATCACTGTAAAGC (SEQ ID NO:134)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCTAATGTATATATGTTCTTAAATGGCTACG (SEQ ID NO:135)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCCAGACCAAGAGAAACCT (SEQ ID NO:136)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWAAATAGTTAAGATGAGTCATATTTGTGG (SEQ ID NO:137)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCTGTGGGTGGAGAGCTG (SEQ ID NO:138)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWGTCACTGTGTTCCCAAC (SEQ ID NO:139)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNWCCGTTTGATGCTGCTCCT (SEQ ID NO:140)

ES 2 855 748 T3

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTGGATGGTCAGCGCACT (SEQ ID NO:141)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTATGATTTTCAGAAAAACAGATCT (SEQ ID NO:142)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTATAATTACTCTTAATGTCAGCTTAT (SEQ ID NO:143)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTAAATGGTCAGAGAAACCTTTATC (SEQ ID NO:144)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTGAGTTGTTTACCATGATAACG (SEQ ID NO:145)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCGAAATAACACAAATTTTAAAGTTACTGA (SEQ ID NO:146)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTATTACACAGTATCCTCGACAT (SEQ ID NO:147)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTGAAAGAGTGAAGGATATAGGATAC (SEQ ID NO:148)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTGTTCTTCTCAGACATTCA (SEQ ID NO:149)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCACAGAGAAGTTGTTGAGGG (SEQ ID NO:150)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGCCTGTGACTGCAGAGACAA (SEQ ID NO:151)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTGTGATGGGCTTGTC (SEQ ID NO:152)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTACAGCGAGAGAGGAGCG (SEQ ID NO:153)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGGTAGGATCCAGCCCA (SEQ ID NO:154)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTCCTCCAAAGCCACAA (SEQ ID NO:155)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTGGGGTGTGTGTC (SEQ ID NO:156)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTCTCCATTCCAGG (SEQ ID NO:157)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMACAGTCAAGAAGAAACGGC (SEQ ID NO:158)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGAGGAGCTGGTGTGTTG (SEQ ID NO:159)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMACGCTTCTTGCTGCT (SEQ ID NO:160)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGAGAGTAAAGGAGATTCCCC (SEQ ID NO:161)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAAATCGTAAAGAGTGGGC (SEQ ID NO:162)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCCCCTACTGCTACCTG (SEQ ID NO:163)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCACCACACTATGTCGAAAG (SEQ ID NO:164)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGGCCAGACCTAAGAGCAATC (SEQ ID NO:165)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGCCTCACAACTCGTCAAT (SEQ ID NO:166)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMACAAAGAAATCAGGGGGAT (SEQ ID NO:167)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGCAGAGAGCCAGACGGA (SEQ ID NO:168)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTTCACTGTTTCCAAAGGATCAA (SEQ ID NO:169)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTCATGTTTGTATGCCATAG (SEQ ID NO:170)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTATGATCTTGGAGCAG (SEQ ID NO:171)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAATTTATTTCTTAGCTCTGAGTAT (SEQ ID NO:172)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTGTTACTTCTGGCACTTTAGC (SEQ ID NO:173)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTTTCTGTTAGGTCTGTAGC (SEQ ID NO:174)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGGATTACCAAGACAGACA (SEQ ID NO:175)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGGGTATGGACACGTTTATCC (SEQ ID NO:176)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTGCTCTGGGCGTTTG (SEQ ID NO:177)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGCCGCTCTGGGATTC (SEQ ID NO:178)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGATAAGAATAAACACATACAAGTTGG (SEQ ID NO:179)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTGTTTTGAAGTGTGATTTTCAAT (SEQ ID NO:180)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTTGACCATGACCATGTAAACG (SEQ ID NO:181)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTCACTACCGGGCGAG (SEQ ID NO:182)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTACATTAAATACCATAAAGCATGAACAT (SEQ ID NO:183)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGGAGAATTTTGTGAAACAGACG (SEQ ID NO:184)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGCCCTTTATTTCTCAACTGCC (SEQ ID NO:185)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGGGAAAAATAGCAAAGAAAGCTATATA (SEQ ID NO:186)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTGAAGGTATTAACATCATTTGCTC (SEQ ID NO:187)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCAATCTCTCATAAATCTTTCTCAATG (SEQ ID NO:188)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTTGTGACATTGCATACATCG (SEQ ID NO:189)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTAACTTTCCAATCTACTAATGCTAATA (SEQ ID NO:190)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGAGTGAATTATCTGAGTAAACAA (SEQ ID NO:191)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCGTGTGTAGACAGGTTTCAGTC (SEQ ID NO:192)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCACTAATTTAAGACAAACGCT (SEQ ID NO:193)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCATGACAGATTTTCCCTTACC (SEQ ID NO:194)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTATATATTCAATAACACCAATGAAGA (SEQ ID NO:195)

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGTCTCCACCGTATCTG (SEQ ID NO:196)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTAACTCATCTGGGCCAC (SEQ ID NO:197)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTCAATCCACCCAGCA (SEQ ID NO:198)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTTCATCCACCCAGCA (SEQ ID NO:199)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTCTCTCCAACTAATAGTGATTC (SEQ ID NO:200)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCACAGAGACTTGGCAGCC (SEQ ID NO:201)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGGTCTTATATGCTTTTTGCTT (SEQ ID NO:202)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAGAATGATTGACATAACCTGA (SEQ ID NO:203)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMATTAGCAAGAATAGCCAGAT (SEQ ID NO:204)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGAAGTATATAATGGTCATCTTTATGA (SEQ ID NO:205)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCCATCTATAATGTGCTTAATTTTAGGG (SEQ ID NO:206)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAGTATTTGCGAGTGTTT (SEQ ID NO:207)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGACATATAGACAAITTAAGTCCA (SEQ ID NO:208)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAACATCGACATGATGATAATAGG (SEQ ID NO:209)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAGGAGCTTAGATAGTTCTCG (SEQ ID NO:210)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAACTTCTTCAAGCGAGGT (SEQ ID NO:211)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGCACTTCACTCTCAGGAAG (SEQ ID NO:212)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAACACTTCAATTTCACTAAGTCG (SEQ ID NO:213)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGGCAAGTCTTCAAGAA (SEQ ID NO:214)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCACTCAAGTCCAAACCA (SEQ ID NO:215)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAACCTTCACTAATGCCAAG (SEQ ID NO:216)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTTCTATTAACCAAGAAACATACAGAC (SEQ ID NO:217)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAAGTGAAGTGAATAGGATGTAATC (SEQ ID NO:218)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAAGTCCAGCAGTGTCAC (SEQ ID NO:219)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGTTGAATTTCTTCAAGGAGCG (SEQ ID NO:220)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCTTCTGTCAGTTCACTGATAGTT (SEQ ID NO:221)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGTATCTTCCAGATAGCCCTG (SEQ ID NO:222)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAGTACCTAAAAATAAGCACCTACTG (SEQ ID NO:223)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGATCTTTATACATTTTGCCACG (SEQ ID NO:224)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMAATTAAGAATAATGCTCCAGTTCA (SEQ ID NO:225)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMATTTCAGCCACGGTAATAATT (SEQ ID NO:226)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAAAAATAGCTCAATCTTACCATC (SEQ ID NO:227)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGAAACAGTGAATTTCTTTGATGATAT (SEQ ID NO:228)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGCTGGCACTGCTTTCCA (SEQ ID NO:229)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGGCACTATCTACAAATG (SEQ ID NO:230)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGTCATGTGCCCTCCT (SEQ ID NO:231)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTCTCCATGATGATCTGTC (SEQ ID NO:232)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGGTGAACACCGCAGCATG (SEQ ID NO:233)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTTGTTCAGTTGGGAGCG (SEQ ID NO:234)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGCAAGACCGGAGACTGGT (SEQ ID NO:235)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCACTTCCGCGGATCTA (SEQ ID NO:236)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAAGTACCGTGCAATC (SEQ ID NO:237)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMCAAGTGTCCAGGAAGCC (SEQ ID NO:238)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMGACACAGTCAACACAACTCTTTGTAC (SEQ ID NO:239)
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGWNNNNNNMTGACTCCACGAGAACTTGATC (SEQ ID NO:240)

Ejemplo 3: Panel de 9 dianas

- 5 Se prepararon colecciones a partir de 10 y 50 ng de ADN genómico humano masculino Promega, se cortaron usando KAPA Frag y una mezcla de 9 cebadores específicos de diana. Estas colecciones se secuenciaron en Illumina Miseq para evaluar el éxito del enriquecimiento de las regiones diana durante la preparación de la colección.

10 Se preparó un indicador de bioanálisis de las colecciones finales. La FIG. 8A-B muestra los resultados de secuenciación de alto nivel de las colecciones; a saber, la tasa en diana y la recuperación genómica equivalente (GER) (A), así como la uniformidad de cobertura de sonda (B). La tasa vinculada a la diana se calculó como el porcentaje de lecturas con cebadores que se encontraron cartografiados en la localización correcta y un número de bases en dirección 3' del cebador que coinciden con una secuencia esperada. La uniformidad de cobertura se calculó como un porcentaje del total de sondas que se encuentran dentro de un intervalo de 0,5X y 2X de la uniformidad de cobertura media. Las colecciones preparadas con 10 y 50 ng de ADN de entrada se comportaron de forma similar con respecto

a la tasa vinculada a la diana (58-64 %), GER (~ 12 %) y uniformidad (0,89-1).

La preparación de la colección comenzó con el corte de ADN de alta calidad usando fragmentación KAPA (KAPA Biosystems) como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	Total de 200 ng	4 ng/ul
Tampón de fragmentación KAPA	5	1x
Enzima de fragmentación KAPA	10	1x
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Las muestras se agitaron en vórtex brevemente, se centrifugaron y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Después de la incubación, se añadieron a las reacciones 5 ul de solución de parada de fragmentación KAPA. Posteriormente, se usaron 165 ul de microesferas SPRI® para limpiar las reacciones. El ADN se eluyó en 20 ul de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0 para una concentración final de 10 ng/ul. El ADN fragmentado se procesó en un bioanalizador AGILENT para evaluar el éxito de corte.

A continuación, se usó ADN cortado como el ADN de entrada en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1 descrita en la tabla 12.

Tabla 12

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	Total de 10 o 50 ng	0,2 o 1 ng/ul
Mezcla maestra personalizada KAPA 2G	10	1x
9 cebadores biotinilados específicos de diana	1,5	30 nM en total, 3,3 nM cada uno
dATP	1,9	3,8 mM
MgCl ₂	5	5 mM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

A continuación, las muestras se incubaron como se describe en la tabla 13.

