

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 848 829**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 27/447 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2013 E 18150783 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3366781**

(54) Título: **Amplificación de exclusión cinética de bibliotecas de ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

15.06.2012 US 201261660487 P
18.10.2012 US 201261715478 P
01.03.2013 US 201313783043

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2021

(73) Titular/es:

ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US

(72) Inventor/es:

BOUTELL, JONATHAN MARK;
BOWEN, M. SHANE;
GUNDERSON, KEVIN L.;
RONAGHI, MOSTAFA;
SHEN, MIN-JUI RICHARD;
STEPHENS, KATHRYN M.;
VENKATESAN, BALA MURALI y
VIJAYAN, KANDASWAMY

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 848 829 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

Amplificación de exclusión cinética de bibliotecas de ácidos nucleicos

Antecedentes

Esta divulgación se refiere en general a biología molecular, y más específicamente a síntesis y análisis de ácidos nucleicos.

El análisis genético está tomando cada vez más importancia en la sociedad moderna. Los análisis genéticos ya han demostrado ser útiles para predecir el riesgo de una persona de contraer algunas enfermedades (diagnósticos), determinar la probabilidad de beneficio terapéutico frente al riesgo de efectos secundarios para una persona que considera ciertos tratamientos (pronósticos) e identificar personas desaparecidas, perpetradores de crímenes, 5 víctimas de crímenes y bajas de guerra (forenses), por nombrar algunos. Sin embargo, en muchos casos, las pruebas genéticas apropiadas aún no están disponibles o sufren altas tasas de error. Una fuente de estos problemas es que muchas pruebas genéticas utilizadas actualmente para diagnósticos, pronósticos y análisis forenses se basan en tecnologías que investigan solo una fracción del genoma de una persona. Los rasgos genéticos de una persona están codificados por un genoma que contiene más de 3 billones de pares de bases y a pesar de todo la 10 mayoría de las pruebas genéticas investigan mutaciones en solo unos pocos de estos pares de bases. Al aumentar la fracción del genoma investigado, idealmente hasta e incluyendo los 3 billones de pares de bases en el genoma, la exactitud de las pruebas genéticas se pueden mejorar y las pruebas genéticas se pueden desarrollar para más situaciones de diagnóstico y pronóstico.

Un componente fundamental de muchas pruebas genéticas es la preparación del material genético que se va a probar. Esto no es una cuestión trivial cuando se trata de capturar un genoma completo y mantener su integridad. 20 Dos métodos que están actualmente disponibles para capturar cantidades grandes de material genético son la reacción en cadena de polimerasa en emulsión (ePCR) y amplificación del clúster (p. ej. mediante la amplificación de un puente). Su uso en aplicaciones clínicas y de diagnóstico está actualmente limitatado.

Para ePCR, se forman gotitas acuosas en una fase oleosa junto con fragmentos de genoma y perlas portadoras. Las 25 condiciones se eligen para optimizar la probabilidad de que cada gotita aisle un fragmento de genoma individual y una perla portadora única. El objetivo es que las gotitas formen microreactores que impidan la difusión de los fragmentos de genoma entre las gotitas y por lo tanto entre las diferentes perlas. Se puede llevar a cabo varios ciclos de amplificación por PCR para la emulsión a granel de manera que en cada gota se recubra la perla con copias clónicas de un fragmento de genoma existente. Después de la amplificación las perlas se transfieren a un 30 sustrato de detección para su evaluación en un instrumento analítico. Una complicación con el ePCR es que algunas de las perlas terminan en gotitas sin un fragmento de genoma, produciéndose así perlas en blanco. Se puede llevar a cabo una etapa de enriquecimiento de perlas para eliminar las perlas en blanco antes de su uso en el instrumento analítico; sin embargo, este proceso es generalmente engoroso e inefficiente. Otra complicación con el ePCR es que 35 algunas gotitas terminan con más de un fragmento de genoma, produciendo así perlas de clones mixtas. Aunque las perlas de clones mixtas se pueden identificar a menudo e ignorar después durante el análisis, su presencia disminuye la eficacia y en algunos casos la precisión del análisis.

La amplificación del clúster proporciona un enfoque más racional para capturar y amplificar el material genético. En 40 realizaciones comerciales, los fragmentos de genoma se capturan en la superficie de un sustrato para formar "semillas" en localizaciones aleatorias. Después de quitar el exceso de fragmentos de genoma (es decir, aquellos que no se han capturado), se llevan a cabo varios ciclos de amplificación para crear copias clónicas que forman un clúster en la superficie alrededor de cada semilla. Las ventajas de la amplificación de clúster en comparación con el ePCR incluyen evitar la etapa de enriquecimiento de perlas, evitar la etapa de transferencia de perlas (desde la emulsión al sustrato de detección), y evitar las emulsiones aceitosas desordenadas y a menudo meticulosas. Sin embargo, una posible complicación de las técnicas de amplificación de clúster comercial es que forman un patrón 45 aleatorio de los clústeres en la superficie. Aunque, los procedimientos de registro de imágenes se han desarrollado para localizar y distinguir clúster localizados aleatoriamente, dichos procedimientos colocan una carga adicional de análisis en los dispositivos analíticos. Además, los clústeres localizados aleatoriamente tienden a llenar una superficie menos eficazmente de lo que teóricamente es posible para un patrón de clúster ordenados espacialmente.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para preparar material genético para diagnóstico, pronóstico y análisis forense. La presente descripción aborda esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

Breve compendio

La presente descripción proporciona un método para amplificar ácidos nucléicos. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de ácidos nucleicos diana diferentes; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que tengan una población clonal de amplicones de un ácido nucleico individual de la solución, en donde la reacción incluye simultáneamente (i) transportar los diferentes ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación a una velocidad de transporte promedio, y (ii) 55 amplificar los ácidos nucleicos diana que están en los sitios de amplificación a una velocidad de amplificación

promedio, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad de transporte promedio. En realizaciones particulares, el número de ácidos nucleicos diana diferentes en la solución excede el número de sitios de amplificación en la matriz. Típicamente, los diferentes ácidos nucleicos diana tienen acceso fluídico a la pluralidad de sitios de amplificación. Además, cada uno de los sitios de amplificación puede tener opcionalmente capacidad para varios ácidos nucleicos en la pluralidad de diferentes ácidos nucleicos.

También se proporciona un método para amplificar ácidos nucleicos que incluye las etapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluyen cada uno una población clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual de la solución, en donde la reacción incluye (i) producir un primer amplicón de un ácido nucleico diana individual en cada uno de los sitios de amplificación, y (ii) producir los amplicones posteriores a partir del ácido nucleico diana individual en cada uno de los sitios de amplificación o a partir del primer amplicón, en donde la velocidad promedio a la que se generan los amplicones posteriores en los sitios de amplificación excede la velocidad promedio a la que se genera el primer amplicón en los sitios de amplificación. En realizaciones particulares, el número de los ácidos nucleicos diana diferentes en la solución excede el número de sitios de amplificación en la matriz. Típicamente, los diferentes ácidos nucleicos diana tienen acceso fluídico a la pluralidad de sitios de amplificación. Además, cada uno de los sitios de amplificación puede tener opcionalmente una capacidad para varios ácidos nucleicos en la pluralidad de ácidos nucleicos diferentes.

La presente descripción proporciona además un método para amplificar ácidos nucleicos que incluye las estapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que tienen una población clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual de la solución, en donde la reacción incluye simultáneamente (i) capturar los diferentes ácidos nucleicos diana en los sitios de amplificación a una velocidad de captura promedio, y (ii) amplificar los ácidos nucleicos diana capturados en los sitios de amplificación a una velocidad de amplificación promedio, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad de captura promedio.

También se proporciona un método para amplificar ácidos nucleicos que incluye las etapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluyen una población clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual de la solución, en donde la reacción incluye (i) producir un primer amplicón de un ácido nucleico diana individual que se capturan en los sitios de amplificación, y (ii) producir los amplicones posteriores a partir del ácido nucleico diana individual que está capturado en cada uno de los sitios de amplificación o a partir del primer amplicón, en donde la velocidad promedio a la que se generan los amplicones posteriores en los sitios de amplificación excede la velocidad promedio a la que se genera el primer amplicón en los sitios de amplificación.

Se proporciona además un método para crear una superficie modelada de biomoléculas, en donde el método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un reactivo que incluye (i) una matriz que tiene características no contiguas en la superficie, estando separadas las características por regiones intersticiales de la superficie, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de diferentes biomoléculas diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo para transportar las biomoléculas a las características y unir una biomolécula individual a cada una de las características, en donde se aplica un campo eléctrico a las regiones intersticiales para repeler las biomoléculas de las regiones intersticiales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una imagen compuesta (cuatro canales de color) obtenida después de un primer ciclo de secuenciación para una celda de flujo modelada producida por exclusión cinética.

La Figura 1B muestra una imagen compuesta (cuatro canales de color) obtenida después de un único ciclo de secuenciación para una celda de flujo de ilumina estándar que tiene clústeres localizados aleatoriamente.

La Figura 2 muestra las funciones PDF y NN para una imagen compuesta obtenida después de un primer ciclo de secuenciación utilizando una celda de flujo modelada producida por exclusión cinética.

La Figura 3 muestra un gráfico de dispersión de las posiciones espaciales de los clústeres que se alinean con las primeras 5 posiciones genómicas del genoma PhiX. Las diferentes posiciones genómicas se indican mediante ejes, asteriscos, cuadrados, triángulos y diamantes.

La Figura 4 muestra la arquitectura de una celda de flujo para la desorción electroquímica de especies desde la superficie de la celda de flujo. El potencial eléctrico se puede aplicar a través de una superficie conductora y el electrolito como se ven en (a) o a través de dos superficies conductoras como se muestra en (b). La configuración de la celda de flujo mostrada en (b) se puede utilizar también para la extracción de DNA asistida por el campo en tiempo real logrando más de 100 veces la concentración de DNA en la superficie del electrodo en unos pocos segundos como se muestra en (c).

La Figura 5 muestra un flujo de trabajo ejemplar para la formación asistida por campos eléctricos de patrones de biomoléculas.

La Figura 6 muestra la siembra de plantillas y la amplificación del clúster de las plantillas en características de 2 μm de Au sobre un fondo ITO en presencia de un campo eléctrico (a), y sin campo eléctrico (b). Los perfiles de línea muestran la intensidad de fluorescencia a través de las regiones marcadas.

La Figura 7 muestra las imágenes de fluorescencia de área grande después de la siembra y el agrupamiento en presencia de un campo eléctrico. (a) Carril de la celda de flujo que contiene puntos de 2 μm Au; (b) carril que contiene puntos de 200 nm Au. Los clústeres se alían en áreas grandes con las características micro y nanomoldeadas, la naturaleza ordenada espacialmente de estos clústeres se confirma mediante las correspondientes Transformadas de Fourier (FFTs).

La Figura 8 muestra la formación de clústeres de DNA en sitios de SiO₂ de 700 nm de diámetro en presencia de un campo eléctrico. Los clústeres están altamente ordenados con poca fluorescencia de las áreas intersticiales.

La Figura 9 muestra (a) los resultados de un ensayo de hibridación en una celda de flujo HiSeq (1) antes del injerto de los cebadores P5 y P7 asistido por el campo eléctrico, (2) después del injerto de los cebadores P5 y P7 asistido por el campo eléctrico, (3) después del injerto de los cebadores P5 y P7 asistido por el campo eléctrico y re-injerto de los cebadores P5 y P7, y (4) después del injerto de los cebadores P5 y P7 asistido por el campo eléctrico, recubrimiento con SFA y re-injerto de los cebadores P5 y P7; y (b) intensidad mediana de fluorescencia por carril de celda de flujo después de cada etapa.

La Figura 10 muestra (a) una representación esquemática de la hibridación directa en los sitios dieléctricos que utilizan un campo eléctrico; (b) clústeres modelados espacialmente en presencia de un campo eléctrico repelente de ácidos nucleicos en las regiones intersticiales y (c) clústeres ordenados aleatoriamente formados en ausencia de un campo eléctrico repelente de ácidos nucleicos en las regiones intersticiales.

Descripción detallada

Esta descripción proporciona bibliotecas de ácidos nucleicos y métodos para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos. En realizaciones particulares, una biblioteca de ácidos nucleicos de la presente descripción está en forma de una matriz de sitios.

La matriz puede tener sitios que son clonales con respecto a secuencias de nucleótidos particulares. En consecuencia, sitios individuales en la matriz pueden tener múltiples copias de una secuencia de nucleótidos única. Por ejemplo, los sitios pueden tener copias clonales de un ácido nucleico derivado de una muestra biológica tal como un genoma o una sub-fracción del mismo (p. ej. un exoma), o un transcriptoma (p. ej. biblioteca de mRNA o biblioteca de cDNA) o una sub-fracción del mismo.

La fracción de los sitios en una matriz que son clonales puede exceder la fracción predicha por la distribución de Poisson. Por lo tanto la matriz producida por los métodos establecidos aquí puede tener una distribución de super-Poisson de los sitios clonales. La distribución super-Poisson puede resultar durante la síntesis de la matriz y sin la necesidad de etapas posteriores de enriquecimiento de sitio o purificación de sitio (aunque las etapas de enriquecimiento y purificación se pueden llevar a cabo si se desea en al menos algunas realizaciones).

En algunas realizaciones, los sitios se pueden presentar como características sobre (o dentro de) un sustrato. En dichas realizaciones, las características pueden ser clonales, la fracción de características en una matriz que son clonales puede exceder la distribución de Poisson, y las características pueden estar dispuestas espacialmente en un patrón repetitivo. Por lo tanto, los sitios pueden estar ordenados espacialmente, por ejemplo, en una rejilla rectilínea, rejilla hexagonal u otro patrón deseado.

Una biblioteca de ácidos nucleicos de la presente descripción se puede realizar utilizando un método que aprovecha la exclusión cinética. La exclusión cinética puede ocurrir cuando un proceso ocurre a una velocidad suficientemente rápida para excluir eficazmente otro suceso o proceso que se produzca. Tomemos por ejemplo la fabricación de una matriz de ácido nucleico donde los sitios de la matriz se siembran aleatoriamente con ácidos nucleicos diana a partir de una solución y copias del ácido nucleico diana se generan en un proceso de amplificación para llenar cada uno de los sitios sembrados a la capacidad. De acuerdo con los métodos de exclusión cinética de la presente descripción, los procesos de sembrado y amplificación pueden proceder simultáneamente bajo condiciones donde la velocidad de amplificación excede la velocidad de sembrado. Como tal, la velocidad relativamente rápida a la que se realizan las copias en un sitio que ha sido sembrado con un primer ácido nucleico diana excluirá eficazmente un segundo ácido nucleico del sembrado del sitio para la amplificación.

La exclusión cinética puede aprovechar una velocidad relativamente lenta para hacer una primera copia del ácido nucleico diana frente a una velocidad relativamente rápida para realizar las copias posteriores del ácido nucleico diana o de la primera copia. En el ejemplo del párrafo anterior, la exclusión cinética ocurre debido a la velocidad relativamente lenta del sembrado del ácido nucleico diana (por ejemplo, difusión o transporte relativamente lento) frente a la velocidad relativamente rápida con la que se produce la amplificación para llenar el sitio con copias de la

semilla de ácido nucleico. En otra realización ejemplar, la exclusión cinética puede ocurrir debido a un retraso en la formación de una primera copia de un ácido nucleico diana que ha sido sembrado en un sitio (por ejemplo, activación retrasada o lenta) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se realizan las copias posteriores para llenar el sitio. En este ejemplo, un sitio individual se puede sembrar con varios ácidos nucleicos diana diferentes (por ejemplo, varios ácidos nucleicos diana pueden estar presentes en cada sitio antes de la amplificación). Sin embargo, la formación de la primera copia para cualquier ácido nucleico diana dado se puede activar aleatoriamente de tal manera que la velocidad promedio de formación de la primera copia sea relativamente lenta comparado con la velocidad a la que se generan las copias posteriores. En este caso, aunque un sitio individual puede haber sido sembrado con varios ácidos nucleicos diana diferentes, la exclusión cinética permitirá solamente uno de esos ácidos nucleicos diana a amplificar. Más específicamente, una vez que un primer ácido nucleico diana se ha activado para la amplificación, el sitio se llenará rápidamente a su capacidad con sus copias, evitando de ese modo que se realicen en el sitio copias de un segundo ácido nucleico diana.

Una ventaja de las matrices producidas por los métodos establecidos aquí es que la naturaleza clonal de los sitios proporciona precisión en el análisis posterior. Esto evita los resultados confusos que de otro modo surgirían cuando se detectan sitios que tienen poblaciones mixtas.

Otra ventaja de las matrices es que tienen una distribución de super-Poisson de sitios clonales. Esto aumenta la complejidad de la biblioteca evitando la pérdida de contenido genético que de otro modo podría ocurrir debido al secuestro en los sitios mixtos.

Una ventaja adicional de los métodos y matrices establecidos aquí es la provisión de una matriz que tiene características en un sustrato, en donde las características están dispuestas espacialmente en un patrón repetitivo. Como se ha establecido anteriormente, la fracción de las características que son clonales puede exceder a la distribución de Poisson. La distribución de Poisson establece un máximo del 37% de ocupación. De acuerdo con los métodos establecidos aquí, el complemento de características que son clonales puede exceder el 40%, 50%, 60%, 75% o más. Las matrices producidas por los métodos establecidos aquí proporcionan un llenado más eficiente de un sustrato comparado con las matrices de clústeres aleatorios. Tales matrices son también más fáciles de evaluar analíticamente evitando las complejidades de métodos de registro de imágenes utilizados típicamente para matrices de clústeres aleatorios.