Tabla 13

Etap	°C	Tiempo	Rampa de temperatura
Desnaturalización	95	5 min	Estándar a 80 °C
	80	1 segundo	0,1-0,3 °C/segundo a 60 °C
Hibridación	60	10 min	Estándar a 65 °C
Extensión	65	2 min	Estándar a 4 °C
	4	FIJO	

Después de la hibridación y extensión con cebadores biotinilados, las muestras se mezclaron en una proporción de 1:1 con microesferas T1 de estreptavidina Dynabeads™ MyOne™. Estas microesferas se prepararon antes de la adición a las muestras de ADN lavando cuatro veces con tampón de unión y lavado 1x (B&W) y volviendo a suspender en tampón 2x B&W. La composición del tampón B&W se describe en la tabla 14.

Tabla 14

Componente	Final en tampón 2x	Final en tampón 1x
Tris-Cl-HCl (pH 7,5)	40 mM	20 mM
EDTA	2 mM	1 mM
NaCl	2 M	1 M
Tween	0,1 %	0,05 %
Agua	-	-

Las muestras se incubaron con 50 µl de microesferas MyOne™ durante 10 minutos a temperatura ambiente en un rotor. Una vez que el ADN biotinilado se unió a las microesferas, las muestras se colocaron en un imán durante 3 minutos y a continuación se eliminó y desechó el sobrenadante. Las microesferas se lavaron con el tampón 1x B&W descrito en la tabla 14 cuatro veces para eliminar el ADN no biotinilado y, a continuación, se volvieron a suspender en 20 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

A continuación, las microesferas resuspendidas se llevaron a la reacción de ligadura para ligar las secuencias adaptadoras al extremo 3' del ADN extendido en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1. La composición de la reacción de ligadura se describe en la tabla 15.

Tabla 15

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Adaptador TA	2	20 mM
Tampón de ligadura KAPA*	10	1x
Enzima de ligadura KAPA*	5	1x
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

*Del kit de preparación de la colección de KAPA LTP

Se incubaron reacciones de ligadura a 20 °C durante 30 minutos.

Después de la ligadura, las muestras se colocaron en un imán a temperatura ambiente durante 1-3 minutos, se eliminó el sobrenadante y las muestras se lavaron dos veces con el tampón 1x B&W descrito en la tabla 14.

A continuación, las muestras se volvieron a suspender en 20 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

A continuación, estas muestras se llevaron a la reacción de hibridación del cebador 2 que se describe en la tabla 16. Durante esta reacción, los cebadores específicos de diana con partes no internas, equivalentes al adaptador de secuenciación, se hibridan en dirección 5' de los cebadores añadidos en la hibridación y extensión del cebador 1.

Tabla 16

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Tampón A KAPA2G	10	1x
9 cebadores específicos de diana no internos	1,5	30 nM en total, 3,3 nM cada uno
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Las reacciones de hibridación del cebador 2 se incubaron a 50 °C durante 10 minutos.

A continuación, las muestras se lavaron como se describe para las reacciones de ligadura.

Las muestras se volvieron a suspender en 20 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

Las microesferas resuspendidas se llevaron a continuación a la reacción de extensión 2. Esta reacción permitió la extensión del cebador 2 y dio como resultado la liberación de moléculas de ADN diana en solución. La composición de la reacción de extensión 2 se describe en la tabla 17.

Tabla 17

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Tampón A KAPA2G	10	1x
dNTP	1	0,2 mM cada uno
ADN polimerasa rápida KAPA2G	1	5 U
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Las muestras de reacción de extensión 2 se incubaron a 50 °C durante 2 minutos y se colocaron a continuación directamente en un imán sobre hielo durante 1-3 minutos.

- 5 A continuación, se eliminó el sobrenadante (45 ul) sin alterar las microesferas y se añadió a un volumen igual (45 ul) de microesferas SPRI®. Se realizó una limpieza 1x y las muestras se eluyeron en 25 ul de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

Se realizó una reacción de qPCR para determinar el número de ciclos (Ct + 2) necesarios para amplificar las moléculas capturadas para la secuenciación. La FIG. 9 muestra los Ct obtenidos para cada muestra.

- 10 La última etapa de la preparación de la colección fue la reacción de amplificación. Esta reacción incrementó la concentración de las muestras, completó las secuencias del adaptador de secuenciación y añadió índices de muestra. Los parámetros de reacción de amplificación y de ciclo se describen en las tablas 18 y 19.

15 **Tabla 18**

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	20	
Mezcla lista para inicio en caliente KAPA HiFi	25	1x
Cebador P1	1,25	250 nM
Cebador de adaptador indexado	1,25	250 nM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Tabla 19

Etapas	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	1 min	n.d.
Desnaturalización	98	15 s	26 (10 ng) o 28 (50 ng)
Hibridación	60	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	1 min	n.d.
	4	FIJO	n.d.

- 20 A continuación, se realizó una limpieza 1x SPRI® del producto de PCR y la colección se eluyó en 25 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

Tabla 20

25

Denominación	Secuencia específica de diana biotinilada (cebador interno)
chr9-21970722_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ GGGACGGCCTGAGTCTCC
chr14+105246626_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ CTGGGTGTGCCAGGACAG
chr18+48591980_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ TTGATTGTATAGTCAGATAGTTACTTTAAAAAATT
chr18-48604592_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ GCAGCAGCTGACAGACCTAA
chr18+48604706_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ GGACCGGATTACCCAAGACAG
chr18-485 91738_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ GGAAATAAATGGGAAAGAACATCCTCC
chr13-48919139_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ AATCAGTAACCTTAAAAATTTGTGTTATTTTCG
chr18-48573338_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ ATGTCTCCAATTTCTGAAGCAATTTTG
chr18+48573611_Bio	/5Biosg//iSp18//iSp18//iSp18/ AGCTCATCCTAGTAAATGTGTTACCATAC

Los adaptadores usados en la reacción de ligadura se prepararon a partir de los oligonucleótidos enumerados en la tabla 21.

Tabla 21

Denominación	Secuencia
160201P5_W	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT
160201P5_C_T A19	/5phos/GATCGGAAGAGCGTCGTGT

Los cebadores usados en la hibridación del cebador 2 se enumeran en la tabla 22.

Tabla 22

Denominación	Secuencia específica de diana no interna (cebador externo)
Ochr9-21970772n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWCTCA CGCGCCAATCGGT
Ochr14+105246608n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWAGG CAGCCAGGCAGGAA
Ochr18+48591955n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWAGA AGCCATTGAGAGAGCAAGGTA
Ochr8-48604642n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWCGA AGGTCATCAACACCAATTCCA
Ochr18+48604681n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWAGG ATGAGTTTTGTGAAAGGCTGG
Ochr18-48591788n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWGGA ACACCAATACTCAGGAGCTATA
Ochr13-48919189n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWTATG GACACTACAAAGGAAAGAATAGAAAAAAGTA
Ochr18-48573388n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWGTCC ATTTGTTCAAGTTTTTCCTTTTAAATCAAAT
Ochr18+48573575n	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTWNNNNNWTTGG ATTCTTTAATAACAGCTATAACTACAAATGG

Los cebadores usados en la reacción de qPCR se enumeran en la tabla 23.

Tabla 23

Denominación	Secuencia específica de diana no interna (cebador externo)
OUnivAmp	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG
P1	AATGATACGGCGACCACCGA

Los cebadores usados en la reacción de amplificación se enumeran en la tabla 24.

Tabla 24

Denominación	Secuencia específica de diana no interna (cebador externo)
D70X	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[index]GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTC
P1	AATGATACGGCGACCACCGA

Ejemplo 4: Panel de 117 dianas con ADN de fragmentación KAPA

Se prepararon colecciones a partir de 10 ng de ADN de Coriell (NA12878), se cortaron usando fragmentación KAPA como se describe en el ejemplo 3 y una mezcla de 117 cebadores específicos de diana a 3,4 o 34 nM cada uno en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1. Estas colecciones se secuenciaron en IlluminaNextseq (rendimiento medio 300x).

Se preparó un indicador GX de LabChip de las colecciones finales. Las FIGS. 10A-B muestran los resultados de secuenciación de alto nivel de las colecciones calculados como se describe en el ejemplo 3; a saber, la tasa en diana y la recuperación genómica equivalente (GER) (FIG. 10A), así como la uniformidad de cobertura de sonda (FIG. 10B). Las colecciones preparadas con 3,4 y 34 nM de cebador en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1 se realizaron de forma similar, aunque se observaron algunas diferencias. Las tasas vinculadas a la diana son ligeramente más altas para las muestras de 3,4 nM (48,5 en comparación con el 33,1 %), mientras que la recuperación genómica equivalente (GER) y la uniformidad de cobertura fueron ligeramente más altas para las muestras de 34 nM (4,6 en comparación con el 3,5 % y 0,83 en comparación con 0,77, respectivamente).

La primera etapa de la preparación de la colección fue la reacción de hibridación y extensión del cebador 1 que se describe en la tabla 25.

Tabla 25

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	10 ng	0,2 ng/ul
PCR múltiple rápida KAPA2G	25	1x
117 cebadores biotinilados específicos de diana	2	0,4 µM en total, 3,4 nM cada uno o 4 µM en total, 34 nM cada uno
dATP	1,9	3,8 mM
MgC12	5	5 mM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

A continuación, las muestras se incubaron como se describe en la tabla 13.

Después de la hibridación y extensión con cebadores biotinilados, las muestras se mezclaron en una proporción de 1:1 con microesferas T1 de estreptavidina Dynabeads™ MyOne™. Estas microesferas se prepararon antes de la adición a las muestras de ADN lavando cuatro veces con tampón de unión y lavado 1x (B&W) y volviendo a suspender en tampón 2x B&W. La composición del tampón B&W se describe en la tabla 4 con la excepción de que se usó Tris-Cl pH 7,8 en lugar de Tris-Cl a pH 7,5.

Las muestras se incubaron con 50 ul de microesferas MyOne™ y se realizaron lavados y resuspensión de microesferas como se describe en el ejemplo 1.

Las microesferas resuspendidas se llevaron a continuación a la reacción de ligadura como se describe en el ejemplo 3. En este caso, se usaron adaptadores TA indexados.

Después de la ligadura, las muestras se colocaron en un imán a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y las muestras se lavaron con el tampón 1x B&W y se eluyeron en Tris-Cl 10 mM, como se describe en el ejemplo 3.

A continuación, estas muestras se llevaron a la reacción de hibridación del cebador 2 que se describe en la tabla 26. Durante esta reacción, los cebadores específicos de diana con partes no internas, equivalentes al adaptador de secuenciación, se hibridaron en dirección 5' de los cebadores añadidos en la hibridación y extensión del cebador 1.

Tabla 26

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN+Microesferas	20	
Tampón A KAPA2G	10	1x
117 cebadores específicos de diana no internos	2	400 nM en total, 3,4 nM cada uno
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

Las reacciones de hibridación del cebador 2 se incubaron a 50 °C durante 90 minutos.

A continuación, las muestras se lavaron como se describe para las reacciones de ligadura.

Las muestras se volvieron a suspender en 20 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

Las microesferas resuspendidas se llevaron a continuación a la reacción de extensión 2 como se describe en el

ejemplo 3 y se describe en la tabla 17. Esta reacción permitió la extensión del cebador 2 y dio como resultado la liberación de moléculas de ADN diana en solución.

Las muestras de reacción de extensión 2 se incubaron a 50 °C durante 2 minutos y se colocaron a continuación directamente en un imán sobre hielo durante 1-3 minutos.

A continuación, se eliminó el sobrenadante (47 µl) sin alterar las microesferas y se añadió a un volumen igual (47 µl) de microesferas SPRI®. Se realizó una limpieza 1x y las muestras se eluyeron en 20 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

La etapa final de la preparación de la colección fue la reacción de amplificación descrita en el ejemplo 3, con la excepción de que se usó una temperatura de recocido de 62 °C. Los parámetros de reacción de amplificación y de ciclo se describen en las tablas 18 y 19.

A continuación, se realizó una limpieza 1x SPRI® del producto de PCR y la colección se eluyó en 25 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

Ejemplo 5: Panel de 117 dianas con ADN tagmentado

Se prepararon seis colecciones replicadas a partir de 10 ng de ADN de Coriell tagmentado (NA12878) y una mezcla de 117 cebadores específicos de diana a 3,4 nM cada uno en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1. Estas colecciones se secuenciaron en IlluminaNextseq (rendimiento medio 300x).

Se preparó un indicador GX de LabChip de un subconjunto de las colecciones finales. Las FIGS. 11A-B muestran los resultados de secuenciación de alto nivel de las colecciones calculados como se describe en el ejemplo 1; a saber, la tasa en diana y la recuperación genómica equivalente (GER) (FIG. 11A), así como la uniformidad de cobertura de sonda (FIG. 11B). Las colecciones preparadas con ADN tagmentado no se comportaron tan bien como los informados en los ejemplos 3 y 4. Las tasas vinculadas a la diana fueron bajas, con una media del 3,7 %, y la recuperación genómica equivalente (GER) fue inferior al 1 %. La uniformidad de cobertura también fue ligeramente más baja que la observada en los ejemplos 3 y 4, a ~ 60 %.

Para preparar estas colecciones, el ADN se tagmentó incubando el ADN con transposomas precargados con secuencias adaptadoras parciales (brazos R1), como se describe en la tabla 27.

Tabla 27

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN		0,2 ng/ul
Tampón de reacción	10	1x
MnCl ₂	2	2 mM
Transposasa (0,18 mg/ml)	4	7,2 ng/ul
Agua	Hasta 20 ul	n.d.

La reacción de tagmentación se llevó a cabo incubando muestras a 55 °C durante 5 minutos.

Después de la incubación, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos con 20 µl de solución de parada de GHCl.

A continuación, las muestras se sometieron a una limpieza 1x SPRI® y se eluyeron en 10 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,0.

El eluido se incubó a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar los fragmentos de ADN, asegurando de este modo que los fragmentos llevaran las secuencias adaptadoras parciales solo en el extremo 5'.

Este ADN se usó como entrada en la reacción de hibridación y extensión del cebador 1 descrita en el ejemplo 4.

Todas las etapas posteriores de preparación de la colección fueron como se describe en el ejemplo 4, con la excepción de la reacción de ligadura que se excluyó, y la reacción de PCR final que hizo uso de diferentes cebadores.

La reacción de ligadura fue innecesaria ya que los fragmentos ya tenían secuencias adaptadoras parciales añadidas durante la tagmentación.

Los componentes de la reacción de PCR final se describen en la tabla 28.

Tabla 28

Componente	ul en reacciones	Concentración final
ADN	20	
Mezcla lista para inicio en caliente KAPA HiFi	25	1x
Cebador adaptador i5 indexado	1,25	250 nM
Cebador adaptador i7 indexado	1,25	250 nM
Agua	Hasta 50 ul	n.d.

La limpieza posterior a la amplificación fue como se describe en los ejemplos 3-4.

5

Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a ejemplos específicos, resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar varias modificaciones. Por tanto, el alcance de la invención no debería estar limitado por los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones que se presentan a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer un polinucleótido diana de una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- 5 a) proporcionar una mezcla de reacción que comprende la muestra y un primer cebador específico de diana, en el que la muestra comprende un polinucleótido diana monocatenario que tiene un extremo 3' y un extremo 5' y una pluralidad de polinucleótidos no diana monocatenarios estructuralmente diferentes;
- 10 b) hibridar un primer cebador específico de diana con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción, en el que el primer cebador específico de diana hibrida con al menos 6 nucleótidos del extremo 3' del polinucleótido diana monocatenario;
- 15 c) extender el primer cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa para formar un primer producto bicatenario que comprende el polinucleótido diana hibridado con el primer cebador específico de diana extendido, en el que el polinucleótido diana hibridado comprende una región saliente monocatenaria de al menos 6 nucleótidos consecutivos en el extremo 3';
- 20 d) eliminar polinucleótidos diana y no diana monocatenarios que no hibridan con un cebador específico de diana extendido, si están presentes, de la mezcla de reacción;
- 25 e) hibridar un segundo cebador específico de diana con la región saliente monocatenaria en el extremo 3' del polinucleótido diana hibridado, en el que el segundo cebador específico de diana comprende una región de hibridación 3' y una región de código de barras; y
- 30 f) extender el segundo cebador específico de diana hibridado con una ADN polimerasa, en el que la ADN polimerasa comprende actividad de desplazamiento catenar, actividad exonucleasa de ADN bicatenario 5'-3' o una combinación de las mismas, desplazando o degradando de este modo el primer cebador específico de diana extendido y formando un segundo producto bicatenario que comprende un código de barras, en el que el segundo producto bicatenario comprende el polinucleótido diana hibridado con un segundo cebador específico de diana extendido, en el que el segundo cebador específico de diana extendido comprende: i) un complemento de al menos una parte del polinucleótido diana; y ii) una región saliente 5' monocatenaria que comprende el código de barras.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer cebador específico de diana comprende un ligando de afinidad y:

- 35 - la extensión en c) comprende inmovilizar el primer producto bicatenario sobre una superficie sólida, en el que la superficie sólida comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad del primer cebador específico de diana; y
- 40 - la eliminación en d) comprende lavar polinucleótidos no inmovilizados.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que

- 45 - la extensión en c) comprende extender el primer cebador específico de diana hibridado en presencia de nucleótidos que están unidos covalentemente a un ligando de afinidad, incorporando de este modo nucleótidos unidos al ligando de afinidad incorporado en el primer cebador específico de diana extendido e inmovilizar el primer producto bicatenario sobre una superficie sólida, en el que la superficie sólida comprende un elemento de afinidad que se une específicamente al ligando de afinidad del primer cebador específico de diana; y
- 50 - la eliminación en d) comprende lavar polinucleótidos no inmovilizados.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer cebador específico de diana se une covalentemente a una superficie sólida y:

- 55 - la hibridación en b) comprende poner en contacto la superficie sólida a la que el primer cebador específico de diana está unido covalentemente con el polinucleótido diana monocatenario en la mezcla de reacción; y
- la eliminación en d) comprende lavar polinucleótidos no inmovilizados.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 4, en el que d) comprende además eliminar el primer cebador específico de diana no extendido, si está presente, poniendo en contacto el cebador no extendido con una exonucleasa monocatenaria de 5' a 3'.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el primer cebador específico de diana comprende un ligando de afinidad y:

e) comprende hibridar el segundo cebador específico de diana con un primer producto bicatenario inmovilizado; y

f) comprende extender el segundo cebador específico de diana con la ADN polimerasa que comprende actividad de desplazamiento catenario y/o actividad exonucleasa bicatenaria 5'-3', liberando de este modo el polinucleótido diana en solución.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el procedimiento comprende además:

g) unir un primer y un segundo adaptador universal a:

i) un primer y un segundo extremo, respectivamente, del segundo producto bicatenario; o

ii) un extremo 5' y 3', respectivamente, de un segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado del segundo producto bicatenario, o un primer y un segundo extremo de un producto de amplificación bicatenario del segundo cebador específico de diana extendido monocatenario recuperado.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el procedimiento comprende además:

g) poner en contacto el segundo producto bicatenario con una transposasa cargada con adaptador universal para catalizar la fragmentación y la integración *in vitro* del primer o segundo adaptador universal en extremos de fragmentos; y

h) hibridar un primer cebador universal con los primeros adaptadores universales y un segundo cebador universal con los segundos adaptadores universales y extender los cebadores universales hibridados con una polimerasa, amplificando de este modo fragmentos que comprenden el primer y segundo adaptador universal.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que:

- el polinucleótido diana monocatenario de a) comprende ARN, preferentemente ARNm;

- la extensión de c) comprende extender el primer cebador específico de diana con una ADN polimerasa dependiente de ARN para formar un primer producto bicatenario, en el que el primer producto bicatenario comprende un híbrido ADNc:ARN.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el polinucleótido diana hibridado del segundo producto bicatenario formado en f) comprende una región saliente monocatenaria 3' que comprende al menos 1 nucleótido, y el procedimiento comprende además:

g) recortar la región saliente 3' del polinucleótido diana hibridado con una enzima que comprende actividad exonucleasa de ADN monocatenario de 3' a 5'; y

h) extender el extremo 3' recortado del polinucleótido diana hibridado con una ADN polimerasa, incorporando de este modo un complemento de la región saliente 5' monocatenaria del segundo cebador específico de diana extendido que comprende el código de barras en el polinucleótido diana del segundo producto bicatenario.

11. Un procedimiento para enriquecer una pluralidad de polinucleótidos diana estructuralmente diferentes a partir de una muestra, en el que el procedimiento comprende realizar uno cualquiera de los procedimientos de las reivindicaciones 1 - 10 por cada polinucleótido diana estructuralmente diferente, en el que b) comprende hibridar una pluralidad de primeros cebadores específicos de diana estructuralmente diferentes con la pluralidad de polinucleótidos diana monocatenarios estructuralmente diferentes en una única mezcla de reacción.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de eliminar el segundo cebador específico de diana extendido del segundo producto bicatenario usando una endonucleasa.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extensión del segundo cebador específico de diana hibridado se realiza en presencia de uno o más nucleótidos no convencionales seleccionados de desoxiuracilo, desoxiinosina y 1',2'-didesoxirribosa Int.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:

el primer cebador específico de diana forma parte de un oligonucleótido que tiene un extremo 3' y un extremo 5',

el primer cebador específico de diana está en el extremo 3' del oligonucleótido, y el oligonucleótido comprende además el segundo cebador específico de diana,

el primer cebador específico de diana y el segundo cebador específico de diana están unidos en el oligonucleótido por

uno o más nucleótidos no convencionales, y

- 5 la hibridación del primer cebador específico de diana comprende hibridar el oligonucleótido con el polinucleótido diana monocatenario y antes de la hibridación del segundo cebador específico de diana, el procedimiento comprende además tratar el oligonucleótido para escindir y liberar el segundo cebador específico de diana del oligonucleótido, en el que el segundo cebador específico de diana liberado tiene un extremo 3' disponible para su extensión.

15. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende unir adaptadores universales a:

- 10 polinucleótidos diana antes de la hibridación del primer cebador específico de diana con la diana monocatenaria; o
el polinucleótido diana hibridado después de la extensión del primer cebador específico de diana hibridado y antes de la hibridación del segundo cebador específico de diana.

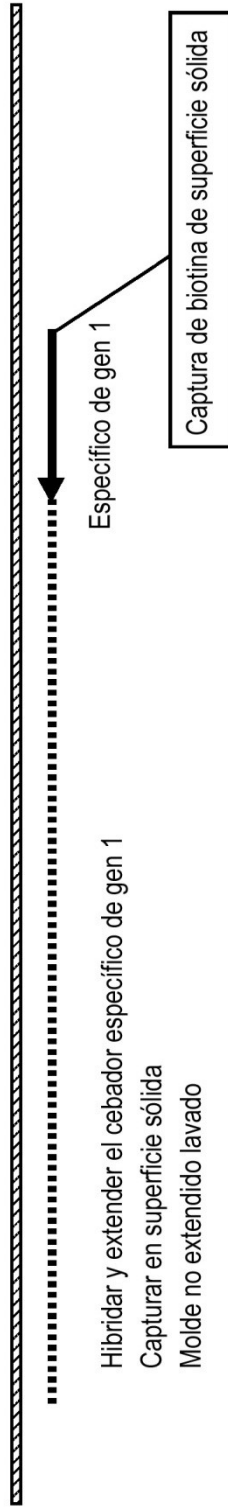


FIG. 1A

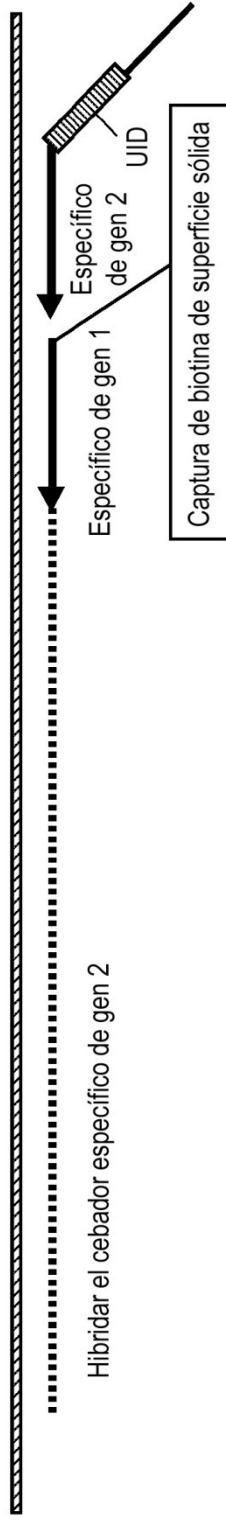


FIG. 1B

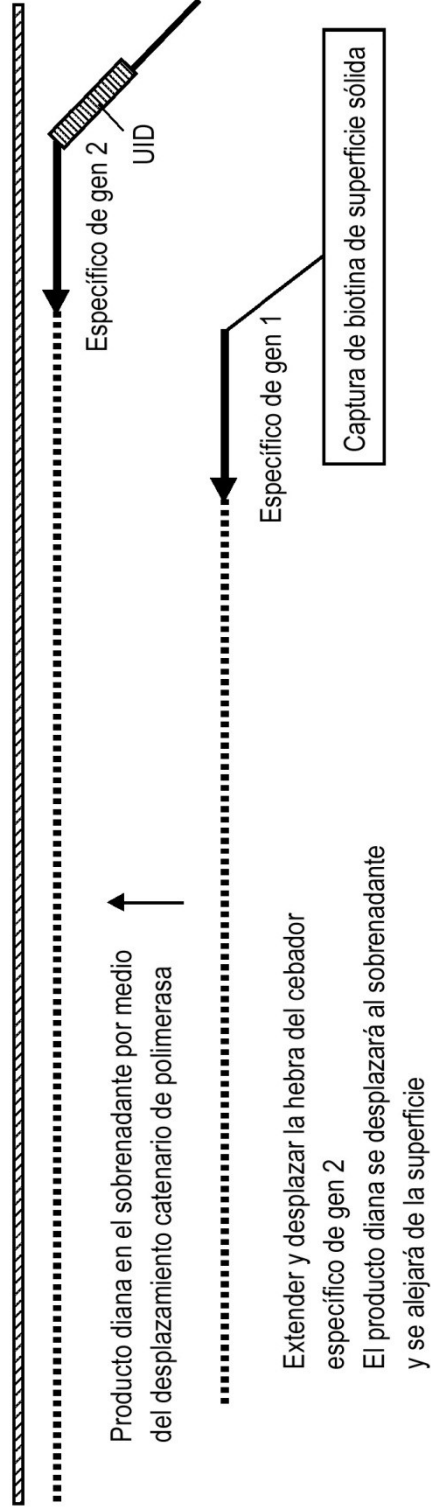
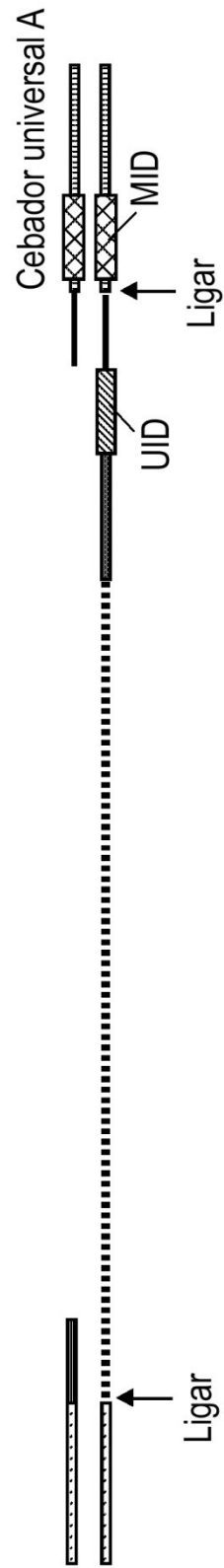
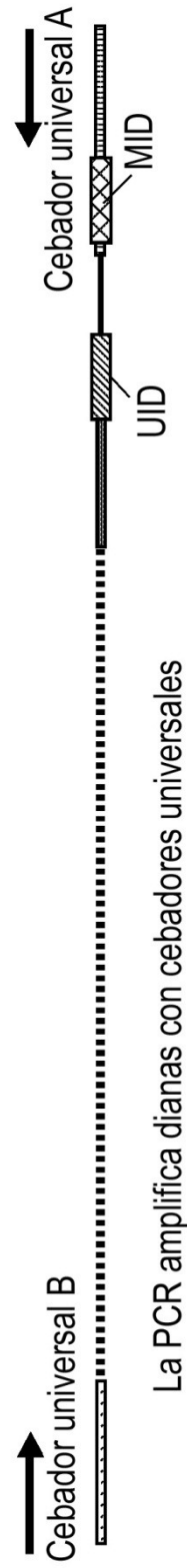