Además, los métodos establecidos aquí son ventajosos para la creación de matrices sobre sustratos que están modelados para facilitar la detección. Por ejemplo, varias plataformas de secuenciación disponibles comercialmente se basan en sustratos que tienen pocillos que proporcionan una barrera a la difusión de los reactivos de detección (por ejemplo, pirofosfato en plataformas disponibles de 454 LifeSciences (una filial de Roche, Basel, Switzerland) o protones en plataformas disponibles de Ion Torrent (una filial de Life Technologies, Carlsbad, California) durante las etapas de detección de secuencias. Los métodos establecidos aquí pueden ser ventajosos al incrementar el número de pocillos que se cargan con poblaciones clonales en comparación con métodos de amplificación de clústeres estándar que serían Poisson limitados. Los métodos de la presente descripción son ventajosos sobre los métodos de ePCR también por evitar el manejo de emulsiones y la manipulación de perlas.

Los términos utilizados aquí se entenderá que se toman en su significado ordinario en la técnica pertinente a menos que se especifique lo contrario. Varios términos utilizados aquí y sus significados se exponen a continuación.

Como se utiliza aquí, el término "sembrado activo" se refiere a las fuerzas no difusivas impuestas en uno o más ácidos nucleicos para mover el ácido(s) nucleico(s) hacia o lejos de una ubicación. La ubicación puede ser un sitio de amplificación de una matriz. Las fuerzas no difusivas pueden ser proporcionadas por una fuente externa como aquellas que producen campos eléctricos o magnéticos, o un agente que impone un apiñamiento molecular o gradientes químicos dentro de un volumen de reacción.

Como se utiliza aquí, el término "amplicón", cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico, significa el producto de la copia del ácido nucleico, en donde el producto tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que o complementaria a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico. Un amplicón se puede producir por uno cualquiera de una variedad de métodos de amplificación que utilizan el ácido nucleico, o un amplicón del mismo, como una plantilla incluyendo, por ejemplo, extensión de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), extensión de ligadura, o reacción en cadena de ligadura. Un amplicón puede ser una molécula de ácido nucleico que tiene una única copia de una secuencia de nucleótidos particular (por ejemplo, un producto de PCR) o múltiples copias de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un producto concatamérico de RCA). Un primer amplicón de un ácido nucleico diana es típicamente una copia complementaria. Los amplicones posteriores son copias que se crean, después de la generación del primer amplicón, a partir del ácido nucleico diana o de su primer amplicón. Un amplicón posterior puede tener una secuencia que es sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana o sustancialmente idéntica al ácido nucleico diana.

Como se utiliza aquí, el término "sitio de amplificación" se refiere a un sitio en o sobre una matriz donde se pueden generar uno o más amplicones. Un sitio de amplificación se puede configurar adicionalmente para contener, mantener o unir al menos un amplicón que se genera en el sitio.

- Como se utiliza aquí, el término “matriz” se refiere a una población de sitios que se pueden diferenciar unos de otros de acuerdo con la ubicación relativa. Diferentes moléculas que están en diferentes sitios de una matriz se pueden diferenciar unas de otras de acuerdo con las ubicaciones de los sitios en la matriz. Un sitio individual de una matriz puede incluir una o más moléculas de un tipo particular. Por ejemplo, un sitio puede incluir una molécula de ácido nucleico diana única que tiene una secuencia particular o un sitio puede incluir varias moléculas de ácido nucleico que tienen la misma secuencia (y/o secuencia complementaria, de las mismas). Los sitios de una matriz pueden ser características diferentes localizadas en el mismo sustrato. Características ejemplares incluyen sin limitación, pocillos en un sustrato, perlas (u otras partículas) en o sobre un sustrato, proyecciones de un sustrato, crestas en un sustrato o canales en un sustrato. Los sitios de una matriz pueden ser sustratos separados que llevan cada uno una molécula diferente. Las moléculas diferentes unidas a sustratos separados se pueden identificar de acuerdo con las ubicaciones de los sustratos en una superficie a la que se asocian los sustratos o de acuerdo con las ubicaciones de los sustratos en un líquido o gel. Matrices ejemplares en las que los sustratos separados están situados en una superficie incluyen, sin limitación, aquellos que tienen perlas en pocillos.
- Como se utiliza aquí, el término “capacidad”, cuando se utiliza en referencia a un sitio y material de ácido nucleico, significa la cantidad máxima de material de ácido nucleico que puede ocupar el sitio. Por ejemplo, el término se puede referir al número total de moléculas de ácido nucleico que pueden ocupar el sitio en una condición particular. Se pueden utilizar otras medidas incluyendo así, por ejemplo, la masa total de material de ácido nucleico o el número total de copias de una secuencia de nucleótidos particular que puede ocupar el sitio en una condición particular. Típicamente, la capacidad de un sitio para un ácido nucleico diana será sustancialmente equivalente a la capacidad del sitio para amplícones del ácido nucleico diana.
- Como se utiliza aquí, el término “agente de captura” se refiere a un material, producto químico, molécula o resto de la misma que es capaz de adjuntar, retener o unirse a una molécula diana (por ejemplo, un ácido nucleico diana). Agentes de captura ejemplares incluyen, sin limitación, un ácido nucleico de captura que es complementario a al menos una porción de un ácido nucleico diana, un miembro de un par de unión receptor-ligando (por ejemplo, avidina, estreptavidina, biotina, lecitina, carbohidrato, proteína de unión a ácido nucleico, epítope, anticuerpo, etc) capaz de unirse a un ácido nucleico diana (o resto de unión unido a la misma), o un reactivo químico capaz de formar un enlace covalente con un ácido nucleico diana (o resto de unión unido al mismo).
- Como se utiliza aquí, el término “población clonal” se refiere a una población de ácidos nucleicos que es homogénea con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos particular. La secuencia homogénea es al menos típicamente de 10 nucleótidos de longitud, pero puede ser incluso más larga incluyendo por ejemplo, al menos 50, 100, 250, 500 o 1000 nucleótidos de longitud. Una población clonal puede derivarse de un ácido nucleico diana único o una plantilla de ácido nucleico. Típicamente, todos los ácidos nucleicos en una población clonal tendrán la misma secuencia de nucleótidos. Se entenderá que un pequeño número de mutaciones (por ejemplo, debido a los artefactos de amplificación) pueden ocurrir en una población clonal sin apartarse de la clonalidad.
- Como se utiliza aquí, el término “ciclo de desnaturalización” se refiere a una manipulación de una reacción de amplificación de ácido nucleico que cambia el curso de la reacción de amplificación de tal manera que las cadenas de ácido nucleico complementarias se separan unas de otras. Manipulaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, introducir un reactivo químico que desnaturalice los ácidos nucleicos, o altere físicamente la reacción, por calentamiento u otra manipulación, para desnaturalizar los ácidos nucleicos. Varios ciclos de desnaturalización se pueden incluir en una reacción de amplificación cíclica. Otros varios ciclos se pueden incluir también como manipulaciones cíclicas para inducir un cebador para hibridar a una cadena de ácido nucleico. Uno o más ciclos de desnaturalización u otros ciclos se pueden omitir en un método establecido aquí. Como tal, una reacción de amplificación de la presente descripción se puede llevar a cabo sin manipulaciones químicas en al menos algunas realizaciones.
- Como se utiliza aquí, el término “diferente”, cuando se utiliza en referencia a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos tienen secuencias de nucleótidos que no son iguales entre sí. Dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes en toda su longitud. Alternativamente, dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de una parte sustancial de su longitud. Por ejemplo, dos o más ácidos nucleicos pueden tener porciones de secuencia de nucleótidos diana que son diferentes entre sí mientras que también tienen una región de secuencia universal que son iguales entre sí.
- Como se utiliza aquí, el término “acceso fluídico”, cuando se utiliza en referencia a una molécula en un fluido y un sitio en contacto con el fluido, se refiere a la habilidad de la molécula para moverse en o a través del fluido para ponerse en contacto o entrar en el sitio. El término puede referirse también a la habilidad de la molécula para separarse de o salir del sitio para entrar en la solución. El acceso fluídico puede ocurrir cuando no hay barreras que impidan a la molécula entrar al sitio, ponerse en contacto con el sitio, separarse del sitio y/o salir del sitio. Sin embargo, el acceso fluídico se entiende que existe incluso si la difusión se retarda, reduce o altera siempre que el acceso no se evite absolutamente.
- Como se utiliza aquí, el término “bicatenario”, cuando se utiliza en referencia a una molécula de ácido nucleico, significa que sustancialmente todos los nucleótidos en una molécula de ácido nucleico están unidos por puentes de hidrógeno a un nucleótido complementario. Un ácido nucleico parcialmente bicatenario puede tener al menos un

- 10%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de sus nucleótidos unidos por puentes de hidrógeno a un nucleótido complementario.
- Como se utiliza aquí, el término "cada uno", cuando se utiliza en referencia a una colección de elementos, está destinado a identificar un elemento individual en la colección pero no se refiere necesariamente a cada elemento en la colección a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.
- Como se utiliza aquí, el término "volumen excluido" se refiere al volumen de espacio ocupado por una molécula particular a la exclusión de otras moléculas.
- Como se utiliza aquí, el término "extendible" o "estado extendible" cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico tal como un cebador, significa que el ácido nucleico es competente para la adición de un nucleótido (por ejemplo, mediante catálisis de polimerasa) o adición de un oligonucleótido (por ejemplo, mediante catálisis de ligasa). Un ácido nucleico que es "no-extensible" o en un "estado no-extensible" no es tan competente, por ejemplo, debido a la presencia de un resto de bloqueo de extensión o la ausencia de un hidroxilo en 3'.
- Como se utiliza aquí, el término "región intersticial" se refiere a un área en un sustrato o en una superficie que separa otras áreas del sustrato o superficie. Por ejemplo, una región intersticial puede separar una característica de una matriz de otra característica de la matriz. Las dos regiones que están separadas una de otra pueden ser discretas, sin contacto entre ellas. En otro ejemplo, una región intersticial puede separar una primera parte de una característica de una segunda parte de una característica. La separación proporcionada por una región intersticial puede ser una separación parcial o total. Las regiones intersticiales tendrán típicamente un material de superficie que difiere del material de superficie de las características en la superficie. Por ejemplo, las características de una matriz pueden tener una cantidad o concentración de agentes de captura o cebadores que excede la cantidad o concentración presente en las regiones intersticiales. En algunas realizaciones los agentes de captura o cebadores pueden no estar presentes en las regiones intersticiales.
- Como se utiliza aquí, el término "polimerasa" se pretende que sea coherente con su uso en la técnica e incluye, por ejemplo, una enzima que produce una réplica complementaria de una molécula de ácido nucleico utilizando el ácido nucleico como una cadena plantilla. Típicamente, las DNA polimerasas se unen a la cadena plantilla y después desplazan secuencialmente la cadena plantilla añadiendo nucleótidos al grupo hidroxilo libre en el extremo 3' de la cadena creciente de ácido nucleico. Las DNA polimerasas sintetizan normalmente moléculas de RNA complementarias a partir de plantillas de DNA y las RNA polimerasas sintetizan normalmente moléculas de RNA a partir de plantillas de DNA (transcripción). Las polimerasas pueden utilizar un RNA corto o cadena de DNA, llamado cebador, para iniciar el crecimiento de la cadena. Algunas polimerasas pueden desplazar la cadena anterior al sitio donde se están añadiendo bases a una cadena. Tales polimerasas se dice que son de desplazamiento de cadena, lo que significa que tienen una actividad que elimina una cadena complementaria de una cadena plantilla que va a ser leída por la polimerasa. Polimerasas ejemplares que tienen actividad de desplazamiento de cadena incluyen, sin limitación, el fragmento grande de Bst (*Bacillus stearothermophilus*) polimerasa, polimerasa exo-Klenow o polimerasa exo-T7 grado de secuencia. Algunas polimerasas degradan la cadena delante de ellas, sustituyéndola eficazmente con la cadena en crecimiento detrás (actividad exonucleasa 5'). Algunas polimerasas tienen una actividad que degrada la cadena detrás de ellas (actividad exonucleasa 3'). Algunas polimerasas útiles se han modificado, ya sea por mutación o de otra manera, para reducir o eliminar la actividad exonucleasa 3' y/o 5'.
- Como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico" se pretende que sea coherente con su uso en la técnica e incluye ácidos nucleicos naturales o análogos funcionales de los mismos. Particularmente análogos funcionales útiles son capaces de hibridar a un ácido nucleico de una manera específica de la secuencia o capaces de ser utilizados como una plantilla para la replicación de una secuencia de nucleótidos particular. Los ácidos nucleicos naturales tienen generalmente una cadena principal que contiene enlaces fosfodiéster. Una estructura análoga puede tener un enlace de la cadena principal alternativo incluyendo uno cualquiera de una variedad de los conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos naturales tienen generalmente un azúcar desoxirribosa (por ejemplo, encontrado en el ácido desoxirribonucleico (DNA)) o un azúcar ribosa (por ejemplo, encontrado en el ácido ribonucleico (RNA)).
- Un ácido nucleico puede contener cualquiera de una variedad de análogos de estos restos de azúcar que son conocidos en la técnica. Un ácido nucleico puede incluir bases nativas o no-nativas. En este sentido, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina, timina, citosina o guanina y un ácido ribonucleico puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo, adenina, citosina o guanina. Bases no-nativas útiles que pueden estar incluidas en un ácido nucleico son conocidas en la técnica. El término "diana", cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico, se concibe como un identificador de semántica para el ácido nucleico en el contexto de un método o composición establecido aquí y no limita necesariamente la estructura o función del ácido nucleico más allá de lo que de otra manera esté explícitamente indicado.
- Como se utiliza aquí, el término "velocidad" cuando se utiliza en referencia al transporte, amplificación, captura u otros procesos químicos, se pretende que sea coherente con su significado en cinéticas químicas y cinéticas bioquímicas. Las velocidades para dos procesos se pueden comparar con respecto a las velocidades máximas (por ejemplo, en la saturación), velocidades del estado pre-estacionario (por ejemplo, anterior al equilibrio), constantes de

velocidad cinética, u otras medidas conocidas en la técnica. En realizaciones particulares, una velocidad para un proceso particular se puede determinar con respecto al tiempo total para completar el proceso. Por ejemplo, una velocidad de amplificación se puede determinar con respecto al tiempo empleado para que la amplificación sea completa. Sin embargo, una velocidad para un proceso particular no necesita determinarse con respecto al tiempo total para completar el proceso.

Como se utiliza aquí, el término "recombinasa" se pretende que sea coherente con su uso en la técnica e incluye, por ejemplo, la proteína RecA, la proteína T4 uvsX, cualquier proteína o complejo de proteína homóloga de cualquier phyla, o variantes funcionales de las mismas.

Las RecA homólogas eucarióticas se nombran normalmente Rad51 después de que el primer miembro de este grupo sea identificado. Otras recombinasas no homólogas se pueden utilizar en lugar de RecA, por ejemplo, RecT o RecO.

Como se utiliza aquí, el término "proteína de unión monocatenaria" pretende que se refiera a cualquier proteína que tiene una función de unión a un ácido nucleico monocatenario, por ejemplo, para evitar el apareamiento prematuro, para proteger el ácido nucleico monocatenario de la digestión con nucleasa, para eliminar la estructura secundaria del ácido nucleico, o para facilitar la replicación del ácido nucleico. El término pretende incluir, pero no se limita necesariamente a, proteínas que se identifican formalmente como proteínas de unión monocatenarias por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Proteínas de unión monocatenarias ejemplares incluyen, pero no se limitan a *E. coli* SSB, T4 gp32, T7 gen 2.5 SSB, fago phi 29 SSB, cualquier proteína o complejo de proteína homóloga de cualquier phyla, o variantes funcionales de la misma.

Como se utiliza aquí, el término "transporte" se refiere al movimiento de una molécula a través de un fluido. El término puede incluir transporte pasivo tal como el movimiento de moléculas a lo largo de su gradiente de concentración (por ejemplo, difusión pasiva). El término puede incluir también transporte activo mediante el cual las moléculas se pueden mover a lo largo de su gradiente de concentración o en contra de su gradiente de concentración. Por lo tanto, el transporte puede incluir la aplicación de energía para mover una o más moléculas en una dirección deseada o en una ubicación deseada tal como un sitio de amplificación.

Tal como se utiliza aquí, el término "secuencia universal" se refiere a una región de la secuencia que es común a dos o más moléculas de ácido nucleico donde las moléculas también tienen regiones de la secuencia que difieren entre sí. Una secuencia universal que está presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la captura de múltiples ácidos nucleicos diferentes utilizando una población de ácidos nucleicos de captura universales que son complementarios a la secuencia universal. Del mismo modo, una secuencia universal presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la replicación o amplificación de múltiples ácidos nucleicos diferentes utilizando una población de cebadores universales que son complementarios a la secuencia universal. Así, un ácido nucleico de captura universal o un cebador universal incluye una secuencia que puede hibridar específicamente a una secuencia universal. Las moléculas de ácido nucleico diana se puede modificar para unir adaptadores universales, por ejemplo, a una o ambas terminaciones de secuencias diana diferentes.

La presente descripción proporciona un método para amplificar ácidos nucleicos. El método incluye las etapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de ácidos nucleicos diana diferentes; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que tiene cada uno una población clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual de la solución, en donde la reacción incluye simultáneamente (i) transportar los diferentes ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación a una velocidad de transporte promedio, y (ii) amplificar los ácidos nucleicos diana en los sitios de amplificación a una velocidad de amplificación promedio, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad de transporte promedio. En realizaciones particulares, el número de los ácidos nucleicos diana diferentes en la solución excede el número de los sitios de amplificación en la matriz. Típicamente, los diferentes ácidos nucleicos diana tienen acceso fluídico a la pluralidad de sitios de amplificación. Además, cada uno de los sitios de amplificación puede tener opcionalmente una capacidad para varios ácidos nucleicos en la pluralidad de los diferentes ácidos nucleicos.

También se proporciona un método para amplificar ácidos nucleicos que incluye las etapas de (a) proporcionar un reactivo de amplificación que incluye (i) una matriz de sitios de amplificación, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de ácidos nucleicos diana diferentes; y (b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluye cada uno una población clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual de la solución, en donde la reacción incluye (i) producir un primer amplicón de un ácido nucleico diana individual en cada uno de los sitios de amplificación, y (ii) producir amplicones posteriores del ácido nucleico diana individual en cada uno de los sitios de amplificación o del primer amplicón, en donde la velocidad promedio a la que se generan los amplicones posteriores en los sitios de amplificación excede la velocidad promedio a la que se genera el primer amplicón en los sitios de amplificación. En realizaciones particulares, el número de los ácidos nucleicos diana diferentes en la solución excede el número de sitios de amplificación en la matriz. Típicamente, los ácidos nucleicos diana diferentes tienen acceso fluídico a la pluralidad de los sitios de amplificación. Además, cada uno de los sitios de amplificación puede tener opcionalmente una capacidad para varios ácidos nucleicos en la pluralidad de diferentes ácidos nucleicos.

Una matriz de sitios de amplificación utilizada en un método establecido aquí puede estar presente como uno o más sustratos. Tipos ejemplares de materiales de sustrato que se pueden utilizar para una matriz incluyen vidrio, vidrio modificado, vidrio funcionalizado, vidrios inorgánicos, microesferas (por ejemplo, partículas inertes y/o magnéticas), plásticos, polisacáridos, nailon, nitrocelulosa, cerámicas, resinas, sílice, materiales basados en sílice, carbono, 5 metales, fibra óptica o paquetes de fibra óptica, polímeros y placas multipocillos (por ejemplo, microtitulación). Plásticos ejemplares incluyen acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos y Teflon™. Materiales basados en sílice ejemplares incluyen silicio y varias 10 formas de silicio modificado. En realizaciones particulares, un sustrato puede estar dentro o ser parte de un recipiente tal como un pocillo, tubo, canal, cubeta, placa Petri, botella o similar. Un recipiente particularmente útil es una celda de flujo, por ejemplo, como se describe en el documento de Patente US 2010/0111768 A1 o Bentley y colaboradores, *Nature* 456:53-59 (2008).

Celdas de flujo ejemplares son aquellas que están comercialmente disponibles en Illumina, Inc. (San Diego, CA). Otro recipiente particularmente útil es un pocillo en una placa multipocillo o una placa de microtitulación.

En algunas realizaciones, los sitios de una matriz se pueden configurar como características en una superficie. Las 15 características pueden estar presentes en cualquiera de una variedad de formatos deseados. Por ejemplo, los sitios pueden ser pocillos, fosos, canales, crestas, regiones elevadas, estacas, postes o similares. Como se estableció anteriormente, los sitios pueden contener perlas. Sin embargo, en realizaciones particulares los sitios no necesitan contener una perla o partícula. Los sitios ejemplares incluyen pocillos que están presentes en sustratos utilizados para plataformas de secuenciación comerciales vendidas por 454 LifeSciences (una filial de Roche, Basel, 20 Switzerland) o Ion Torrent (una filial de Life Technologies, Carlsbad, California). Otros sustratos que tienen pocillos incluyen, por ejemplo, fibra óptica grabada y otros sustratos descritos en los documentos de Patente US 6,266,459; US 6,355,431; US 6,770,441; US 6,859,570; US 6,210,891; US 6,258,568; US 6,274,320; US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; US 2010/0282617 A1 o la publicación de Patente PCT No. WO 00/63437.

En varios casos los sustratos se ejemplifican en estas referencias para aplicaciones que utilizan perlas en los 25 pocillos. Los sustratos que contienen pocillos se pueden utilizar con o sin perlas en los métodos o composiciones de la presente descripción. En algunas realizaciones, los pocillos de un sustrato pueden incluir material de gel (con o sin perlas).

Los sitios de una matriz pueden ser características de metal en una superficie no metálica tal como vidrio, plástico u otros materiales ejemplificados anteriormente. Una capa metálica se puede depositar sobre una superficie utilizando 30 métodos conocidos en la técnica tales como grabado húmedo con plasma, grabado seco con plasma, deposición de capa atómica, grabado por haz de iones, deposición química de vapor, pulverización catódica de vacío o similares. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de instrumentos comerciales como apropiados incluyendo, por ejemplo, el FlexAL®, OpAL®, Ionfab 300plus®, o sistemas Optofab 3000® (Oxford Instruments, UK). Una capa metálica se puede depositar también por evaporación por haz de electrones o pulverización catódica según lo establecido en 35 Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977). Las técnicas de deposición de capas metálicas, tales como las ejemplificadas anteriormente, se pueden combinar con técnicas de fotolitografía para crear regiones o parches de metal sobre una superficie. Métodos ejemplares para combinar las técnicas de deposición de capas metálicas y técnicas de fotolitografía se proporcionan a continuación en los Ejemplos I y II.

Una matriz de características puede aparecer como una rejilla de puntos o parches. Las características se pueden 40 situar en un patrón repetitivo o en un patrón no repetitivo irregular. Patrones particularmente útiles son patrones hexagonales, patrones rectilíneos, patrones de rejilla, patrones que tienen simetría de reflexión, patrones que tienen simetría de rotación, o similares. También pueden ser útiles patrones asimétricos. El paso puede ser el mismo entre pares diferentes de características vecinas más cercanas o el paso puede variar entre pares diferentes de características vecinas más cercanas. En realizaciones particulares, las características de una matriz pueden tener 45 cada una un área que es mayor que aproximadamente 100 nm², 250 nm², 500 nm², 1 µm², 2,5 µm², 5 µm², 10 µm², 100 µm², o 500 µm². Alternativamente o adicionalmente, las características de una matriz pueden cada una tener un área que es más pequeña que aproximadamente 1 mm², 500 µm², 100 µm², 25 µm², 10 µm², 5 µm², 1 µm², 500 nm², o 100 nm². De hecho, una región puede tener un tamaño que está en un intervalo entre un límite superior e inferior seleccionado de entre los ejemplificados anteriormente.

50 Para realizaciones que incluyen una matriz de características sobre una superficie, las características pueden ser discretas, estando separadas por regiones intersticiales. El tamaño de las características y/o espaciamiento entre las regiones puede variar de tal manera que las matrices pueden ser de alta densidad, densidad media o baja densidad. Las matrices de alta densidad se caracterizan por tener regiones separadas por menos de aproximadamente 15 µm. Las matrices de densidad media tienen regiones separadas por aproximadamente 15 a 30 µm, mientras que las 55 matrices de baja densidad tienen regiones separadas por más de 30 µm. Una matriz útil en la invención puede tener regiones que están separadas por menos de 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm o 0,5 µm.

En realizaciones particulares, una matriz puede incluir una colección de perlas u otras partículas. Las partículas 60 pueden estar suspendidas en una solución o pueden estar situadas en la superficie de un sustrato. Ejemplos de matrices de perlas en solución son aquellas comercializadas por Luminex (Austin, TX). Ejemplos de matrices que tienen perlas situadas en una superficie incluyen aquellas en las que las perlas están situadas en pocillos tales como

una matriz BeadChip (Illumina Inc., San Diego CA) o sustratos utilizados en plataformas de secuenciación de 454 LifeSciences (una filial de Roche, Basel, Switzerland) o Ion Torrent (una filial de Life Technologies, Carlsbad, California). Otras matrices que tienen perlas situadas en una superficie se describen en los documentos de Patente US 6,266,459; US 6,355,431; US 6,770,441; US 6,859,570; US 6,210,891; US 6,258,568; US 6,274,320; US 5 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; US 2010/0282617 A1 o la publicación de Patente PCT No. WO 00/63437.

Varias de las referencias anteriores describen métodos para unir ácidos nucleicos diana a las perlas antes de cargar las perlas en o sobre un sustrato de la matriz. Sin embargo, se entenderá que las perlas se pueden preparar para incluir cebadores de amplificación y las perlas se pueden utilizar después para cargar una matriz, formando de esta manera sitios de amplificación para su uso en un método descrito aquí. Como se estableció aquí previamente, los sustratos se pueden utilizar sin perlas. Por ejemplo, los cebadores de amplificación se pueden unir directamente a los pocillos o al material de gel en los pocillos. Por lo tanto, las referencias son ilustrativas de los materiales, composiciones o aparatos que se pueden modificar para su uso en los métodos y composiciones establecidas aquí.

10 Los sitios de amplificación de una matriz pueden incluir una pluralidad de agentes de captura capaces de unirse a ácidos nucleicos diana. Agentes de captura ejemplares incluyen receptores y/o ligandos que tienen una respectiva pareja de unión unida a ácidos nucleicos diana, ejemplos de los cuales se han establecido previamente aquí. Un agente de captura particularmente útil es un ácido nucleico de captura que es complementario a una secuencia de uno o más ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de captura que están presentes en un sitio de amplificación pueden tener una secuencia de captura universal que es complementaria a una secuencia universal que está presente en una secuencia adaptadora de cada ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de captura puede funcionar también como un cebador para la amplificación del ácido nucleico diana (si o no contenga también una secuencia universal).

15 En realizaciones particulares, un agente de captura, tal como un ácido nucleico de captura, se puede unir a un sitio de amplificación. Por ejemplo, el agente de captura se puede unir a la superficie de una característica de una matriz. La unión puede realizarse a través de una estructura intermedia tal como una perla, partícula o gel. La unión de los ácidos nucleicos de captura a una matriz mediante un gel se muestra a continuación en el Ejemplo I y ejemplificado además por celdas de flujo disponibles comercialmente de Illumina Inc. (San Diego, CA) o descrito en el documento de Patente 20 WO 2008/093098. Geles ejemplares que pueden utilizarse en los métodos y aparatos establecidos aquí incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen una estructura coloidal, tal como la agarosa; estructura de malla de polímero, tal como la gelatina; o estructura de polímero reticulado, tal como la poliacrilamida, SFA (véase, por ejemplo, el documento de Patente US Pat. App. Pub. No. 2011/0059865 A1) o PAZAM. La unión mediante una perla se puede lograr como se exemplifica en la descripción y en las referencias citadas establecidas previamente aquí.

25 En realizaciones particulares, las características en la superficie de un sustrato de la matriz no son contiguas, estando separadas por regiones intersticiales de la superficie. Las regiones intersticiales que tienen una cantidad o concentración sustancialmente más baja de agentes de captura, comparado con las características de la matriz, son ventajosas. Las regiones intersticiales que carecen de agentes de captura son particularmente ventajosas. Por ejemplo, una cantidad relativamente pequeña o ausencia de moléculas de captura en las regiones intersticiales favorece la localización de ácidos nucleicos diana, y clústeres posteriormente generados, a las características deseadas. En realizaciones particulares, las características pueden ser características cóncavas en una superficie (por ejemplo, pocillos) y las características pueden contener un material de gel. Las características que contienen gel pueden estar separadas unas de otras por regiones intersticiales en la superficie donde el gel está sustancialmente ausente o, si está presente el gel es sustancialmente incapaz de soportar la localización de ácidos nucleicos. Métodos y composiciones para preparar y utilizar sustratos que tienen gel que contiene características, tales como pocillos, se conocen en la técnica.

30 40 45 Los ácidos nucleicos diana utilizados en un método o composición de la presente descripción pueden estar compuestos de DNA, RNA o análogos de los mismos. La fuente de los ácidos nucleicos diana pueden ser DNA genómico, RNA mensajero, u otros ácidos nucleicos de fuentes nativas. En algunos casos los ácidos nucleicos diana que se derivan de tales fuentes se pueden amplificar antes de su uso en un método o composición aquí. Cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación conocidas se puede utilizar incluyendo, pero no limitado a, una reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), o amplificación de cebadores aleatorios (RPA). Se entenderá que la amplificación de ácidos nucleicos diana antes de su uso en un método o composición establecida aquí es opcional. Como tal, los ácidos nucleicos diana no se amplificarán antes de su uso en algunas realizaciones de los métodos y composiciones establecidas aquí. Los ácidos nucleicos diana se pueden derivar opcionalmente de bibliotecas sintéticas. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden tener composiciones de DNA o RNA nativas o pueden ser análogos de los mismos.

50 55 60 Muestras biológicas ejemplares de las que pueden derivarse los ácidos nucleicos diana incluyen, por ejemplo, las de un mamífero tal como un roedor, ratón, rata, conejo, conejillo de indias, ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate, primate humano o no humano; una planta tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, canola, o soja; un alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquitos, mosca de la fruta, miel de abeja o araña; un pez tal como el pez cebra; un reptil; un anfibio tal como una rana o *Xenopus laevis*; un *dictyostelium discoideum*; un

hongo tal como *pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*; o un plamodium falciparum. Los ácidos nucleicos diana pueden derivarse también de un procariota tal como una bacteria, *Escherichia coli*, *staphylococcí* o *mycoplasma pneumoniae*; arqueas; un virus tal como el virus de la hepatitis C o el virus de inmunodeficiencia humana; o un viroide. Los ácidos nucleicos diana pueden derivarse de un cultivo o población homogénea de los organismos anteriores o alternativamente de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Los ácidos nucleicos diana no necesitan derivarse de fuentes naturales y pueden en cambio sintetizarse utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, las sondas de expresión génica o las sondas de genotipificación se pueden sintetizar y utilizar para crear una matriz en los métodos establecidos aquí.

10 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana se pueden obtener como fragmentos de uno o más ácidos nucleicos más grandes. La fragmentación se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, nebulización, sonicación, escisión química, escisión enzimática, o cizallamiento físico.

15 La fragmentación puede resultar también del uso de una técnica de amplificación particular que produce amplicones al copiar solo una porción de un ácido nucleico más grande. Por ejemplo, la amplificación por PCR produce fragmentos que tienen un tamaño definido por la longitud del fragmento entre los cebadores flanqueantes utilizados para la amplificación.

20 Una población de ácidos nucleicos diana, o amplicones de los mismos, pueden tener una longitud promedio de cadena que es la deseada o apropiada para una aplicación particular de los métodos o composiciones establecidos aquí. Por ejemplo, la longitud promedio de cadena puede ser menor de aproximadamente 100.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 100 nucleótidos, o 50 nucleótidos. Alternativamente o adicionalmente, la longitud promedio de cadena puede ser mayor de aproximadamente 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, o 100.000 nucleótidos. La longitud promedio de cadena para una población de ácidos nucleicos, o amplicones de los mismos, puede estar en un intervalo entre un valor máximo y mínimo establecido anteriormente. Se entenderá que los amplicones generados en un sitio de amplificación (o fabricados o utilizados de otro modo aquí) pueden tener una longitud promedio de cadena que está en un intervalo entre un límite superior e inferior seleccionado de aquellos especificados anteriormente.

30 En algunos casos una población de ácidos nucleicos diana se puede producir bajo condiciones o configurarse de otra manera para tener una longitud máxima para sus miembros. Por ejemplo, la longitud máxima para los miembros que se utilizan en una o más etapas de un método establecido aquí o que están presentes en una composición particular puede ser inferior a aproximadamente 100.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos. Alternativamente o adicionalmente, una población de ácidos nucleicos diana, o amplicones de los mismos, pueden producirse bajo 35 condiciones o configurarse de otra manera para tener una longitud mínima para sus miembros. Por ejemplo, la longitud mínima para los miembros que se utilizan en una o más etapas de un método establecido aquí o que están presentes en una composición particular puede ser mayor de aproximadamente 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, o 100.000 nucleótidos. La longitud de cadena máxima y mínima para ácidos nucleicos diana en una población puede 40 estar en un intervalo entre un valor máximo y mínimo establecido aquí. Se entenderá que los amplicones generados en un sitio de amplificación (o fabricados o utilizados de otro modo aquí) pueden tener longitudes de cadena máximas y/o mínimas en un intervalo entre los límites superior e inferior especificados anteriormente.

45 En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos diana se dimensionan con relación al área de los sitios de amplificación, por ejemplo, para facilitar la exclusión cinética. Por ejemplo, el área para cada uno de los sitios de una matriz puede ser mayor que el diámetro del volumen excluido de los ácidos nucleicos diana para lograr la exclusión cinética. Tomando, por ejemplo, realizaciones que utilizan una matriz de características en una superficie, el área para cada una de las características puede ser mayor que el diámetro del volumen excluido de los ácidos nucleicos diana que se transportan a los sitios de amplificación. El volumen excluido para un ácido nucleico diana y su diámetro se pueden determinar, por ejemplo, a partir de la longitud del ácido nucleico diana. Los métodos para 50 determinar el volumen excluido de ácidos nucleicos y el diámetro del volumen excluido se describen, por ejemplo, en el documento de Patente US 7,785,790; Rybenkov y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5307-5311 (1993); Zimmerman y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 222:599-620 (1991); o Sobel y colaboradores, *Biopolymers* 31:1559-1564 (1991).

55 Los sitios de amplificación de una matriz pueden incluir una pluralidad de cebadores que se utilizan para producir amplicones de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los cebadores que están presentes en un sitio de amplificación pueden tener una secuencia de cebado universal que es complementaria a una secuencia universal que está presente en una secuencia adaptadora de cada uno de los ácidos nucleicos diana. En realizaciones particulares, la pluralidad de cebadores se puede unir al sitio de amplificación. Los cebadores se pueden unir a un sitio de amplificación como se estableció anteriormente para ácidos nucleicos de captura.