FIG. 1C



Ligar adaptadores universales a los extremos de diana

FIG. 1D



La PCR amplifica dianas con cebadores universales

FIG. 1E

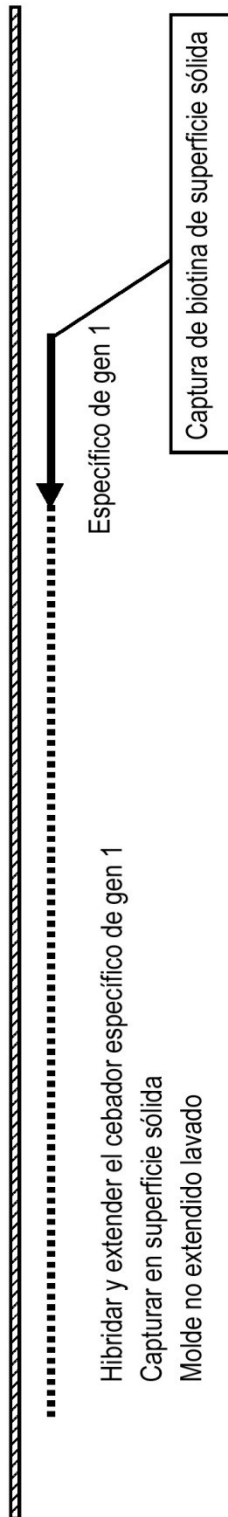


FIG. 2A

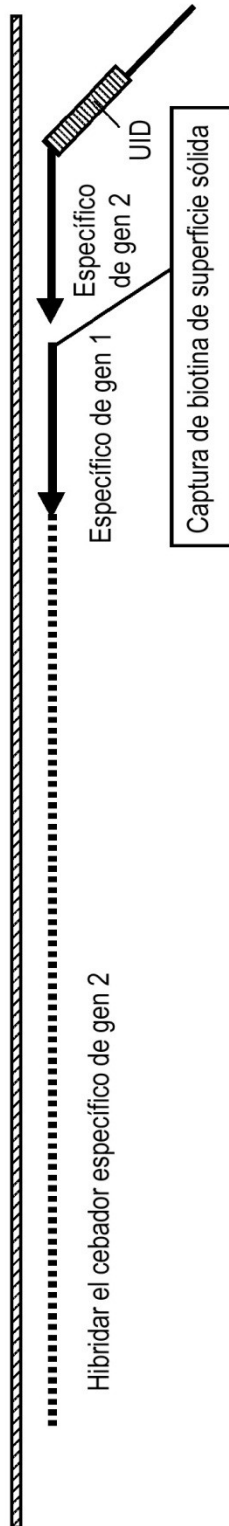


FIG. 2B

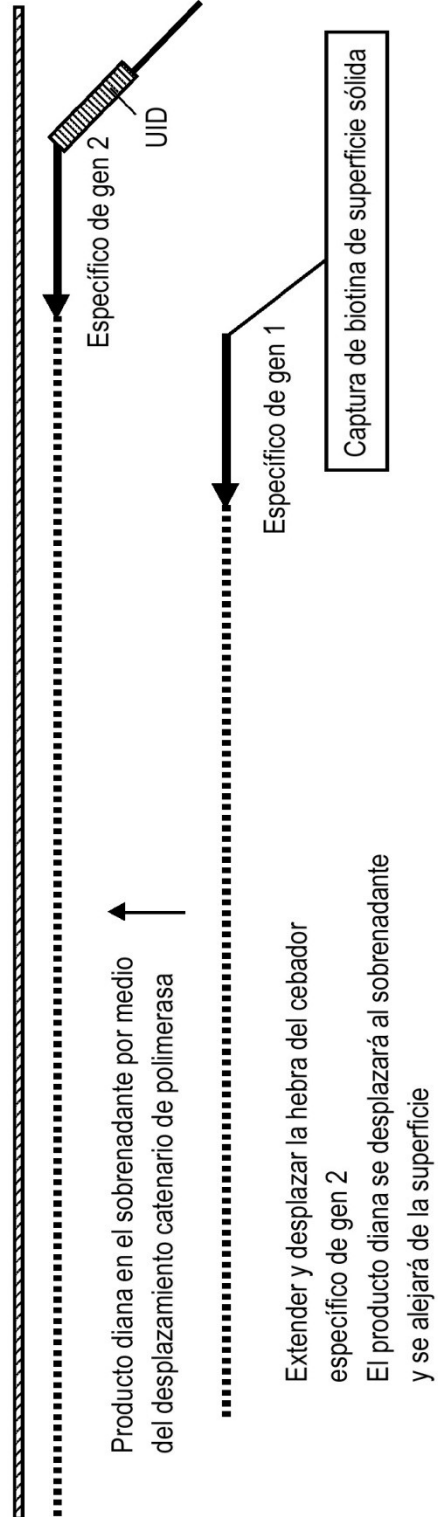


FIG. 2C

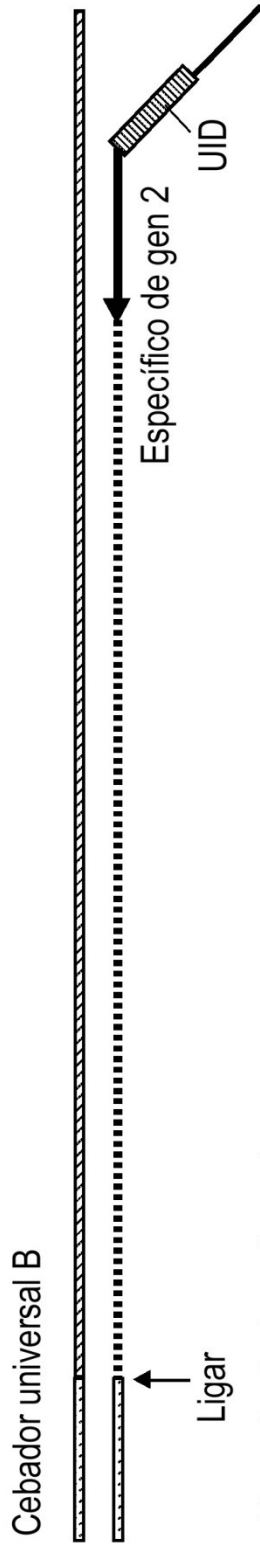


FIG. 2D

Ligar el cebador universal B (ligasa T4) al extremo del ADNbc; como o TA dependiendo de la polimerasa usada para la extensión previa

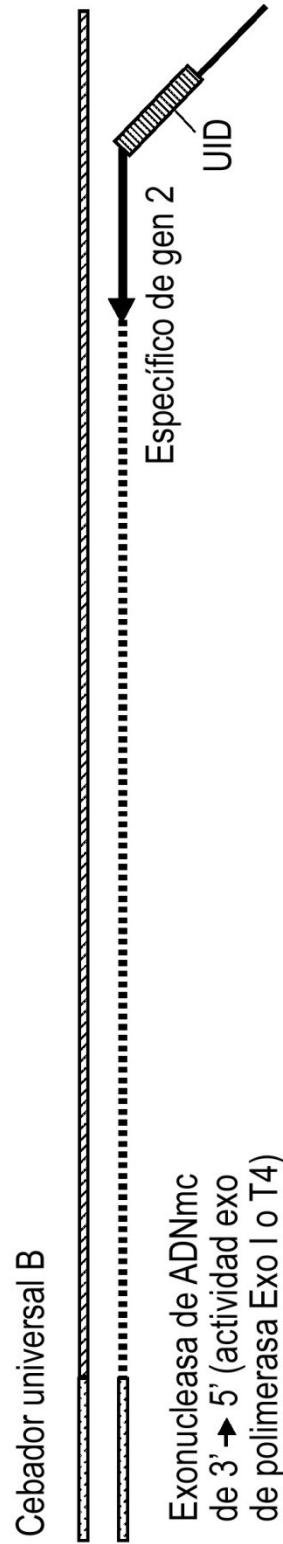


FIG. 2E

Exonucleasa de ADNmc de 3' → 5' (actividad exo de polimerasa Exo I o T4)