Como se estableció previamente aquí, las características en la superficie de un sustrato de matriz pueden ser no contiguas, estando separadas por regiones intersticiales de la superficie. En realizaciones particulares, las regiones intersticiales tendrán una cantidad o concentración sustancialmente menor de cebadores, en comparación con las características de la matriz. Las regiones intersticiales que carecen de cebadores son particularmente ventajosas.

5 Por ejemplo, una cantidad relativamente pequeña o ausencia de cebadores en las regiones intersticiales favorecen la localización de amplicones a las características en la superficie de la matriz. Esta configuración crea un borde para cada característica de la matriz, comunicando de ese modo la característica con una capacidad finita para amplicones producidos por amplificación de un ácido nucleico diana sembrado en los métodos establecidos aquí.

10 Un método de la presente descripción puede incluir una etapa de reacción de un reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluye cada uno una población clonal de amplicones a partir de un ácido nucleico diana individual que se ha sembrado en el sitio. En algunas realizaciones la reacción de amplificación continua hasta que se generan un número suficiente de amplicones para llenar la capacidad del sitio de amplificación respectivo. Llenar un sitio ya sembrado a su capacidad de esta manera excluye los ácidos nucleicos diana posteriores de aterrizar en el sitio, produciendo así una población clonal de amplicones en el sitio. Así, es
15 deseable en algunas realizaciones que la velocidad a la cual se generan los amplicones para llenar la capacidad de los sitios de amplificación exceda la velocidad a la cual los ácidos nucleicos diana individuales se transportan a los sitios de amplificación individuales respectivamente.

20 En algunas realizaciones, la clonalidad aparente se puede lograr incluso si un sitio de amplificación no se llena hasta su capacidad antes de que un segundo ácido nucleico diana llegue al sitio. Bajo algunas condiciones, la amplificación de un primer ácido nucleico diana puede continuar hasta el punto de que se realiza un número suficiente de copias para superar o arrollar de manera efectiva la producción de copias a partir de un segundo ácido nucleico diana que se transporta al sitio. Por ejemplo en una realización que utiliza un proceso de amplificación de puente en una característica particular que es menor que 500 nm de diámetro, se ha determinado que después de 25 14 ciclos de amplificación exponencial para un primer ácido nucleico diana, la contaminación de un segundo ácido nucleico diana en el mismo sitio producirá un número insuficiente de amplicones contaminantes para impactar adversamente en el análisis de la secuenciación por síntesis en una plataforma de secuenciación Illumina.

25 Como se demostró mediante los ejemplos anteriores, los sitios de amplificación en una matriz no necesitan ser enteramente clonales en todas las realizaciones. Más bien, para algunas aplicaciones, un sitio de amplificación individual puede poblarse predominantemente con amplicones de un primer ácido nucleico diana y también puede tener un bajo nivel de amplicones contaminantes de un segundo ácido nucleico diana. Una matriz puede tener uno o más sitios de amplificación que tengan un bajo nivel de amplicones contaminantes siempre que el nivel de la contaminación no tenga un impacto inaceptable en los usos posteriores de la matriz. Por ejemplo, cuando una matriz va a utilizarse en una aplicación de detección, un nivel aceptable de contaminación sería un nivel que no afecte la señal al ruido o resolución de la técnica de detección de una forma inaceptable. De acuerdo con esto, la clonalidad aparente será generalmente relevante para un uso o aplicación particular de una matriz preparada por los métodos descritos aquí. Niveles ejemplares de contaminación que pueden ser aceptables en un sitio de amplificación individual para aplicaciones particulares incluyen, pero no se limitan a, como máximo 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10% o 40 25% de amplicones contaminantes. Una matriz puede incluir uno o más sitios de amplificación que tengan estos niveles ejemplares de amplicones contaminantes. Por ejemplo, hasta el 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, o incluso 100% de los sitios de amplificación en una matriz pueden tener algunos amplicones contaminantes.

45 En realizaciones particulares, se lleva a cabo un método de la presente descripción para simultáneamente (i) transportar ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación a una velocidad de transporte promedio, y (ii) amplificar los ácidos nucleicos diana que están en los sitios de amplificación a una velocidad de amplificación promedio, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad de transporte promedio. En consecuencia, la exclusión cinética se puede lograr en dichas realizaciones utilizando una velocidad de transporte relativamente lenta. Por ejemplo, se puede seleccionar una concentración de ácidos nucleicos diana suficientemente baja para lograr una velocidad de transporte promedio deseada, concentraciones más bajas dan como resultado velocidades de transporte promedio mas lentas. Alternativamente o adicionalmente, se puede utilizar una solución de alta viscosidad y/o la presencia de reactivos de aglomeración molecular en la solución para reducir las velocidades de transporte. Ejemplos de reactivos de aglomeración molecular útiles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), ficol, destrano, o alcohol polivinílico. Reactivos de aglomeración molecular ejemplares y formulaciones se describen en el documento de Patente US 7,399,590. Otro factor que se puede ajustar para lograr una velocidad de transporte deseada es el tamaño promedio de los ácidos nucleicos diana.

55 En algunas realizaciones de los métodos, los ácidos nucleicos diana se pueden transportar, por ejemplo por difusión u otros procesos, a los sitios de amplificación, antes del inicio de la amplificación. En este caso, la exclusión cinética se puede lograr aprovechando una velocidad relativamente lenta para crear un primer amplicón en comparación con la velocidad a la que se preparan los amplicones posteriores. Por ejemplo, se pueden lograr diferentes velocidades de formación del amplicón usando un primer cebador para la formación del primer amplicón que está inicialmente en un estado temporal no extendible y otros cebadores para la formación de los amplicones posteriores que están en un estado extendible a lo largo de la reacción de amplificación. Como tal, un retraso en la conversión del primer cebador a un estado extensible causará un retraso en la formación del primer amplicón, mientras que la formación de amplicones posteriores no experimenta tal retraso. De esta forma, la velocidad promedio a la que se generan los

amplicones posteriores en los sitios de amplificación excede la velocidad promedio a la que se genera el primer amplicón en los sitios de amplificación.

Después viene un ejemplo más detallado de exclusión cinética mediante velocidades diferenciales de formación de amplicones. Un sitio de amplificación puede incluir tres subpoblaciones de cebadores unidos al mismo. La primera 5 subpoblación de cebadores funciona para capturar un ácido nucleico diana (mediante una secuencia de captura) y como un cebador para la formación del primer amplicón. La primera subpoblación de cebadores se bloquea de forma reversible desde la extensión, por ejemplo, mediante un didesoxinucleótido en el extremo 3'. La segunda subpoblación de cebadores puede tener una secuencia de cebadores P5 y una tercera población de cebadores 10 puede tener una secuencia de cebadores P7. Los cebadores de la primera y segunda subpoblaciones no incluyen el didesoxinucleótido y son, por lo tanto, totalmente competentes para la extensión. Los ácidos nucleicos diana se pueden construir para incluir (de 5' a 3') una secuencia de unión a un cebador P7, una de varias secuencias de nucleótidos diana diferentes, una secuencia de unión a un cebador P5, y un complemento de secuencia de captura. Varios ácidos nucleicos diana diferentes pueden hibridarse a la primera subpoblación de cebadores (mediante 15 secuencias de captura).

15 Los cebadores de captura pueden convertirse después a un estado extensible, por ejemplo, por tratamiento con una polimerasa bajo condiciones de pirofosforolisis (por ejemplo, en presencia de un exceso de pirofosfato). Las condiciones se pueden utilizar cuando, en promedio, solo uno de los cebadores de captura se convertirá en una forma extensible durante el periodo de tiempo en el que se producen los amplicones posteriores para llenar el sitio 20 de amplificación. Por lo tanto, aunque pueden estar presentes varios ácidos nucleicos diana potencialmente contaminantes en un sitio de amplificación individual, la exclusión cinética dará como resultado la formación de un amplicón a partir de solo uno de los ácidos nucleicos diana, creando de este modo una población clonal de amplicones en el sitio de amplificación. Con fines ilustrativos este ejemplo se ha descrito con respecto a un sitio de amplificación único, pero se entenderá que la reacción puede implicar la unión y amplificación de los ácidos nucleicos diana en una matriz de los sitios de amplificación.

25 Una cualquiera de una variedad de cebadores temporalmente no extensibles se puede utilizar en un método descrito aquí junto con las técnicas y reactivos respectivos para convertir esos cebadores a un estado estensible. El ejemplo anteriormente descrito utiliza un didesoxinucleótido que se elimina por pirofosforolisis. Otros nucleótidos no extensibles pueden presentarse en un cebador y eliminarse por pirofosforolisis. Además, didesoxinucleótidos u otros nucleótidos no extensibles se pueden eliminar mediante otras técnicas conocidas que incluyen, por ejemplo, la 30 actividad exonucleasa de una polimerasa u otra enzima apropiada. En otras realizaciones, un cebador puede incluir un terminador reversible tal como los utilizados en los métodos de secuenciación por síntesis basados en terminadores. Ejemplos de terminadores reversibles y técnicas para su eliminación se describen, por ejemplo, en Bentley y colaboradores, *Nature* 456:53-59 (2008), los documentos de Patente WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7,329,492; US 7,211,414; US 7,315,019; US 7,405,281, y US 2008/0108082.

35 Aunque el uso de cebadores diferencialmente activos para causar velocidades diferentes de formación del primer amplicón y amplicones posteriores se ha ejemplificado anteriormente para una realización donde los ácidos nucleicos diana están presentes en los sitios de amplificación antes de la amplificación, el método se puede llevar a cabo también bajo condiciones en donde los ácidos nucleicos diana se transportan (por ejemplo, mediante difusión) a los sitios de amplificación a medida que se produce la amplificación. Por lo tanto, la exclusión cinética puede aprovechar tanto una 40 velocidad de transporte relativamente lenta y una producción del primer amplicón relativamente lenta en relación con la formación de amplicones posteriores. Por lo tanto una reacción de amplificación descrita aquí puede llevarse a cabo de modo que los ácidos nucleicos diana se transporten de la solución a los sitios de amplificación simultáneamente con (i) la producción de un primer amplicón, y (ii) la producción de los amplicones posteriores en otros sitios de la matriz. En realizaciones particulares, la velocidad promedio a la que se generan los amplicones posteriores en los sitios de amplificación 45 puede exceder la velocidad promedio a la que se transportan los ácidos nucleicos diana desde la solución a los sitios de amplificación. En algunos casos, un número suficiente de amplicones se pueden generar a partir de un único ácido nucleico diana en un sitio de amplificación individual para llenar la capacidad del sitio de amplificación respectivo. La velocidad a la que se generan los amplicones para llenar la capacidad de los sitios de amplificación respectivos puede, por ejemplo, exceder la velocidad a la que se transportan los ácidos nucleicos diana individuales 50 desde la solución a los sitios de amplificación.

Un reactivo de amplificación que se utiliza en un método descrito aquí es preferiblemente capaz de realizar rápidamente copias de ácidos nucleicos diana en los sitios de amplificación. Típicamente un reactivo de amplificación utilizado en un método de la presente descripción incluirá una polimerasa y nucleótidos trifosfato (NTPs). Se pueden utilizar cualquiera de una variedad de polimerasas conocidas en la técnica, pero en algunas realizaciones es preferible 55 utilizar una polimerasa que sea exonucleasa negativa. Los NTPs pueden ser desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) para realizaciones en las que se hacen copias de DNA. Típicamente las cuatro especies nativas dATP, dTTP, dGTP y dCTP, estarán presentes en un reactivo de amplificación de DNA; sin embargo, se pueden utilizar análogos si se desean. Los NTPs pueden ser ribonucleótidos trifosfatos (rNTPs) para realizaciones en las que se hacen copias de RNA. Típicamente las cuatro especies nativas rATP, rUTP, dGTP y dCTP, estarán presentes en un reactivo de amplificación de RNA; sin embargo, se pueden utilizar análogos si se desean.

60 Un reactivo de amplificación puede incluir además componentes que facilitan la formación del amplicón y en algunos

casos aumentan la velocidad de formación del amplicón. Un ejemplo es una recombinasa. La recombinasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir la invasión/extensión repetida. Más específicamente, la recombinasa puede facilitar la invasión de un ácido nucleico diana por la polimerasa y la extensión de un primer cebador por la polimerasa utilizando el ácido nucleico diana como plantilla para la formación del amplicón. Este proceso puede repetirse como una reacción en cadena donde los amplicones producidos a partir de cada ronda de invasión/extensión sirven como plantilla en una ronda posterior. El proceso puede ocurrir más rápidamente que la PCR estándar ya que no se requiere un ciclo de desnaturización (por ejemplo, mediante calentamiento o desnaturización química). Como tal, la amplificación facilitada por recombinasa se puede llevar a cabo isotérmicamente. Es generalmente deseable incluir ATP, u otros nucleótidos (o en algunos casos análogos no hidrolizables de los mismos) en un reactivo de amplificación facilitado por recombinasa para facilitar la amplificación. Una mezcla de recombinasa y una proteína de unión monocatenaria (SSB) es particularmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Formulaciones ejemplares para amplificaciones facilitadas por recombinasa incluyen las vendidas comercialmente como kits TwistAmp por TwistDx (Cambridge, UK). Componentes útiles del reactivo de amplificación facilitado por recombinasa y condiciones de reacción se describen en los documentos de Patente US 5,223,414 y US 7,399,590.

Otro ejemplo de un componente que se puede incluir en un reactivo de amplificación para facilitar la formación de un amplicón y en algunos casos aumentar la velocidad de formación del amplicón es una helicasa. La helicasa puede facilitar la formación del amplicón al permitir una reacción en cadena de la formación de amplicones. El proceso puede ocurrir más rápidamente que la PCR estándar ya que no se requiere un ciclo de desnaturización (por ejemplo, mediante calentamiento o desnaturización química). Como tal, la amplificación facilitada por helicasa puede llevarse a cabo isotérmicamente. Una mezcla de helicasa y una proteína de unión monocatenaria (SSB) es particularmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Formulaciones ejemplares para la amplificación facilitada por helicasa incluyen las vendidas comercialmente como kits IsoAmp de Biohelix (Beverly, MA). Además, ejemplos de formulaciones útiles que incluyen una proteína de helicasa se describen en los documentos de Patente US 7,399,590 y US 7,829,284.

Otro ejemplo más de un componente que puede incluirse en un reactivo de amplificación para facilitar la formación del amplicón y en algunos casos aumentar la velocidad de formación del amplicón es una proteína de unión al origen.

La velocidad a la que ocurre la reacción de amplificación puede aumentarse al incrementar la concentración o cantidad de uno o más de los componentes activos de una reacción de amplificación. Por ejemplo, la cantidad o concentración de polimerasa, nucleótido trifosfato, cebadores, recombinasa, helicasa o SSB puede aumentarse al incrementar la velocidad de amplificación. En algunos casos, uno o más componentes activos de una reacción de amplificación que se aumentan en cantidad o concentración (o manipulados de otro modo en un método descrito aquí) son componentes de ácidos no nucleicos de la reacción de amplificación.

La velocidad de amplificación se puede aumentar también en un método descrito aquí ajustando la temperatura. Por ejemplo, la velocidad de amplificación en uno o más sitios de amplificación se puede aumentar al incrementar la temperatura en el sitio(s) hasta una temperatura máxima donde la velocidad de reacción disminuye debido a la desnaturización u otros eventos adversos. Las temperaturas óptimas o deseadas se pueden determinar a partir de propiedades conocidas de los componentes de amplificación en uso o empíricamente para una mezcla de reacción de amplificación dada. Las propiedades de los cebadores utilizados para la amplificación pueden ajustarse también para aumentar la velocidad de amplificación. Se puede ajustar, por ejemplo, la secuencia y/o longitud de los cebadores. Tales ajustes se pueden realizar basándose en predicciones *a priori* de la temperatura de fusión del cebador (T_m) o empíricamente.

Otra opción para aumentar la velocidad de amplificación en un sitio de amplificación es aumentar la concentración local de uno o más componentes activos de la reacción de amplificación en el sitio de amplificación. Los componentes activos pueden incluir uno o más componentes de ácidos no nucleicos. En algunas realizaciones, uno o más componentes activos de una reacción de amplificación se pueden atraer a un sitio de amplificación utilizando manipulaciones eléctricas tales como electroforesis, isotacoforesis, pulsación directa de corriente o voltaje o similares. Alternativamente o adicionalmente, uno o más de los componentes de amplificación pueden incluir una etiqueta de afinidad que lo une al sitio de amplificación. Una etiqueta de afinidad se puede cargar de manera que las manipulaciones eléctricas atraigan un componente etiquetado apropiadamente en un sitio de amplificación. Las etiquetas de afinidad sin cargas también se pueden utilizar. Por ejemplo, cualquiera de una variedad de ligandos o receptores conocidos en la técnica, tales como los descritos aquí como ejemplos de agentes de captura, se pueden utilizar como etiquetas de afinidad para un componente de una reacción de amplificación. Como es el caso para los agentes de captura utilizados para ácidos nucleicos, un sitio de amplificación puede incluir una pareja de unión para una etiqueta de afinidad de un componente de amplificación. Por lo tanto, la concentración local del componente de amplificación etiquetado por afinidad puede aumentarse debido a la interacción con la pareja adecuada en el sitio de amplificación. En realizaciones particulares donde el sitio de amplificación es una superficie de un sustrato, una pareja de unión para una etiqueta de afinidad se puede unir a la superficie.

Además, se pueden utilizar fuerzas magnéticas u ópticas para aumentar la concentración local de los reactivos de amplificación. En tales casos, uno o más reactivos de amplificación pueden incluir una etiqueta magnética o una etiqueta óptica que pueden estar manipuladas por dichas fuerzas.