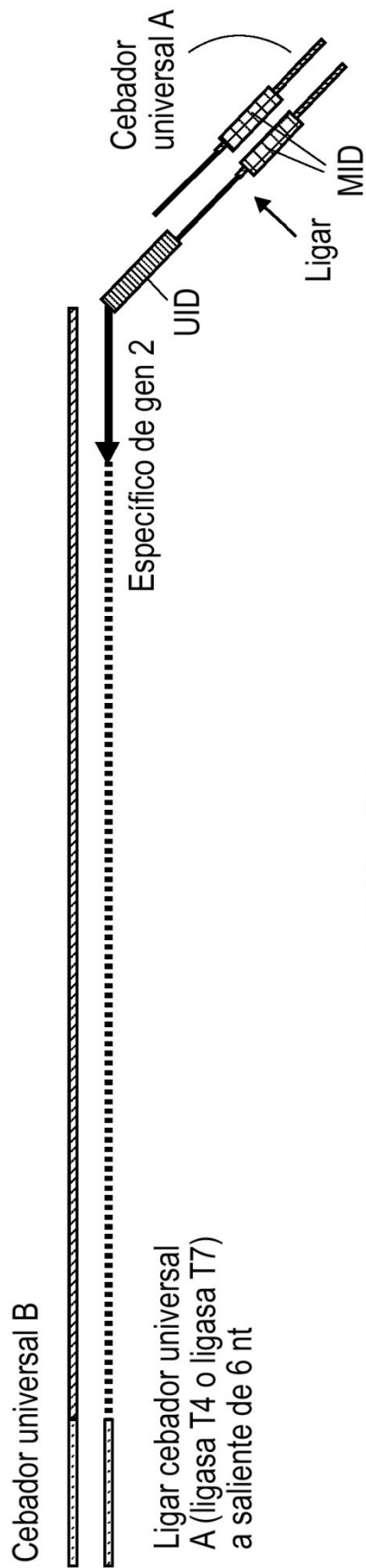


FIG. 3A

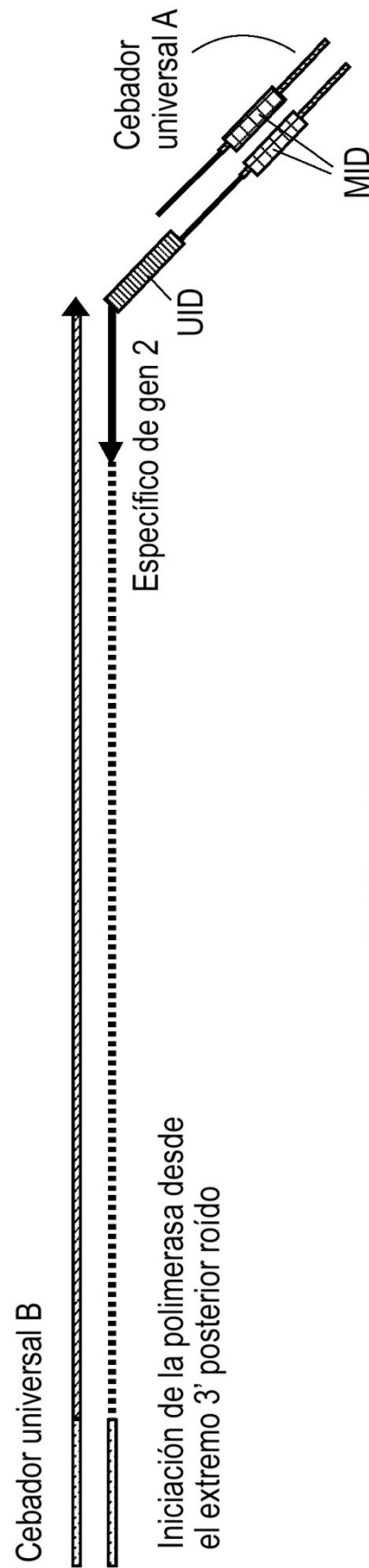


FIG. 3B

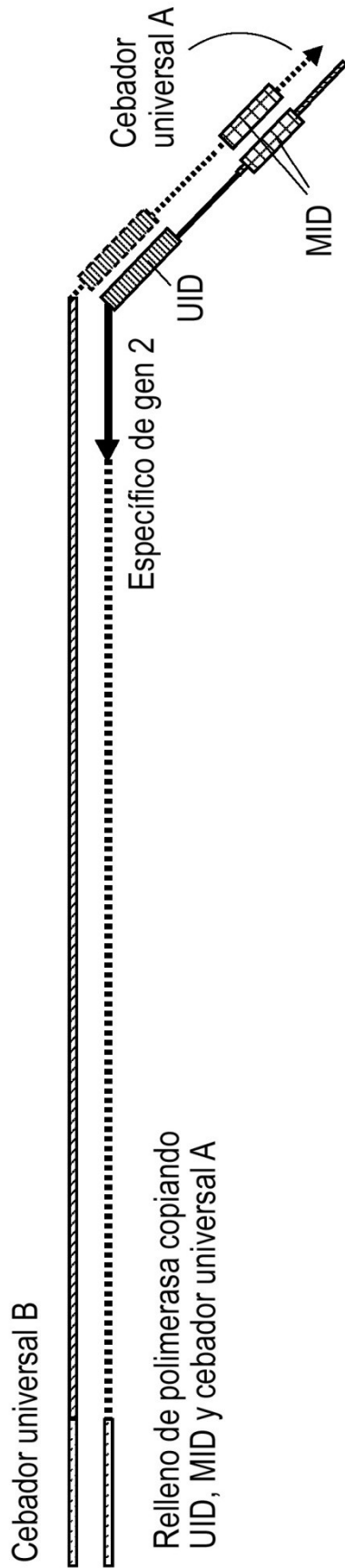


FIG. 3C

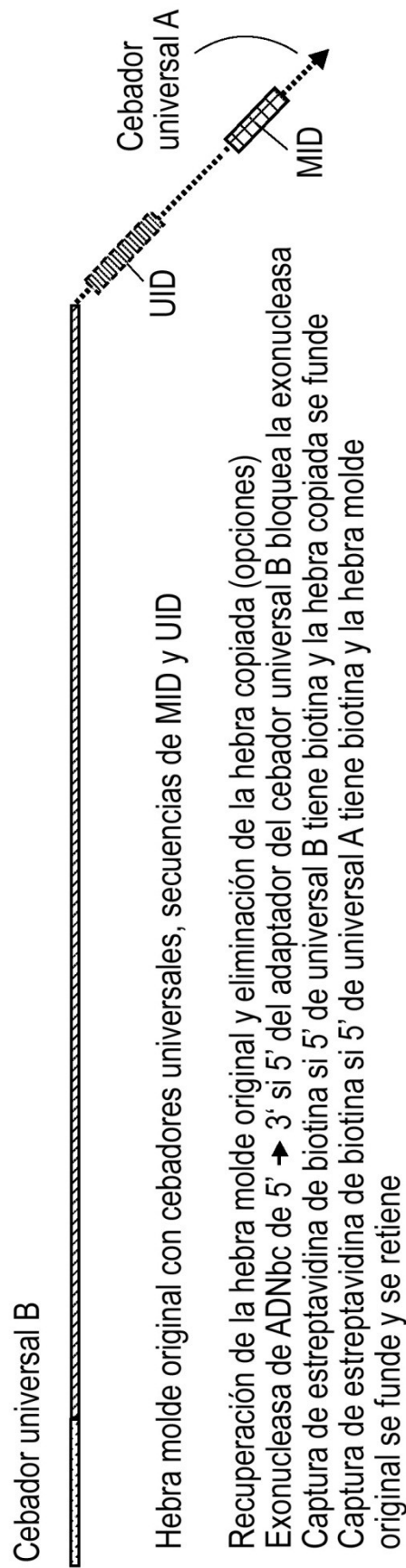


FIG. 3D

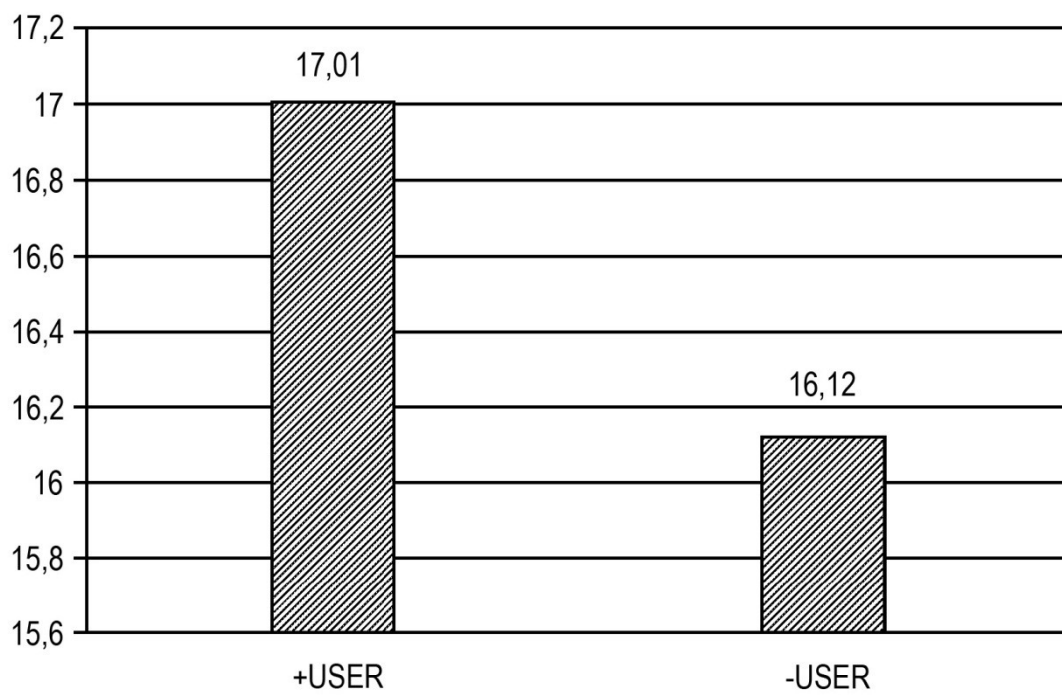


FIG. 4

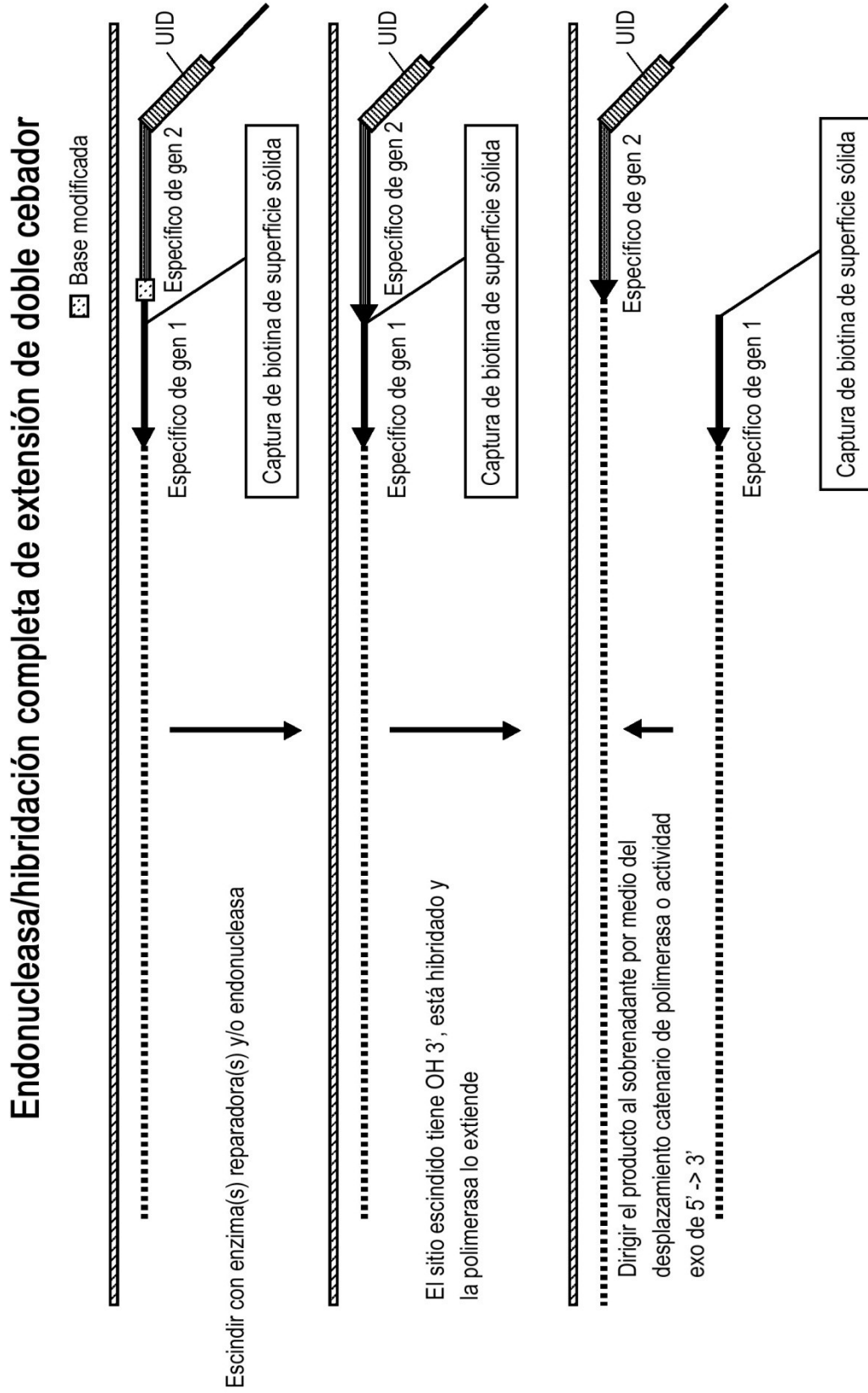


FIG. 5

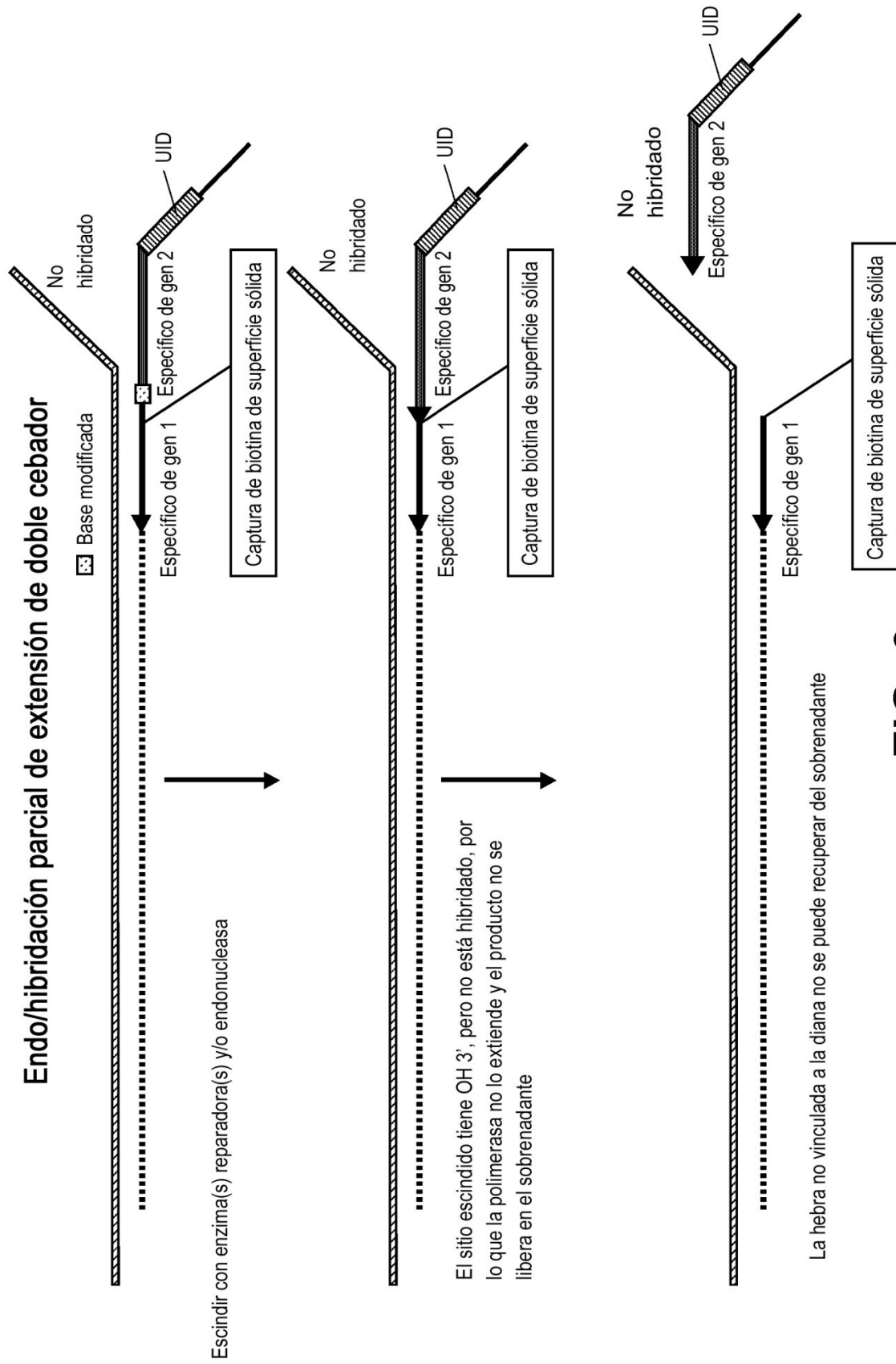


FIG. 6

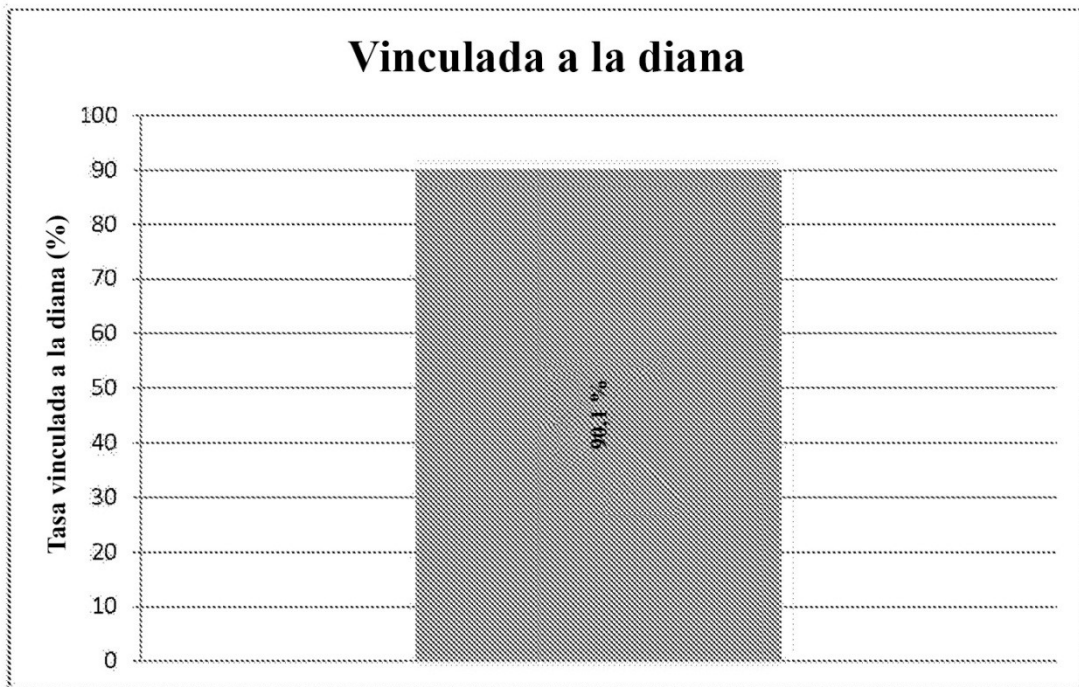


FIG. 7A

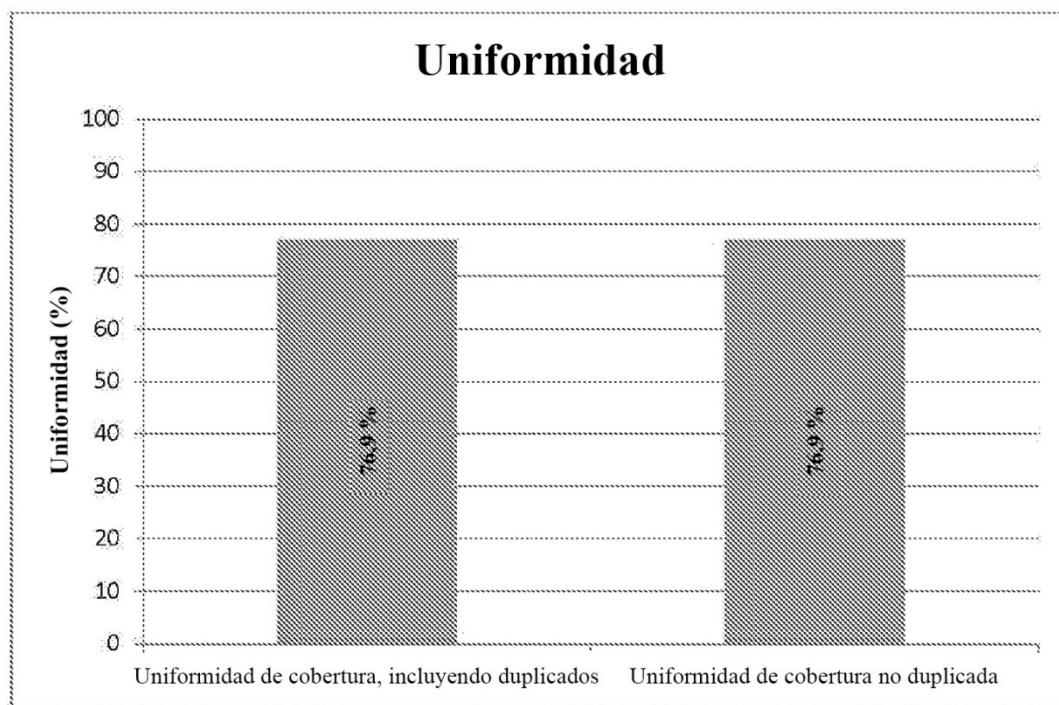


FIG. 7B

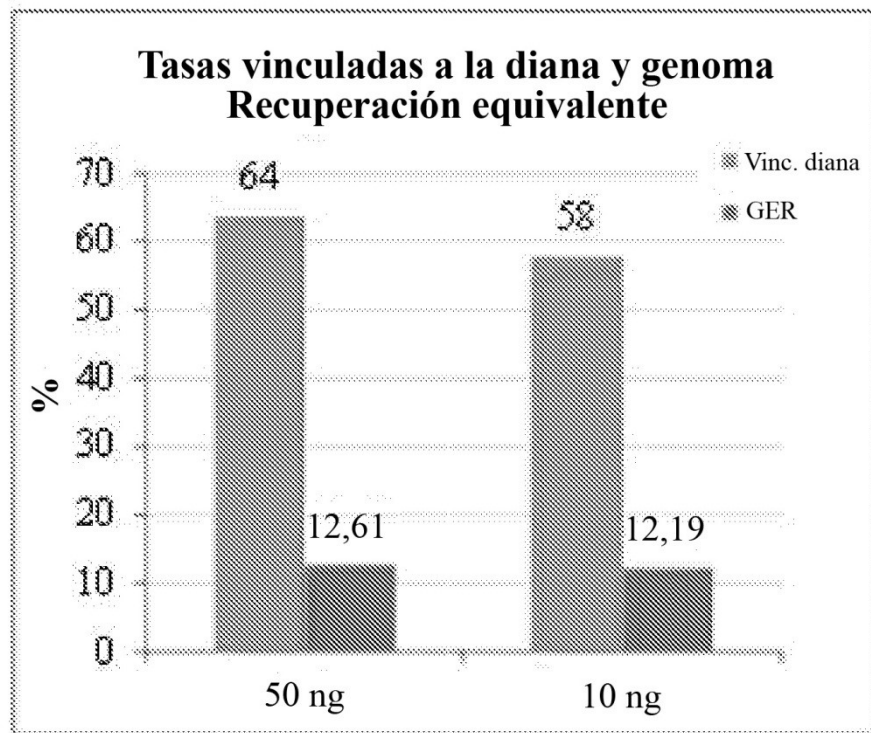


FIG. 8A

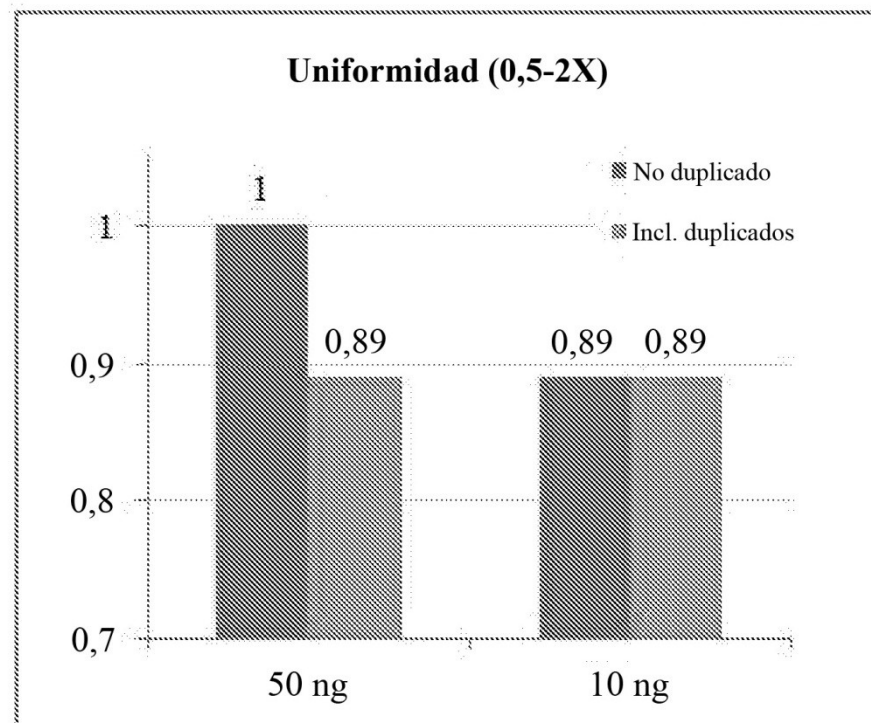