- La velocidad a la que se produce una reacción de amplificación puede aumentarse incrementando la actividad de uno o más de los reactivos de amplificación. Por ejemplo, un cofactor que aumenta la velocidad de extensión de una polimerasa se puede añadir a una reacción donde se utiliza la polimerasa. En algunas realizaciones, cofactores metálicos tales como magnesio, zinc o manganeso se pueden añadir a una reacción de polimerasa o se puede añadir betaina.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos aquí, se desea utilizar una población de ácidos nucleicos diana que son bicatenarios. Se ha observado sorprendentemente que la formación del amplicón en una matriz de sitios bajo condiciones de exclusión cinética es eficaz para ácidos nucleicos diana bicatenarios. Por ejemplo, una pluralidad de sitios de amplificación que tengan poblaciones clonales de amplicones se pueden producir más eficazmente a partir de ácidos nucleicos diana bicatenarios (en comparación con ácidos nucleicos diana monocatenarios a la misma concentración) en presencia de recombinasa y una proteína de unión monocatenaria. No obstante, se entenderá que los ácidos nucleicos diana monocatenarios se pueden utilizar en algunas realizaciones de los métodos descritos aquí
- Un método descrito aquí puede utilizar cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación. Técnicas ejemplares que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), o amplificación aleatoria de cebadores (RPA). En algunas realizaciones la amplificación se puede llevar a cabo en solución, por ejemplo, cuando los sitios de amplificación son capaces de contener amplicones en un volumen que tiene una capacidad deseada. Preferiblemente, una técnica de amplificación utilizada bajo condiciones de exclusión cinética en un método de la presente descripción se llevará a cabo en fase sólida. Por ejemplo, uno o más cebadores utilizados para la amplificación se pueden unir a la fase sólida en el sitio de amplificación. En realizaciones de PCR, uno o ambos de los cebadores utilizados para la amplificación se pueden unir a una fase sólida. Los formatos que utilizan dos especies de cebador unidas a la superficie se denominan a menudo como amplificación de puente porque los amplicones bicatenarios forman una estructura como de puente entre los dos cebadores unidos a la superficie que flanquean la secuencia de la plantilla que se ha copiado. Re却tivos y condiciones ejemplares que se pueden utilizar para la amplificación de puente se describen, por ejemplo, en el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,641,658; en la publicación de Patente U.S. Patent Publ. No. 2002/0055100; en el documento de Patente U. S. Pat. No. 7,115,400; en las publicaciones de Patente U. S. Patent Publ. No. 2004/0096853; U. S. Patent Publ. No. 2004/0002090; U. S. Patent Publ. No. 2007/0128624; y U. S. Patent Publ. No. 2008/0009420.
- La amplificación por PCR en fase sólida se puede llevar a cabo también con uno de los cebadores de amplificación unido a un soporte sólido y el segundo cebador en solución. Un formato ejemplar que utiliza una combinación de un cebador unido a la superficie y un cebador soluble es una PCR en emulsión como se describe, por ejemplo, en Dressman y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8817-8822 (2003), en el documento de Patente WO 05/010145, o las publicaciones de Patente U. S. Patent Publ. Nos. 2005/0130173 o 2005/0064460.
- La PCR en emulsión es ilustrativa del formato y se entenderá que para los fines de los métodos descritos aquí el uso de una emulsión es opcional y de hecho, para varias realizaciones no se utiliza una emulsión. Las técnicas de PCR ejemplificadas anteriormente se pueden modificar para la amplificación no cíclica (por ejemplo, amplificación isotérmica) utilizando componentes ejemplificados en otra parte de este documento para facilitar o aumentar la velocidad de amplificación. En consecuencia, las técnicas de PCR ejemplificadas anteriormente se pueden utilizar bajo condiciones de exclusión cinética.
- Las técnicas de RCA se pueden modificar para su uso en un método de la presente descripción. Componentes ejemplares que se pueden utilizar en una reacción de RCA y los principios por los que RCA produce amplicones se describen, por ejemplo, en Lizardi y colaboradores, *Nat. Genet.* 19:225-232 (1998) y el documento de Patente US 2007/0099208 A1. Los cebadores utilizados para RCA pueden estar en solución o unidos a una superficie de soporte sólido en un sitio de amplificación. Las técnicas de RCA ejemplificadas en las referencias anteriores se pueden modificar de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria, por ejemplo, para aumentar la velocidad de amplificación para adaptarse a aplicaciones particulares. Por lo tanto, las técnicas RCA se pueden utilizar bajo condiciones de exclusión cinética.
- Las técnicas de MDA se pueden modificar para su uso en un método de la presente descripción. Algunos principios básicos y condiciones útiles para MDA se describen, por ejemplo, en Dean y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5261-66 (2002); Lage y colaboradores, *Genome Research* 13:294-307 (2003); Walker y colaboradores, *Molecular Methods for Virus Detection*, Academic Press, Inc., 1995; Walker y colaboradores, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992); los documentos de Patente US 5,455,166; US 5,130,238; y US 6,214,587.
- Los cebadores utilizados para MDA pueden estar en solución o unidos a una superficie de soporte sólido en un sitio de amplificación. Las técnicas de MDA ejemplificadas en las referencias anteriores se pueden modificar de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria, por ejemplo, para aumentar la velocidad de amplificación para adaptarse a aplicaciones particulares. En consecuencia, las técnicas de MDA se pueden utilizar bajo condiciones de exclusión cinética.
- En realizaciones particulares una combinación de las técnicas de amplificación ejemplificadas anteriormente se

- 5 puede utilizar para preparar una matriz bajo condiciones de exclusión cinética. Por ejemplo, RCA y MDA se pueden utilizar en una combinación en donde RCA se utiliza para generar un amplicón concatamérico en solución (por ejemplo, utilizando cebadores de fase de solución). El amplicón se puede utilizar después como una plantilla para MDA utilizando cebadores que se unen a una superficie de soporte sólido en un sitio de amplificación. En este ejemplo, los amplicones producidos después de las etapas de RCA y MDA combinadas se unirán a la superficie del sitio de amplificación.
- 10 Como se ejemplifica con respecto a varias de las realizaciones anteriores, un método de la presente descripción no necesita utilizar una técnica de amplificación cíclica. Por ejemplo, la amplificación de los ácidos nucleicos diana se puede llevar a cabo en los sitios de amplificación sin un ciclo de desnaturalización. Ciclos de desnaturalización ejemplares incluyen la introducción de desnaturizantes químicos a una reacción de amplificación y/o el aumento de la temperatura de una reacción de amplificación. Por lo tanto, la amplificación de los ácidos nucleicos diana no necesita incluir una etapa de sustitución de la solución de amplificación con un reactivo químico que desnaturaliza los ácidos nucleicos diana y los amplicones. De forma similar, la amplificación de los ácidos nucleicos diana no necesitan incluir calentar la solución a una temperatura que desnaturalice los ácidos nucleicos diana y los amplicones. En consecuencia, la amplificación de los ácidos nucleicos diana en los sitios de amplificación se puede llevar a cabo isotérmicamente durante la duración de un método descrito aquí. De hecho, un método de amplificación descrito aquí puede tener lugar sin una o más manipulaciones químicas que se llevan a cabo para algunas técnicas de amplificación bajo condiciones estándar.
- 15 20 Además, en algunas técnicas de amplificación de fase sólida estándar, se lleva a cabo un lavado después de cargar los ácidos nucleicos diana en un sustrato y antes de que se inicie la amplificación. Sin embargo, en realizaciones de los métodos presentes, no es necesario llevar a cabo una etapa de lavado entre el transporte de los ácidos nucleicos diana a los sitios de reacción y la amplificación de los ácidos nucleicos diana en los sitios de amplificación. En cambio se permite que el transporte (por ejemplo, mediante difusión) y la amplificación se produzcan simultáneamente para proporcionar la exclusión cinética.
- 25 30 35 40 45 En algunas realizaciones, puede ser deseable repetir un ciclo de amplificación que se produce bajo condiciones de exclusión cinética. Por lo tanto, aunque se pueden hacer copias de un ácido nucleico diana en un sitio de amplificación individual sin manipulaciones cíclicas, una matriz de sitios de amplificación se puede tratar cíclicamente para aumentar el número de sitios que contienen amplicones después de cada ciclo. En realizaciones particulares, las condiciones de amplificación se pueden modificar de un ciclo al siguiente. Por ejemplo, una o más de las condiciones establecidas anteriormente para alterar la velocidad de transporte o alterar la velocidad de amplificación se pueden ajustar entre ciclos. Como tal, la velocidad de transporte se puede aumentar de ciclo a ciclo, la velocidad de transporte se puede reducir de ciclo a ciclo, la velocidad de amplificación se puede aumentar de ciclo a ciclo, o la velocidad de amplificación se puede reducir de ciclo a ciclo.
- 45 Un método descrito aquí se puede modificar para utilizar el transporte asistido por campo eléctrico (campo-e) de ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación de la matriz. Por ejemplo, cada sitio de amplificación de una matriz puede acoplarse eléctricamente a una fuente de energía para producir una carga eléctrica que atraiga los ácidos nucleicos diana. En una configuración, una carga positiva en los sitios de amplificación puede atrae ácidos nucleos a través de la cadena principal azúcar-fosfato cargado negativamente. Métodos ejemplares y aparatos para usar la asistencia del campo-e para atraer los ácidos nucleicos a los sitios de una matriz se describen en el documento de Patente US 2009/0032401 A1. La asistencia del campo-e se puede utilizar en un método de la presente descripción, por ejemplo, bajo condiciones donde una pluralidad de ácidos nucleicos diana diferentes está en solución de modo que los ácidos nucleicos diana tienen un acceso fluídico a la matriz de los sitios de amplificación durante cada etapa de amplificación. La carga de cada sitio de amplificación se puede ajustar para lograr la exclusión cinética. Adicionalmente o alternativamente para ajustar la carga, se pueden ajustar otras condiciones establecidas aquí para alterar las velocidades de transporte de los ácidos nucleicos diana o para alterar las velocidades de amplificación para lograr la exclusión cinética.
- 50 Por consiguiente, la carga en los sitios de amplificación de una matriz se puede ajustar para atraer los ácidos nucleicos diana mientras que la amplificación se produce simultáneamente en varios sitios de amplificación de la matriz, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad promedio a la que se transportan los ácidos nucleicos diana (es decir, transporte asistido por campo eléctrico) a los sitios de amplificación.
- 55 60 En realizaciones particulares que utilizan el transporte asistido por un campo-e de los ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación, el campo-e puede aplicarse de forma consistente a lo largo del curso de la reacción química. Alternativamente, el campo-e se puede cambiar (por ejemplo, aumentar o disminuir) a medida que progresá la reacción de amplificación y mientras los sitios de amplificación se llenan con amplicones. Por ejemplo, aumentar el campo-e puede proporcionar el beneficio de aumentar el número de sitios de amplificación que adquieren un ácido nucleico diana (que a su vez se amplifica para producir una población clonal de amplicones en cada uno de los sitios). La velocidad a la que se aumenta el campo-e, y el intervalo de amplitud para el aumento, se pueden seleccionar para equilibrar la velocidad creciente del transporte del ácido nucleico diana a lo largo del tiempo con el número creciente de sitios de amplificación que se han llenado eficazmente durante el mismo periodo de tiempo. De nuevo, dependiendo de la aplicación de las matrices producidas por el método, el llenado efectivo puede ser el punto en el que los sitios de amplificación se llenan hasta la capacidad con copias de un primer ácido nucleico, evitando de

este modo la amplificación de cualquier ácido nucleico secundario en el sitio. Alternativamente, el llenado efectivo puede ser el punto en el que la amplificación de un segundo ácido nucleico diana en un sitio de amplificación particular produciría una fracción suficientemente baja de amplicones contaminantes para ser considerados insignificantes o de otra manera aceptables para el uso deseado de la matriz.

- 5 Generalmente, la asistencia del campo-e permite un nivel adicional de control sobre el transporte de ácidos nucleicos diana a uno o más sitios de amplificación de una matriz. Aunque el uso de la asistencia del campo-e se ha ejemplificado anteriormente en el contexto del transporte de los ácidos nucleicos diana a una matriz de los sitios de amplificación simultáneamente con la aplicación que ocurre en varios sitios de la matriz, en realizaciones alternativas la asistencia del campo-e se puede utilizar para transportar ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación antes de iniciarse la amplificación en los sitios. La asistencia del campo-e se puede utilizar en un método o composición establecido aquí para transportar biomoléculas diana distintas de ácidos nucleicos diana a un sitio de interés tal como a una característica de una matriz.

En realizaciones particulares, un campo-e se puede aplicar a todos los sitios de amplificación de una matriz de forma sustancialmente uniforme. Por lo tanto, los ácidos nucleicos diana que están en solución tendrán la misma probabilidad de ser transportados a cualquier sitio de amplificación dado. En una realización alternativa, un campo-e se puede aplicar a solo un subconjunto de sitios de amplificación que están presentes en una matriz. De este modo, la asistencia de un campo-e se puede utilizar para llenar selectivamente algunos sitios sobre otros. Además, si se desea, se puede aplicar una carga atractiva a un primer subconjunto de sitios de amplificación para transportar ácidos nucleicos diana al primer subconjunto de sitios y mientras tanto se puede aplicar una carga repelente a un segundo subconjunto de sitios de amplificación para inhibir que los ácidos nucleicos diana sean transportados a esos sitios o eliminar (por ejemplo, mediante desorción o degradación) los ácidos nucleicos diana del segundo subconjunto de sitios. Similarmente una carga repelente se puede aplicar a regiones intersticiales de una matriz para inhibir que los ácidos nucleicos diana sean transportados a las regiones intersticiales o para eliminar (por ejemplo, mediante desorción o degradación) los ácidos nucleicos diana de las regiones intesticiales como se describe con más detalle a continuación y en el Ejemplo III.

En realizaciones particulares, las regiones intersticiales de una matriz se pueden acoplar eléctricamente a una fuente de energía para producir una carga eléctrica que inhibe la unión de o elimina los ácidos nucleicos diana u otras biomoléculas. En una configuración, una carga negativa en las regiones intersticiales puede repeler los ácidos nucleicos a través de la cadena principal de azúcar-fosfato cargada negativamente. Alternativamente o adicionalmente, la carga en la región intersticial se puede utilizar para crear cambios de pH localizados en la superficie que dañan electroquímicamente los ácidos nucleicos y biomoléculas.

La repulsión del campo-e se puede utilizar en un método de la presente descripción, por ejemplo, bajo condiciones donde una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos está en solución de modo que los ácidos nucleicos diana tienen un acceso fluídico a la matriz de los sitios de amplificación durante cada etapa de amplificación. La carga en las regiones intersticiales de una matriz se puede ajustar para repeler ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante eliminación o inhibición de la unión) mientras que los ácidos nucleicos se capturan en las características de la matriz y, opcionalmente, se amplifican en las características bajo condiciones de exclusión cinética.

Adicionalmente o alternativamente para ajustar la carga, se establecen aquí otras condiciones para alterar las velocidades de transporte de los ácidos nucleicos diana a las características o para alterar las velocidades de amplificación ajustándose para lograr la exclusión cinética. En consecuencia, la carga en las regiones intersticiales de una matriz se puede ajustar para repeler los ácidos nucleicos diana mientras se produce simultáneamente la amplificación en varios sitios de amplificación de la matriz, en donde la velocidad de amplificación promedio excede la velocidad promedio a la que los ácidos nucleicos diana se transportan a los sitios de amplificación. En consecuencia, la repulsión del campo eléctrico en las regiones intersticiales se puede utilizar en combinación con otros métodos establecidos aquí para transportar los ácidos nucleicos (u otras biomoléculas) a características de una matriz y lograr la exclusión cinética.

La repulsión del campo eléctrico en las regiones intersticiales utilizando métodos y aparatos descritos aquí puede proporcionar una ventaja de mejorar la localización específica de ácidos nucleicos (u otras biomoléculas) en las características en lugar de en las regiones intersticiales. Tales ventajas pueden seguir si la repulsión funciona a través de un mecanismo de repulsión de carga para inhibir la unión de ácidos nucleicos u otras biomoléculas, mediante el daño electroquímico localizado en la superficie de ácidos nucleicos y biomoléculas o mediante otros mecanismos. La repulsión de campo eléctrico en las regiones intersticiales se puede utilizar para mejorar la localización específica de ácidos nucleicos u otras biomoléculas a características de interés, particularmente cuando las características de interés tienen una altura más alta que el alcance del daño electroquímico localizado en la superficie.

55 Algunas realizaciones pueden utilizar el transporte asistido por campo eléctrico de ácidos nucleicos (u otras biomoléculas) a las características de una matriz en combinación con la repulsión asistida por campo eléctrico de los ácidos nucleicos (u otras biomoléculas) de las regiones intersticiales de la matriz. El campo eléctrico atractivo y el campo eléctrico repulsivo se pueden aplicar simultáneamente a la matriz o los dos campos se pueden aplicar por separado. Por ejemplo, los dos campos se pueden aplicar por separado de manera que los campos se apliquen en repeticiones alternativas (por ejemplo, el campo atractivo se puede aplicar a las características mientras que el

campo respulsivo está desctivado, después el campo atractivo se puede apagar mientras el campo repulsivo se aplica a las regiones intersticiales y esta secuencia se puede repetir una o más veces).