FIG. 8B

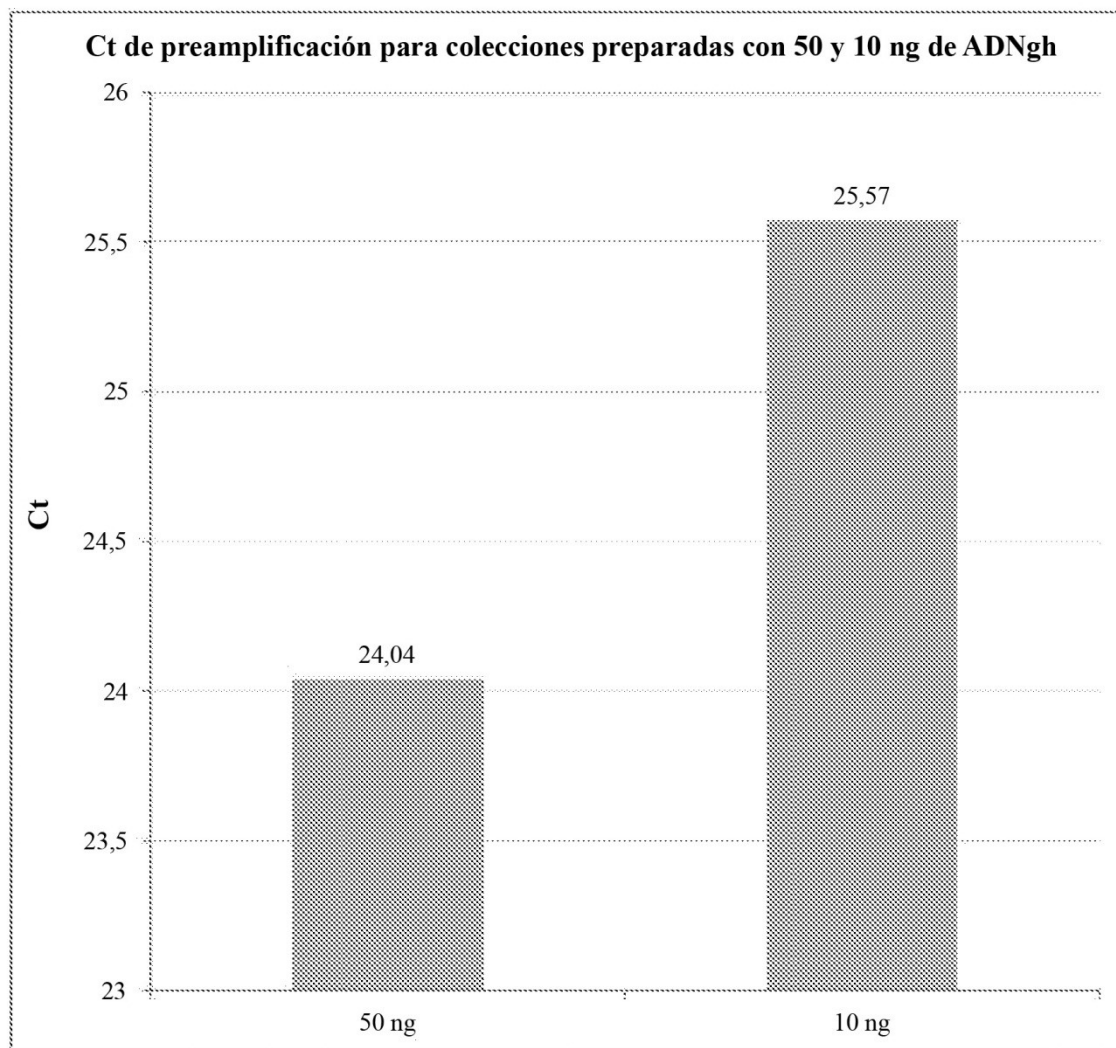


FIG. 9

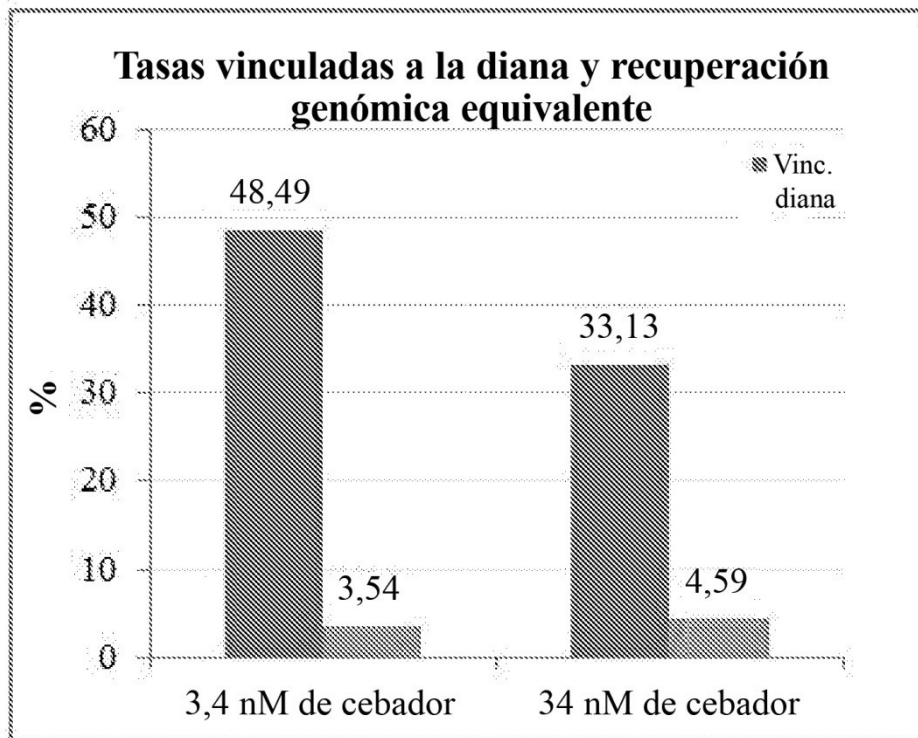


FIG. 10A

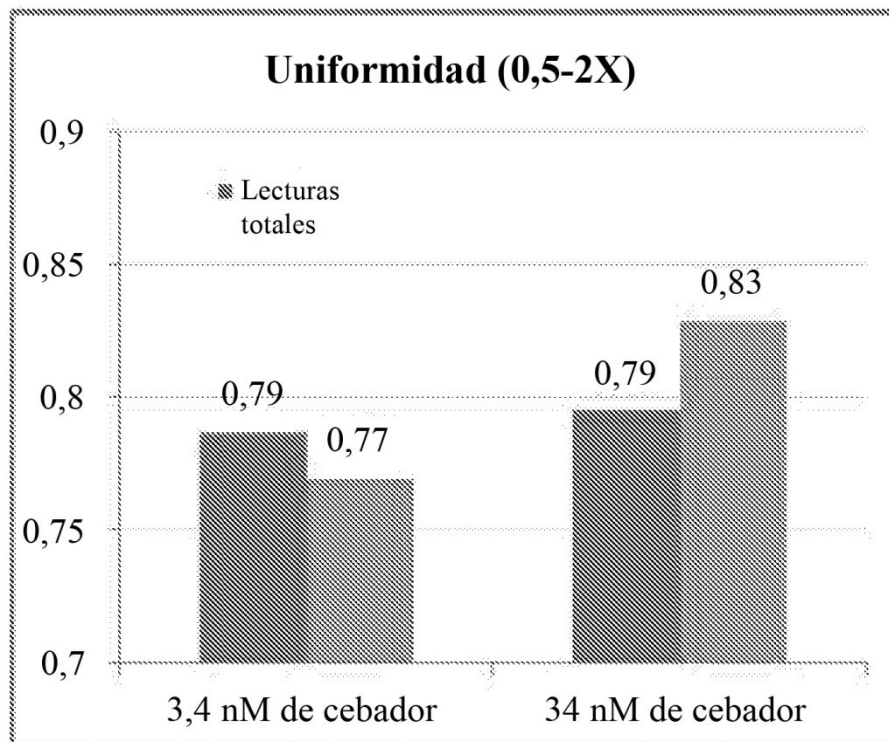


FIG. 10B

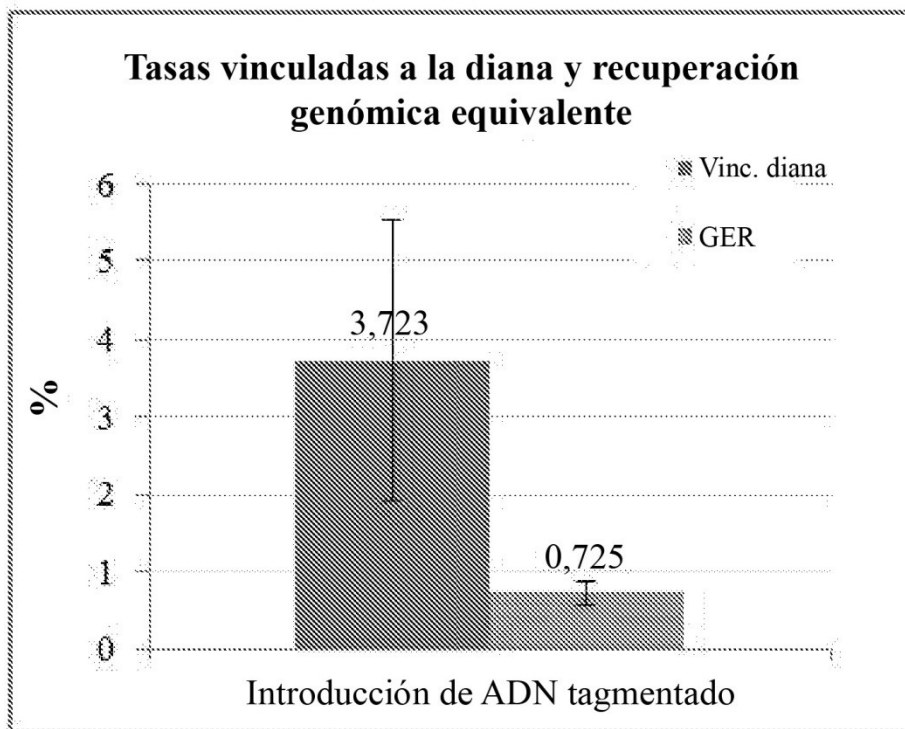


FIG. 11A

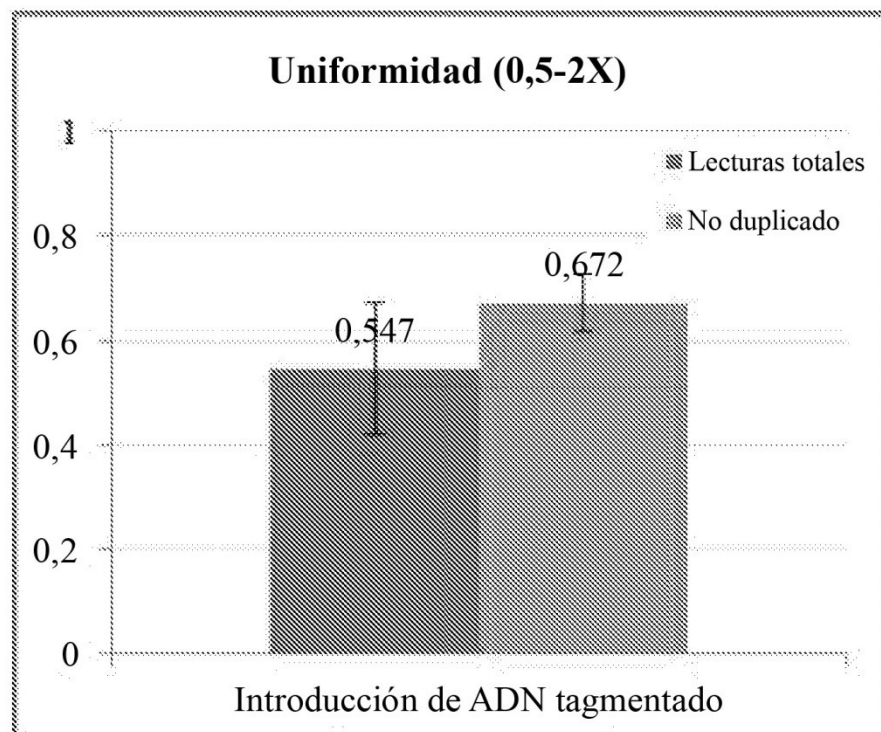


FIG. 11B