Un campo eléctrico se puede aplicar a través de una región de una matriz y un electrolito o se puede aplicar a través de la región de la matriz y una segunda superficie. Por ejemplo, La Figura 4A muestra una configuración donde se 5 puede aplicar un campo eléctrico a través de una región intersticial de una matriz y un electrolito y la Figura 4B muestra una configuración donde se puede aplicar un campo eléctrico a través de una región intersticial de una matriz y una segunda superficie. Configuraciones similares se pueden utilizar para aplicar campos atractivos a 10 características de una matriz. Además, los campos eléctricos, ya sea aplicados a una característica o a una región intestinal, se pueden crear mediante la aplicación de una corriente alterna o una corriente continua a la región apropiada de la matriz.

Por consiguiente, la descripción proporciona un método para crear una superficie modelada de biomoléculas, en donde el método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un reactivo que incluye (i) una matriz que tiene 15 características no contiguas en la superficie, estando las características separadas por regiones intersticiales en la superficie, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de diferentes biomoléculas diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo para transportar las biomoléculas a las características y unir una biomolécula individual a cada una de las 20 características, en donde se aplica un campo eléctrico a las regiones intersticiales para repeler las biomoléculas de las regiones intersticiales. Biomoléculas particularmente útiles para su uso en el método son los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se pueden amplificar en las características en este método bajo condiciones de exclusión cinética tales como las que se exponen en otra parte de este documento. En algunas realizaciones que utilizan 25 campos eléctricos un sustrato utilizado para una matriz puede incluir una capa de conductor eléctrico transparente. La capa de conductor eléctrico transparente se puede utilizar como un electrodo para conectar una fuente eléctrica tal como una batería o un generador de señales. Si se desea, una característica de una matriz (por ejemplo, una superficie interna de un pocillo en una matriz de pocillos) puede contener una capa conductora expuesta o aislada, en donde un voltaje a través de las capas conductoras se puede utilizar para manipular la fuerza sobre un ácido 30 nucleico y/o los reactivos de amplificación para controlar la velocidad de transporte en el sitio, captura en el sitio, eliminación del sitio y/o amplificación en el sitio. En realizaciones particulares, un campo eléctrico se puede aplicar en las superficies externas de un pocillo tal que el campo eléctrico que penetra en las paredes del recipiente induce una fuerza eléctrica en los reactivos dentro del recipiente, proporcionando un grado de control sobre las velocidades de transporte, captura, eliminación y/o amplificación.

Una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método descrito aquí, se puede 35 utilizar para cualquiera de una variedad de aplicaciones. Una aplicación particularmente útil es la secuenciación de ácidos nucleicos. Un ejemplo es la secuenciación por síntesis (SBS). En la SBS, la extensión de un cebador de ácido nucleico perteneciente a una plantilla de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico diana o un amplíón del mismo) se monitoriza para determinar la secuencia de nucleótidos en la plantilla. El proceso químico posterior 40 puede ser polimerización (por ejemplo, como catalizado por la enzima polimerasa). En una realización particular de SBS basado en polimerasa, los nucleótidos marcados fluorescentemente se añaden a un cebador (extendiendo de este modo el cebador) de una manera dependiente de la plantilla de tal modo que la detección del orden y el tipo de nucleótidos añadidos al cebador se pueda utilizar para determinar la secuencia de la plantilla. Una pluralidad de diferentes plantillas en diferentes sitios de una matriz descritos aquí se puede someter a una técnica de SBS bajo 45 condiciones donde los acontecimientos que se producen para diferentes plantillas se pueden distinguir debido a su localización en la matriz.

Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para alojar una matriz que se produce mediante los métodos de la presente descripción y que se somete a una SBS u otra técnica de detección que implica la administración repetida de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más 50 nucleótidos marcados, DNA polimerasa, etc., se pueden hacer fluir dentro o a través de una celda de flujo que aloja una matriz de plantillas de ácido nucleico. Se pueden detectar estos sitios de una matriz donde la extensión del cebador provoca la incorporación de un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que finaliza la extensión adicional una vez que un nucleótido se ha añadido 55 a un cebador. Por ejemplo, un análogo de un nucleótido que tiene un resto de terminación reversible se puede añadir a un cebador de modo que la extensión posterior no puede producirse hasta que se administra un agente de desbloqueo para eliminar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que utilizan la terminación reversible, un agente de desbloqueo se puede administrar a la celda del flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados pueden llevarse a cabo entre las diferentes etapas de administración. El ciclo se puede repetir después n veces para extender el cebador por n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Procedimientos de 60 SBS, sistemas fluídicos y plataformas de detección ejemplares que se pueden adaptar rápidamente para su uso con una matriz producida por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley y colaboradores, *Nature* 456:53-59 (2008), los documentos de Patente WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7,329,492; US 7,211,414; US 7,315,019; US 7,405,281, y US 2008/0108082.

Se pueden utilizar otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tales como pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) cuando se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico naciente (Ronaghi y colaboradores, *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi y colaboradores, *Science* 281

(5375), 363 (1998); los documentos de Patente US 6,210,891; US 6,258,568 y US 6,274,320.

En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar al convertirse inmediatamente a adenosina trifosfato (ATP) mediante la ATP sulfúrilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar mediante fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede monitorizar mediante un sistema de detección de luminiscencia.

Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Sistemas fluídicos, detectores y procedimientos útiles que se pueden utilizar para la aplicación de pirosecuenciación a matrices de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente WIPO Pat. App. Ser. No. PCT/US11/57111, US 2005/0191698 A1, US 7,595,883, y US 7,244,559.

Las reacciones de secuenciación por ligamiento son también útiles incluyendo, por ejemplo, las descritas en Shendure y colaboradores, *Science* 309:1728-1732 (2005); los documentos de Patente US 5,599,675; y US 5,750,341. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación por hibridación como se describe, por ejemplo, en Bains y colaboradores, *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac y colaboradores, *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor y colaboradores, *Science* 251 (4995), 767-773 (1995); y el documento de Patente WO 1989/10977.

Tanto en los procedimientos de secuenciación por ligamiento como secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos diana (o amplicones de los mismos) que están presentes en los sitios de una matriz se someten a repetidos ciclos de administración y detección de oligonucleótidos.

Los sistemas fluídicos para los métodos de SBS como se establece aquí o en las referencias citadas aquí se pueden adaptar fácilmente para la administración de reactivos para los procedimientos de secuenciación por ligación o secuenciación por hibridación. Típicamente, los oligonucleótidos están marcados fluorescentemente y se pueden detectar utilizando detectores de fluorescencia similares a los descritos aquí con respecto a los procedimientos de SBS o en las referencias descritas aquí.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican la monitorización en tiempo real de la actividad de DNA polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de las interacciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa portadora de un fluoróforo y nucleótidos marcados con γ-fosfato, o con guías de onda de modo cero (ZMWs). Las técnicas y reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene y colaboradores, *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist y colaboradores, *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede utilizar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están comercialmente disponibles de Ion Torrent (Guilford, CT, una filial de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en los documentos de Patente US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; o US 2010/0282617 A1. Los métodos establecidos aquí para la amplificación de ácidos nucleicos diana que utilizan la exclusión cinética se pueden aplicar fácilmente a sustratos utilizados para detectar protones. Más específicamente, los métodos establecidos aquí se pueden utilizar para producir poblaciones clonales de amplicones en los sitios de las matrices que se usan para detectar protones.

Otra aplicación útil para una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método establecido aquí, es un análisis de la expresión génica. La expresión génica puede detectarse o cuantificarse utilizando técnicas de secuenciación de RNA, tales como las denominadas técnicas secuenciación digital de RNA. Las técnicas de secuenciación de RNA se pueden llevar a cabo utilizando metodologías de secuenciación conocidas en la técnica tales como las descritas anteriormente. La expresión génica se puede detectar o cuantificar también utilizando técnicas de hibridación realizadas mediante hibridación directa a una matriz o utilizando un ensayo múltiplex, cuyos productos se detectan en una matriz. Una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método descrito aquí, se puede utilizar también para determinar genotipos para una muestra de DNA genómico de uno o más individuos. Métodos ejemplares para la expresión basada en matrices y el análisis de genotipos que se puede llevar a cabo en una matriz de la presente descripción se describen en los documentos de Patente US Pat. Nos. 7,582,420; 6,890,741; 6,913,884 o 6,355,431 o las publicaciones de Patente US Pat. Pub. Nos. 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

Una ventaja de los métodos establecidos aquí es que proporcionan una creación rápida y eficaz de matrices a partir de cualquiera de una variedad de bibliotecas de ácidos nucleicos. Por consiguiente, la presente descripción proporciona sistemas integrados capaces de preparar una matriz utilizando uno o más de los métodos establecidos aquí y capaz además de detectar ácidos nucleicos en las matrices utilizando técnicas conocidas en la técnica tales como las exemplificadas anteriormente. Por lo tanto, un sistema integrado de la presente descripción puede incluir componentes fluídicos capaces de suministrar reactivos de amplificación a una matriz de los sitios de amplificación tales como bombas, válvulas, depósitos, líneas fluídicas y similares. Un componente fluido particularmente útil es

una celda de flujo. Una celda de flujo se puede configurar y/o utilizar en un sistema integrado para crear una matriz de la presente descripción y para detectar la matriz. Celdas de flujo ejemplares se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente US 2010/0111768 A1 y US Ser. No. 13/273,666.

Como se exemplifica para las celdas de flujo, uno o más componentes fluídicos de un sistema integrado se puede utilizar para un método de amplificación y para un método de detección. Tomando como ejemplo una realización de secuenciación de un ácido nucleico, uno o más de los componentes fluídicos de un sistema integrado se puede utilizar para un método de amplificación establecido aquí y para el suministro de los reactivos de secuenciación en un método de secuenciación tal como los ejemplificados anteriormente. Alternativamente, un sistema integrado puede incluir sistemas fluidos separados para llevar a cabo los métodos de amplificación y llevar a cabo los métodos de detección. Ejemplos de sistemas de secuenciación integrados que son capaces de crear matrices de ácidos nucleicos y de determinar también la secuencia de ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, la plataforma MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA) y los dispositivos descritos en el documento de Patente US Ser. No. 13/273,666.

Tales dispositivos se pueden modificar para preparar matrices utilizando la exclusión cinética de acuerdo con la orientación establecida aquí.

Un sistema capaz de llevar a cabo un método descrito aquí no necesita integrarse con un dispositivo de detección. Por el contrario, también es posible un sistema autónomo o un sistema integrado con otros dispositivos. Los componentes fluidos similares a los ejemplificados anteriormente en el contexto de un sistema integrado se pueden utilizar en dichas realizaciones.

Un sistema capaz de llevar a cabo un método descrito aquí, ya sea integrado o no con capacidades de detección, puede incluir un controlador de sistema que es capaz de ejecutar un conjunto de instrucciones para realizar una o más etapas de un método, técnica o proceso establecido aquí. Por ejemplo, las instrucciones pueden dirigir la realización de las etapas para crear una matriz bajo condiciones de exclusión cinética.

Opcionalmente, las instrucciones pueden dirigir además la realización de las etapas para detectar ácidos nucleicos utilizando los métodos establecidos previamente aquí. Un controlador de sistema útil debe incluir cualquier sistema basado en un procesador o microprocesador, incluyendo sistemas que utilizan microcontroladores, ordenadores con conjunto de instrucciones reducidas (RISC), circuitos integrados de aplicación específica (ASICs), matriz de puerta de campo programable (FPGAs), circuitos lógicos, y cualquier otro circuito o procesador capaz de ejecutar las funciones descritas aquí. Un conjunto de instrucciones para un controlador de sistema debe estar en la forma de un programa de software. Como se utiliza aquí, los términos "software" y "firmware" son intercambiables, e incluyen cualquier programa de ordenador almacenado en la memoria para su ejecución por un ordenador, incluyendo la memoria RAM, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM, y memoria RAM no volátil (NVRAM). El software puede estar en varias formas tales como un software de sistema o un software de aplicación. Además, el software puede estar en la forma de una colección de programas separados, o un módulo de programa dentro de un programa más grande o una parte de un módulo de programa. El software puede incluir también programación modular en la forma de programación orientada a objetos.

Varias aplicaciones para matrices de la presente descripción se han ejemplificado anteriormente en el contexto de la detección de conjunto, en donde múltiples amplicones presentes en cada sitio de amplificación se detectan juntos. En realizaciones alternativas, se puede detectar un único ácido nucleico, ya sea un ácido nucleico diana o un amplicón del mismo, en cada sitio de amplificación. Por ejemplo, un sitio de amplificación se puede configurar para contener una única molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos diana que ha de detectarse y una pluralidad de ácidos nucleicos de relleno. En este ejemplo, los ácidos nucleicos de relleno funcionan para llenar la capacidad del sitio de amplificación y no están necesariamente destinados a ser detectados. La molécula única que debe detectarse puede detectarse mediante un método que es capaz de distinguir la molécula individual en la cadena principal de los ácidos nucleicos de relleno. Cualquiera de una variedad de técnicas de detección de moléculas individuales se puede utilizar incluyendo, por ejemplo, modificaciones de las técnicas de detección del conjunto establecidas anteriormente para detectar los sitios a una ganancia incrementada o usando etiquetas más sensibles. Otros ejemplos de métodos de detección de moléculas individuales que se pueden utilizar se describen en el documento de Patente US 2011/0312529 A1.

Una matriz útil para la detección de un ácido nucleico de molécula individual se puede crear utilizando uno o más de los métodos establecidos aquí con las siguientes modificaciones. Una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos diana se puede configurar para incluir tanto una secuencia de nucleótidos diana que se va a detectar como una o más secuencias de nucleótidos de relleno que se van a amplificar para crear amplicones de relleno. La pluralidad de los diferentes ácidos nucleicos diana se puede incluir en un reactivo de amplificación, tal como los establecidos aquí en otra parte, y reaccionar con una matriz de sitios de amplificación bajo condiciones de exclusión cinética de modo que la secuencia(s) de nucleótidos rellena los sitios de amplificación. Configuraciones ejemplares que se pueden utilizar para permitir que las secuencias de relleno se amplifiquen mientras que se prohíbe la amplificación de la secuencia diana incluyen, por ejemplo, una molécula diana individual que tiene una primera región con secuencias de relleno flanqueadas por sitios de unión para los cebadores de amplificación presentes en el sitio de amplificación y una segunda región que tiene una secuencia diana fuera de la región flanqueada. En otra configuración, un ácido nucleico diana puede incluir moléculas separadas o cadenas que llevan la secuencia diana y las secuencias de

relleno, respectivamente. Las moléculas o cadenas separadas pueden unirse a una partícula o formar como los brazos de un dendrímero de ácido nucleico y otra estructura ramificada.

En una realización particular, una matriz que tiene sitios de amplificación que tienen tanto secuencias de relleno como secuencias diana se pueden detectar utilizando una matriz de extensión de cebador o una técnica de secuenciación por síntesis.

5 En tales casos, la extensión específica se puede lograr en la secuencia de nucleótidos diana en oposición a la gran cantidad de secuencia de relleno mediante el uso de sitios de unión de cebadores colocados apropiadamente. Por ejemplo, los sitios de unión para cebadores de secuenciación se pueden colocar después de la secuencia diana y pueden estar ausentes de cualquiera de las secuencias de relleno. Alternativamente o adicionalmente, la secuencia diana puede incluir uno o más análogos de nucleótidos no nativos 10 que no son capaces de unirse por puentes de hidrógeno a nucleótidos estándar. Los nucleótidos no nativos se pueden colocar después del sitio de unión al cebador (por ejemplo, en la secuencia diana o en una región que interviene en la secuencia diana y el sitio de unión del cebador) y como tal evitará la extensión o secuenciación por síntesis hasta que una pareja de nucleótidos adecuada (es decir, una capaz de unirse por puente de hidrógeno al análogo(s) no nativo en la secuencia nativa) se añade. Los análogos de nucleótidos isocitosina (isoC) y isoguanina 15 (isoG) son particularmente útiles ya que se emparejan específicamente entre sí pero no con otros nucleótidos estándar utilizados en la mayoría de las técnicas de extensión y secuenciación por síntesis. Un beneficio adicional de utilizar isoC y/o isoG en una secuencia diana o anterior a la secuencia diana es evitar la amplificación indeseada de la secuencia diana durante las etapas de amplificación omitiendo la pareja respectiva de la mezcla de nucleótidos utilizada para la amplificación.

20 Se entenderá que una matriz de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido por un método descrito aquí, no necesita utilizarse para un método de detección. Por el contrario, la matriz puede utilizarse para almacenar una biblioteca de ácidos nucleicos. Por consiguiente, la matriz puede almacenarse en un estado que preserve los ácidos nucleicos en la misma. Por ejemplo, una matriz puede almacenarse en un estado disecado, estado congelado (por ejemplo, en nitrógeno líquido), o en una solución que es protectora de ácidos nucleicos. Alternativamente o 25 adicionalmente, la matriz se puede utilizar para replicar una biblioteca de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una matriz se puede utilizar para crear amplicones replicados a partir de uno o más de los sitios en la matriz.

Varias realizaciones de la invención se han ejemplificado aquí con respecto al transporte de ácidos nucleicos diana a los sitios de amplificación de una matriz y a hacer copias de los ácidos nucleicos diana de captura en los sitios de amplificación. Métodos similares se pueden utilizar para moléculas diana de ácidos no nucleicos. Por lo tanto, los 30 métodos establecidos aquí se pueden utilizar con otras moléculas diana en lugar de los ácidos nucleicos diana ejemplificados. Por ejemplo un método de la presente descripción se puede llevar a cabo para transportar moléculas diana individuales de una población de diferentes moléculas diana. Cada molécula diana se puede transportar a (y en algunos casos capturada en) un sitio individual de una matriz para iniciar una reacción en el sitio de captura. La 35 reacción en cada sitio puede, por ejemplo, producir copias de la molécula capturada o la reacción puede alterar el sitio para aislar o secuestrar la molécula capturada. En cualquier caso, el resultado final pueden ser sitios de la matriz que son puros con respecto al tipo de molécula diana que está presente en una población que contiene diferentes tipos de moléculas diana.

En realizaciones particulares que utilizan moléculas diana distintas de los ácidos nucleicos, una biblioteca de moléculas diana diferentes se puede hacer utilizando un método que aprovecha la exclusión cinética. Por ejemplo 40 una matriz de molécula diana se puede preparar bajo condiciones donde los sitios de la matriz se siembran aleatoriamente con moléculas diana de una solución y se generan copias de una molécula diana para llenar cada uno de los sitios sembrados a su capacidad. De acuerdo con los métodos de exclusión cinética de la presente descripción, los procesos de sembrado y copia pueden proceder simultáneamente bajo condiciones donde la velocidad a la cual se realizan las copias excede la velocidad de sembrado. Como tal, la velocidad relativamente 45 rápida a la que se hacen las copias en un sitio que se ha sembrado por una primera molécula diana excluirá efectivamente una segunda molécula diana del sembrado del sitio. En algunos casos, el sembrado de una molécula diana iniciará una reacción que llenará un sitio a su capacidad mediante un proceso distinto al de la copia de la molécula diana. Por ejemplo, la captura de una molécula diana en un sitio puede iniciar una reacción en cadena que 50 finalmente hace que el sitio sea incapaz de capturar una segunda molécula diana. La reacción en cadena puede producirse a una velocidad que excede la velocidad a la cual se capturan las moléculas diana, produciéndose así en condiciones de exclusión cinética.

Como se ejemplificó para ácidos nucleicos diana, la exclusión cinética cuando se aplicó a otras moléculas diana pudo aprovechar una velocidad relativamente lenta para iniciar una reacción repetitiva (por ejemplo, una reacción en cadena) en un sitio de una matriz frente a una velocidad relativamente rápida para continuar la reacción repetitiva 55 una vez iniciada. En el ejemplo del párrafo anterior, la exclusión cinética se produce debido a la velocidad relativamente baja de sembrado de la molécula diana (por ejemplo, difusión relativamente lenta) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se produce una reacción, por ejemplo, para llenar el sitio con copias de la siembra de la molécula diana. En otra realización ejemplar, la exclusión cinética puede producirse debido a un retraso en la formación de una primera copia de una molécula diana que ha sembrado un sitio (por ejemplo, activación retrasada 60 o lenta) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se hacen las copias posteriores para llenar el sitio. En este ejemplo, un sitio individual puede haberse sembrado con varias moléculas diana diferentes. Sin embargo, la formación de la primera copia para cualquier molécula diana dada se puede activar aleatoriamente de modo que la

velocidad promedio de la formación de la primera copia es relativamente lenta en comparación con la velocidad a la que se generan las copias posteriores. En este caso, aunque un sitio individual se puede haber sembrado con varias moléculas diana diferentes, la exclusión cinética permitirá que solo se copie una de las moléculas diana.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método para preparar una matriz de moléculas que puede incluir las etapas de (a) proporcionar un reactivo que incluye (i) una matriz de sitios, y (ii) una solución que tiene una pluralidad de moléculas diana diferentes, en donde el número de moléculas diana en la solución excede el número de sitios en la matriz, en donde las diferentes moléculas diana tienen acceso fluídico a la pluralidad de sitios, y en donde cada uno de los sitios comprende una capacidad para varias moléculas diana en la pluralidad de diferentes moléculas diana; y (b) hacer reaccionar el reactivo para producir una pluralidad de sitios que tiene cada uno una molécula diana individual de la pluralidad o para producir una pluralidad de sitios que tiene cada uno una población pura de copias de una molécula diana individual de la solución, en donde la reacción incluye simultáneamente (i) transportar las diferentes moléculas a los sitios en una velocidad de transporte promedio, y (ii) iniciar una reacción que llena el sitio a capacidad a una velocidad de reacción promedio en donde la velocidad de reacción promedio excede la velocidad de transporte promedio. En algunas realizaciones, la etapa (b) puede llevarse a cabo en su lugar haciendo reaccionar el reactivo para producir una pluralidad de sitios que tiene cada uno una molécula diana individual a partir de la pluralidad o para producir una pluralidad de sitios que tiene cada uno una población pura de copias a partir de una molécula diana individual de la solución, en donde la reacción incluye (i) iniciar una reacción repetitiva (por ejemplo, una reacción en cadena) para formar un producto a partir de una molécula diana en cada uno de los sitios, y (ii) continuar la reacción en cada uno de los sitios para formar los productos posteriores, en donde la velocidad promedio a la que se produce la reacción en los sitios excede la velocidad promedio a la que se inicia la reacción en los sitios.

En realizaciones de ácidos no nucleicos anteriores, la molécula diana puede ser un iniciador de una reacción repetitiva que se produce en cada sitio de la matriz. Por ejemplo, la reacción repetitiva puede formar un polímero que impide que otras moléculas diana ocupen el sitio. Alternativamente, la reacción repetitiva puede formar uno o más polímeros que constituyen copias moleculares de una molécula diana que se transportó al sitio.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no a limitar la presente invención.

Ejemplo I

Formación Super-Poisson de matrices de clústeres en celdas de flujo

Este ejemplo describe un método para lograr la formación super-Poisson de una matriz de clúster en una celda de flujo para una plataforma de secuenciación Illumin (San Diego, CA). El método descrito aquí es un proceso para capturar un elemento de biblioteca (por ejemplo, un fragmento de genoma) en una característica y para amplificar clonalmente de manera simultánea el elemento de biblioteca. Una característica clave del proceso en este ejemplo es controlar la velocidad de captura frente a la velocidad de amplificación y para hacerlo en un proceso homogéneo. Muchos procesos previos desarrollados para la siembra de alta densidad de celdas de flujo Illumina, separan la captura de los elementos de biblioteca de los procesos de amplificación clonal. En este ejemplo, el suceso de captura inicia un suceso de amplificación clonal en la característica.

Una celda de flujo modelada se prepara como sigue. Las celdas de flujo de vidrio (Illumina, Inc., San Diego, CA) se recubren con parches dorados utilizando un enfoque de despegue. Brevemente, una capa fotoresistente se recubre uniformemente sobre la superficie de la celda de flujo de vidrio y los parches de la fotoresistencia se eliminan por fotolitografía para exponer los parches de la superficie de vidrio. La capa de oro se deposita después sobre la superficie para formar una película delgada continua sobre las regiones fotoresistentes y los parches de vidrio. El oro puede depositarse utilizando una evaporación del haz de electrones o pulverización catódica como se describe en Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977). La capa fotoresistente se elimina después mediante la extracción con acetona para dejar los parches de oro que son de forma circular, que tienen un diámetro inferior a 1 micra, y que están rodeados por regiones intersticiales de la superficie de vidrio. La celda de flujo modelada con oro se recubre después con acrilamida libre de silano (SFA) como se describió en el documento de Patente WO 2008/093098.

Los cebadores P5 y P7 se injertan en el SFA polimerizado mediante un resto escindible de nitrobenzilo UV (Glenn Research, Sterling, VA). La celda de flujo se coloca en una fuente de luz UV (302 nm) de modo que los parches de oro crean una máscara para cebadores unidos sobre los parches mientras cualquiera de los cebadores unidos a las regiones intersticiales se escinde debido a la exposición a la luz UV. Los cebadores P5 y P7 que permanecen en los parches de oro son capaces de soportar la amplificación clonal de bibliotecas (P5/P7).

Los elementos de la biblioteca se producen de la siguiente manera. Una biblioteca de DNA genómico (gDNA) está fragmentada y adaptadores bifurcados que tienen sitios de unión de cebadores que son complementarios a los cebadores P5 y P7 se ligan a los fragmentos de gDNA, de acuerdo con los protocolos de preparación de muestras comerciales de Illumina.

La formación de matrices de clúster super-Poisson se lleva a cabo de la siguiente manera. Se prepara una solución que contiene los elementos de la biblioteca (en forma bicatenaria) y el reactivo TwistAmp Basic (TwistDx, Cambridge UK). El reactivo TwistAmp Basic contiene una mezcla de enzimas que puede soportar la amplificación dependiente

de la plantilla en la superficie (DNA polimeras, proteína de unión monocatenaria y recombinasa). La concentración de los elementos de la biblioteca en solución se controla de manera que la velocidad de captura de hibridación de un elemento de la biblioteca por cualquier característica sea mucho menor que la velocidad de amplificación clonal y el agotamiento suficiente de los oligos disponibles en la característica para capturar otro elemento de la biblioteca. La concentración óptima o deseada de los elementos de la biblioteca para la solución se puede determinar empíricamente por tritación utilizando el protocolo de formación de matrices de clúster super-Poisson anterior seguido por la ejecución de la secuencia en un dispositivo de secuenciación Illumina (por ejemplo, GenomeAnalyzer™, HiSeq™ o MiSeq™).

Ejemplo II

10 Caracterización de las matrices de clústeres patrones creados bajo condiciones de exclusión cinética

Este ejemplo demuestra la carga super Poisson de clústeres monoclonales en características modeladas utilizando condiciones de exclusión cinética.

Una celda de flujo patrón se prepara de la siguiente manera. Las celdas de flujo de vidrio (Illumina, Inc., San Diego, CA) se recubrieron con almohadillas de oro utilizando un enfoque de despegue.

15 Brevemente, una capa de fotoresistencia se recubrió uniformemente sobre la superficie de la celda de flujo de vidrio y los parches de la fotoresistencia se eliminaron mediante fotolitografía para exponer los parches de la superficie de vidrio. Se depositó después una capa de oro sobre la superficie para formar una película delgada continua sobre las regiones de fotoresistencia y los parches de vidrio. El oro se depositó utilizando la evaporación del haz de electrones como se estableció en Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977). La capa fotoresistente se eliminó después por extracción con acetona para dejar un patrón hexagonal de almohadillas de oro, en donde cada una de las almohadillas de oro era de forma circular, tenía un diámetro de 500 nm, y estaba rodeada por regiones intersticiales de superficie de vidrio. La celda de flujo patrón de oro se recubrió después con acrilamida libre de silano (SFA) como se describió en el documento de Patente WO 2008/093098. Los cebadores se injertaron en SFA polimerizado mediante un resto escindible de nitrobenzilo UV (Glenn Research, Sterling, VA). La celda de flujo se colocó en una fuente de luz UV (302 nm) de manera que las almohadillas de oro crearon una máscara para cebadores unidos sobre las almohadillas mientras que los cebadores unidos sobre las regiones intersticiales se escindieron debido a la exposición a la luz UV. Los cebadores escindidos se lavaron dejando los cebadores unidos sobre las almohadillas de oro.

30 Los clústeres se cultivaron en las almohadillas de oro utilizando el kit TwistAmp Basic (TwistDx, Cambridge UK) de la siguiente manera. Una biblioteca de DNA PhiX bicatenario se mezcló a diferentes concentraciones en el tampón TwistAmp Basic Rehydration y en reactivos de acetato de magnesio. Las concentraciones de DNA PhiX probadas fueron 72 pM, 144 pM, 432 pM y 864 pM. Estas concentraciones estaban por encima del rango típico de 9-10 pM de DNA utilizado para siembras estándar en celdas de flujo Illumina. También, el DNA PhiX era bicatenario en contraste con la siembra estándar de celdas de flujo Illumina donde la plantilla de DNA está en forma monocatenaria. Las mezclas que contenían DNA PhiX se utilizaron para rehidratar gránulos TwistAmp Basic liofilizados y después se pusieron en los carriles respectivos de la celda de flujo patrón a 38°C. La incubación se continuó durante una hora a 38°C antes de lavar con tampón de lavado HT2 (Illumina, Inc., San Diego CA) y teñir los clústeres con SyBr Green. Los clústeres se procesaron después para la secuenciación mediante tratamiento con LMX1 durante 30 minutos para linearizar el DNA en los clústeres, la desnaturización con NaOH 0,1N y la hibridación del cebador de secuenciación. La celda de flujo se secuenció luego durante 26 ciclos en un Illumina HiSeq® 2000.

40 La inspección visual de las imágenes de la celda de flujo mostró que los clústeres estaban ordenados espacialmente en un patrón correspondiente al patrón de almohadillas de oro en la superficie. La Figura 1A muestra una imagen compuesta para los cuatro canales de color obtenidos después de un primer ciclo de secuenciación utilizando una celda de flujo producida mediante los métodos de exclusión cinética establecidos anteriormente. Para comparación, la Figura 1B muestra una imagen compuesta obtenida después de un ciclo de secuenciación único para una celda de flujo illumina estándar que tiene los clústeres localizados aleatoriamente.

50 El análisis de la función de la distribución de pares (PDF) y la función del vecino más cercano (NN) para una imagen compuesta de la celda de flujo también indicaba un alto grado de orden. Se calculó que la densidad del clúster crudo era aproximadamente 640.000 clústeres por milímetro cuadrado para la imagen. La función NN se utilizó para medir la distancia promedio entre los clústeres vecinos más cercanos en la imagen. Como se muestra en la Figura 2, la función NN produjo predominantemente un único pico alrededor de 2,3 pixeles. Esto fue consistente con la retícula de 1 micra esperada para las almohadillas, lo que sugiere una matriz altamente ordenada de clústeres. La formación aleatoria de clústeres produce en contraste un pico mucho más amplio, con valores más bajos que se aproximan al límite de detección del algoritmo de selección del clúster (1,2 pixeles). El PDF en la Figura 2 es consistente con la estructura esperada para una matriz hexagonal ordenada. Por ejemplo, la función PDF mostró un pico principal esperado a 2,66 pixeles y los picos de orden superior que corresponden a los vecinos más allá del más cercano fueron claramente visibles y estaban presentes en las proporciones máximas esperadas. Solo se observó un ligero desplazamiento en la localización del pico entre las funciones NN y PDF. Este bajo nivel de jitter indicó que la desviación de las posiciones teóricamente perfectas era bastante baja y dentro de los niveles esperados.

La inspección visual de las imágenes compuestas de cuatro colores reveló también una ausencia de saltos indeseados de las almohadillas. "Salto de almohadilla" se refiere al proceso de varias almohadillas adyacentes que se amplifican a partir de la misma secuencia de plantilla. El salto de almohadilla se caracteriza visualmente en una imagen de cuatro colores como parches contiguos de clústeres que tienen el mismo color. La ausencia de parches del mismo color para las celdas de flujo producidas bajo condiciones de exclusión cinética como se establece en este ejemplo indicó que no se produjeron niveles indeseables de salto de almohadilla. La Figura 3 proporciona una representación más cuantitativa del color del clúster y la posición espacial que indica que el salto de almohadilla no fue un problema. Específicamente, la Figura 3 muestra un gráfico de dispersión de posiciones espaciales de clústeres que se alinean con las 5 primeras posiciones genómicas del genoma PhiX. Las diferentes posiciones genómicas están indicadas por ejes, asteriscos, cuadrados, triángulos y diamantes. Los 5 tipos de símbolos están aleatoriamente distribuidos en la figura y no se agrupan lo que indica que el salto de almohadilla no fue un problema.

El análisis de secuencia para los 26 ciclos de datos se realizó para las celdas de flujo producidas utilizando las condiciones de exclusión cinética. Los resultados indicaron que el 64% de las almohadillas estaban ocupadas y el 56% de las almohadillas tenían clústeres que estaban clonados. Por lo tanto, los métodos produjeron un aumento de casi 2 veces en clústeres cloniales sobre lo que se espera de la carga de Poisson, lo que habría predicho que el 36% de las almohadillas serían clónicas si el 64% de ellas estuvieran ocupadas. Estos resultados mostraron claramente la carga súper Poisson.

Ejemplo III

Desorción eléctrica activa y patronado de biomoléculas

Este ejemplo demuestra un método para patronar biomoléculas espacialmente utilizando campos eléctricos. Los métodos descritos en este ejemplo siembran rápidamente DNA en los sitios diana y repelen electroquímicamente biomoléculas de las regiones intersticiales, dando como resultados clústeres de matrices de DNA direccionables, altamente patronados. Los resultados mostrados aquí demuestran la formación de celdas de flujo que tiene patrones de clústeres de ácido nucleico monoclonal.

El método descrito en este ejemplo emplea un potencial eléctrico aplicado a través de una superficie conductora y un electrolito o a través de dos superficies conductoras para desadsorber activamente moléculas físicamente adsorbidas o químicamente conjugadas de una o ambas superficies cargadas eléctricamente. Este método de desorción activa no requiere cualquier química de superficie/modificación de la superficie, puede desorber moléculas muy rápidamente (menos de 5 minutos) y es menos sensible a las condiciones del proceso que los métodos de desorción pasiva. Las superficies conductoras pueden ser metálicas (por ejemplo, Titánio, Índio, Óxido de Estaño) o de naturaleza semiconductor y el potencial aplicado puede ser AC o DC, lo que da como resultado una reacción electroquímica en la interfaz electrodo/electrolito.

Aplicar un campo eléctrico mejora la señal (en los sitios de interés) al ruido (de las regiones intersticiales) en un orden de magnitud. El método descrito en este ejemplo puede aplicarse también a electrodos planos para la desorción selectiva, la refuncionalización selectiva de electrodos y el modelado electroquímico de especies.

Arquitectura de la celda de flujo

Las dos arquitecturas descritas anteriormente para la desorción electroquímica de biomoléculas se ilustran en las Figuras 4a y 4b. Específicamente, el óxido de Índio Estaño (ITO) se utilizó como material de electrodo transparente conductor. El ITO se depositó en una superdielelectricidad D263 mediante la pulverización catódica por radiofrecuencia. La Figura 4a muestra el potencial eléctrico aplicado a través de una capa de ITO conductora y el electrolito. La Figura 4b muestra el potencial aplicado a través de dos placas de ITO conductoras paralelas separadas por un medio líquido. Ambas arquitecturas se pueden utilizar para desorber eléctricamente especies de la superficie de la ITO. Los sitios nano patronados de oro (Au) son útiles para la captura dirigida de biomoléculas tioladas (por ejemplo, avidina tiolada). Los sitios de Au se separan del ITO posterior utilizando un espaciador dieléctrico (por ejemplo, SiO₂, SiN, diamante como carbono) para evitar la electroquímica en el Au.

La arquitectura en la Figura 4b se puede utilizar también para concentrar rápidamente de manera simultánea DNA (por ejemplo, 100 veces) en la superdielelectricidad de la celda de flujo utilizando campos eléctricos como se muestra en las imágenes de lapso de tiempo de la Figura 4c. En estos experimentos, un potencial (V) de 2V se aplicó a través de un espacio de 100 μm que separa las dos superficies de ITO. El aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo, como se observa utilizando la imagen de fluorescencia de reflexión interna local (TIRF) en la Figura 4c, se debe a un gran aumento en la concentración superficial de DNA de control PhiX (marcado con colorante YOYO) bajo un campo eléctrico aplicado en la parte superior de la superficie de la celda de flujo. Por lo tanto, la técnica descrita aquí se puede utilizar para desorber biomoléculas electroquímicamente de manera simultánea de la región intestinal mientras se facilita la siembra rápida.

Flujo de trabajo experimental

El flujo experimental para los experimentos de desorción activa se resume en la Figura 5. El método implica recubrir de avidina en la superficie de una celda de flujo, seguido por el recubrimiento con acrilamida libre de silano (SFA) e

injertar los cebadores al SFA. El recubrimiento con SFA y el injerto de los cebadores P5 y P7 se lleva a cabo como se describió en el documento de Patente WO 2008/093098. Sin embargo, en los presentes métodos, la avidina se moldea electroquímicamente en sitios de Au o dieléctricos (separados por regiones intersticiales de ITO) que están presentes en la superficie de la celda de flujo utilizando una etapa de desorción eléctrica anterior al recubrimiento con SFA. Además, después de injertar los cebadores P5 y P7, se aplica el campo eléctrico tanto para sembrar rápidamente el DNA en los sitios de Au o dieléctricos como para desorber las biomoléculas electroquímicamente (DNA, avidina, cebadores) de los intesticales de ITO. Tipicamente se aplica 2V para desorber las moléculas eficazmente. Las duraciones de campo de tan solo 5 minutos pueden desorber eficazmente la mayoría de las moléculas en las regiones intersticiales. Además, los resultados sugieren que la concentración de cebador en la 5
región intersticial también disminuye después de la etapa del campo eléctrico. La amplificación del clúster se realiza a continuación como se describe en Bentley y colaboradores, *Nature* 456:53-59 (2008), seguido por la tinción del clúster utilizando un colorante intercalante de dsDNA, después imágenes microscópicas. La celda de flujo se 10
secuenció después para determinar la clonalidad del clúster utilizando un secuenciador de DNA HiSeq 2000 (Illumina, Inc. San Diego). Una representación esquemática de los efectos de la siembra asistida por campo y la 15
desorción electroquímica se muestra en la Figura 5.

Resultados experimentales

La Figura 6 ilustra los resultados logrados utilizando la arquitectura de celda de flujo de la Figura 3b, ambos con campo eléctrico (Figura 6A) y sin campo eléctrico (Figura 6B). En presencia de un campo eléctrico, los clústeres 20
están altamente confinados a los sitios de 2 μ m de Au con muy poca fluorescencia observada en las áreas intersticiales. En los sitios de 2 μ m, los clústeres son altamente policlonales debido al gran tamaño de la almohadilla de Au. El grado de policlonalidad puede disminuirse por disminución del tamaño de la almohadilla para inhibir 25
múltiples plantillas de siembra mediante la exclusión estérica o la policlonalidad puede disminuir utilizando condiciones de exclusión cinética. Hay que tener en cuenta también que, la intensidad de pixel en las regiones intersticiales es cercana a 0 (perfil de línea de la Figura 6A). Por el contrario, los clústeres están presentes tanto en 30
las superficies de Au como en las de ITO intersticiales en ausencia del campo eléctrico. El patrón periódico observado en el perfil de línea de la Figura 6A no se observa en el perfil de línea de la Figura 6B, lo que confirma 35
que el confinamiento del clúster es el resultado del campo eléctrico.

La técnica del campo eléctrico puede utilizarse para modelar clústeres espacialmente en ambos sitios de tamaño de 30
micras así como en sitios nano patronados sobre grandes áreas. Imágenes de áreas grandes de los clústeres modelados 35
sembrados en sitios de Au de 2 μ m de diámetro y sitios de Au de 200 μ m de diámetro se ilustran en las Figuras 7A y 7B, respectivamente, junto con sus correspondientes Transformadas de Fourier (FFT). Los clústeres están bien definidos y altamente estructurados con muy poco enlace no específico en las áreas intesticales de ITO. Esto 40
está confirmado por los puntos bien definidos que se ven en la FFT, lo que sugiere una red ordenada y modelada. La ocupación de los clústeres en las características nano modeladas en la Figura 4B es aproximadamente del 40-50% pero puede aumentarse aún más utilizando concentraciones de Avidina más altas o 45
manipulando la forma de onda de voltaje. La misma química/proceso se puede utilizar también para clústeres con alta precisión espacial en sitios dieléctricos. Clústeres ordenados en sitios de SiO₂ de 700 nm de diámetro se 50
muestran en la Figura 8.

Mecanismo

Los datos sugieren que el modelado espacial de los clústeres se facilita en presencia de un campo eléctrico. Esto es 40
probablemente debido a la eliminación electroquímica de biomoléculas (por ejemplo, DNA, proteínas y cebadores) en las regiones intersticiales. La intensidad del cebador injertado se ve que disminuye cuando el campo eléctrico se 45
aplica como se ve utilizando ensayos de hibridación con sondas marcadas con Texas Red (TR). La Figura 9 ilustra escaneos de Typhoon que muestran la intensidad de fluorescencia TR para los ensayos de hibridación llevados a 50
cabio en la celda de flujo antes y después de la aplicación del campo eléctrico. La intensidad de la fluorescencia disminuye por más de un factor de dos después de la aplicación del campo eléctrico, confirmando la eliminación de los cebadores del SFA. Para aumentar la intensidad del clúster, la celda de flujo se recubrió con SFA y se reinjertó con los cebadores P5 y P7. Esto dio como resultado un aumento apreciable de la intensidad TR. Por lo tanto, es probable sembrar DNA, eliminar electroquímicamente las moléculas unidas no específicamente en las regiones 55
intesticiales, recubrir con SFA y reinjertar con cebadores para obtener clústeres espacialmente modelados de elevada intensidad.

Hibridación directa de DNA

El patrón espacial de los clústeres se observó también en experimentos que implican la hibridación directa del ssDNA phiX al césped de los cebadores P5, P7. En la Figura 10A se muestra un esquema del proceso. Estos 55
experimentos se realizaron en sitios de SiO₂ de 2 μ m en ITO. El mismo proceso se puede aplicar a sitios nanomodelados con una variedad de materiales dieléctricos que forman los sitios. Ni el DNA biotinilado, ni la avidina 60
son necesarios en estos experimentos lo que da como resultado una menor cantidad de etapas químicas, mientras se mantiene la especificidad del clúster en los sitios. La especificidad es probablemente el resultado de la desorción electroquímica de los cebadores en las regiones intesticiales. La Figura 10B muestra clústeres formados en sitios de SiO₂ de 2 μ m en presencia de un campo eléctrico (2V, 0,1 Hz) utilizando el enfoque de hibridación directa. Los

clústeres bien moldeados son visibles con muy poco en las regiones intersticiales. La Figura 10C es el mismo experimento en ausencia de un campo eléctrico y muestra que los clústeres están orientados aleatoriamente tanto en las SFA como en las regiones intersticiales ITO sin un orden distinto presente en ausencia del campo eléctrico. Estos resultados confirman que los campos eléctricos se pueden utilizar para asistir al modelado espacial de la formación del clúster de ácidos nucleicos.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar los ácidos nucleicos, que comprende

(a) proporcionar

(i) una matriz de sitios de amplificación que tiene uno o más agentes de captura y

5 (ii) un agente de amplificación que comprende una solución que comprende una pluralidad de ácidos nucleicos diana diferentes,

en donde el número de los ácidos nucleicos diana diferentes en la solución excede el número de sitios de amplificación en la matriz,

10 en donde los ácidos nucleicos diana diferentes tienen un acceso fluídico a la pluralidad de sitios de amplificación, y

en donde cada uno de los sitios de amplificación está ocupado por varios ácidos nucleicos de la pluralidad de los ácidos nucleicos diferentes antes de:

(b) hacer reaccionar el reactivo de amplificación con la matriz de los sitios de amplificación, tal que una pluralidad de sitios de amplificación comprenda cada uno una población clonal de amplicones clonales 15 de un ácido nucleico diana individual de la solución,

20 en donde la reacción comprende (i) producir un primer amplicón de un ácido nucleico individual diana que transporta a cada uno de los sitios de amplificación, y (ii) producir amplicones subsiguientes del ácido nucleico diana individual que transportan a cada uno de los sitios de amplificación o desde el primer amplicón, en donde la velocidad media a la que se generan los amplicones subsiguientes en los sitios de amplificación excede la velocidad media a la que se genera el primer amplicón en los sitios de amplificación;

en donde cada uno de los sitios de amplificación comprende una pluralidad de cebadores que se usan para producir los amplicones en (b); y en donde la producción del primer amplicón comprende convertir al menos uno de los cebadores desde un estado no extendible a un extendido extendible.

25 2. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz de sitios de amplificación comprises una matriz de características en una superficie.

3. El método de la reivindicación 2, en donde las características son no contiguas y están separadas por regiones intersticiales de la superficie que carece de los cebadores que se usan para producir los amplicones en (b).

30 4. El método de la reivindicación 2, en donde el área de cada una de las características es mayor que el diámetro medio del volumen excluido de los ácidos nucleicos diana individuales que se transportan a cada uno de los sitios de amplificación.

5. El método de la reivindicación 4, en donde las características son no contiguas y están separadas por regiones intersticiales de la superficies que carece de agentes de captura.

6. El método de la reivindicación 2, en donde cada una de las características comprende una perla, pocillo, canal, cresta, proyección o combinaciones de los mismos.

35 7. El método de la reivindicación 1, en donde los agentes de captura comprenden ácidos nucleicos de captura que son complementarios a los diferentes ácidos nucleicos diana.

8. El método de la reivindicación 7, en donde los ácidos nucleicos diana diferentes comprenden secuencias universales que son complementarias a los ácidos nucleicos de captura.

40 9. El método de la reivindicación 1, en donde el agente de captura comprende un receptor que se une a un ligando unido a los diferentes ácidos nucleicos diana.

Figura 1A

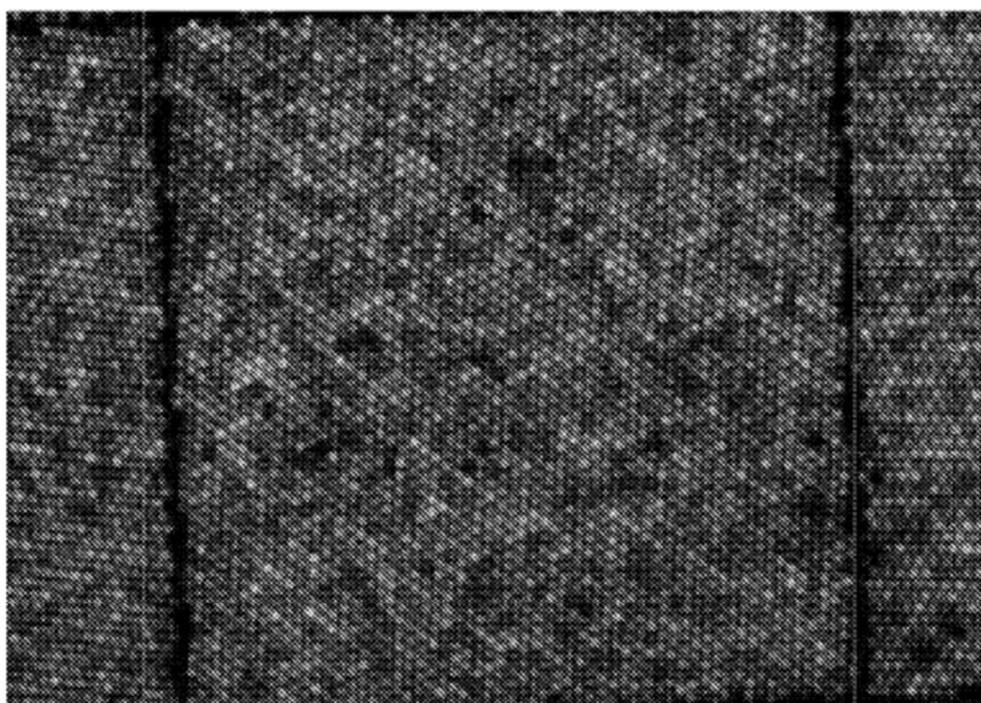


Figura 1B

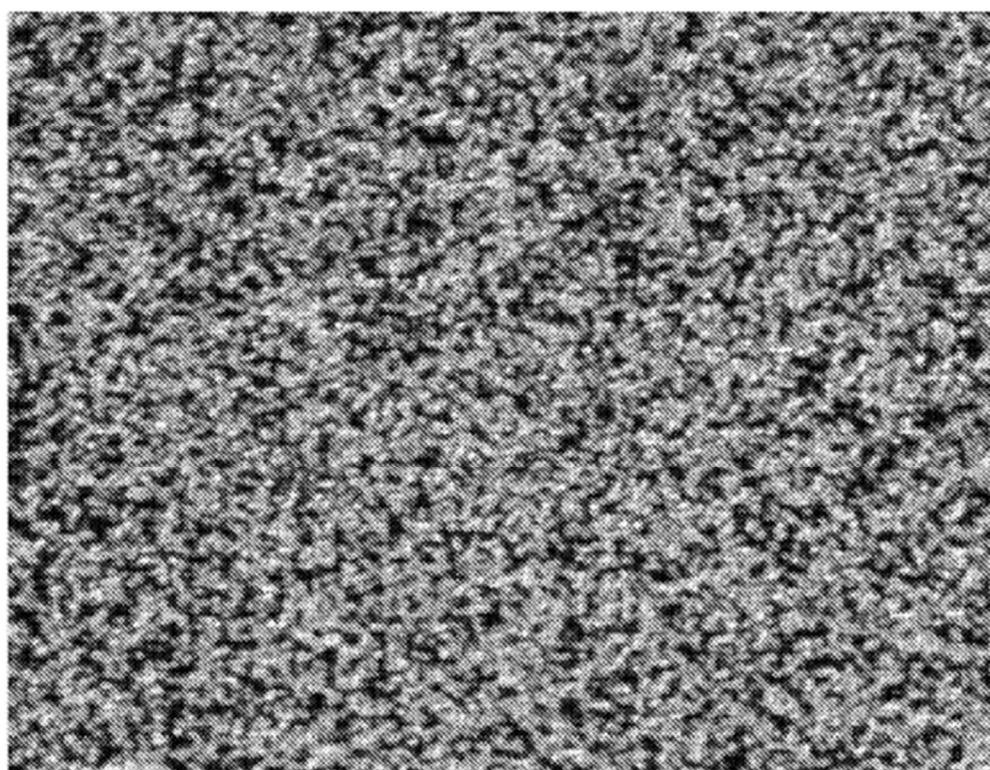


Figura 2

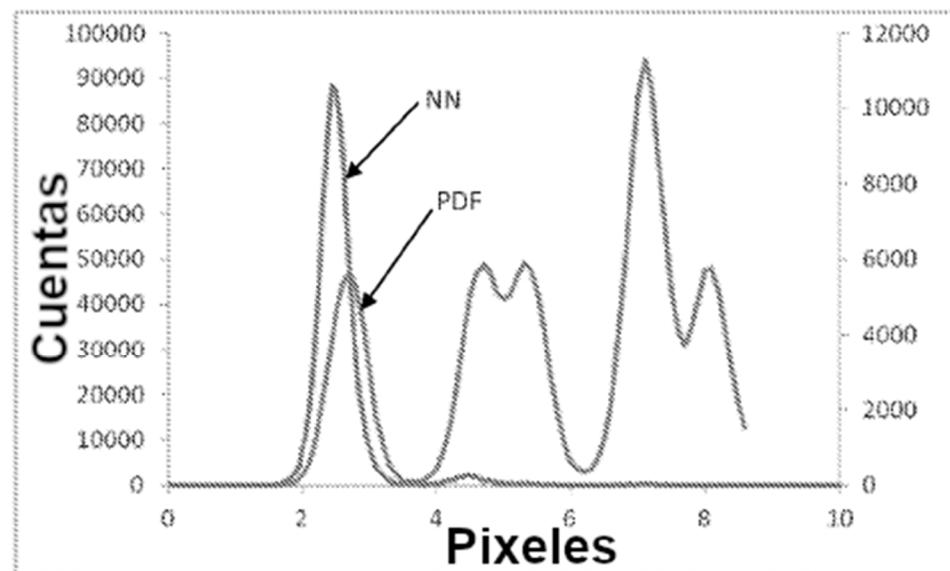


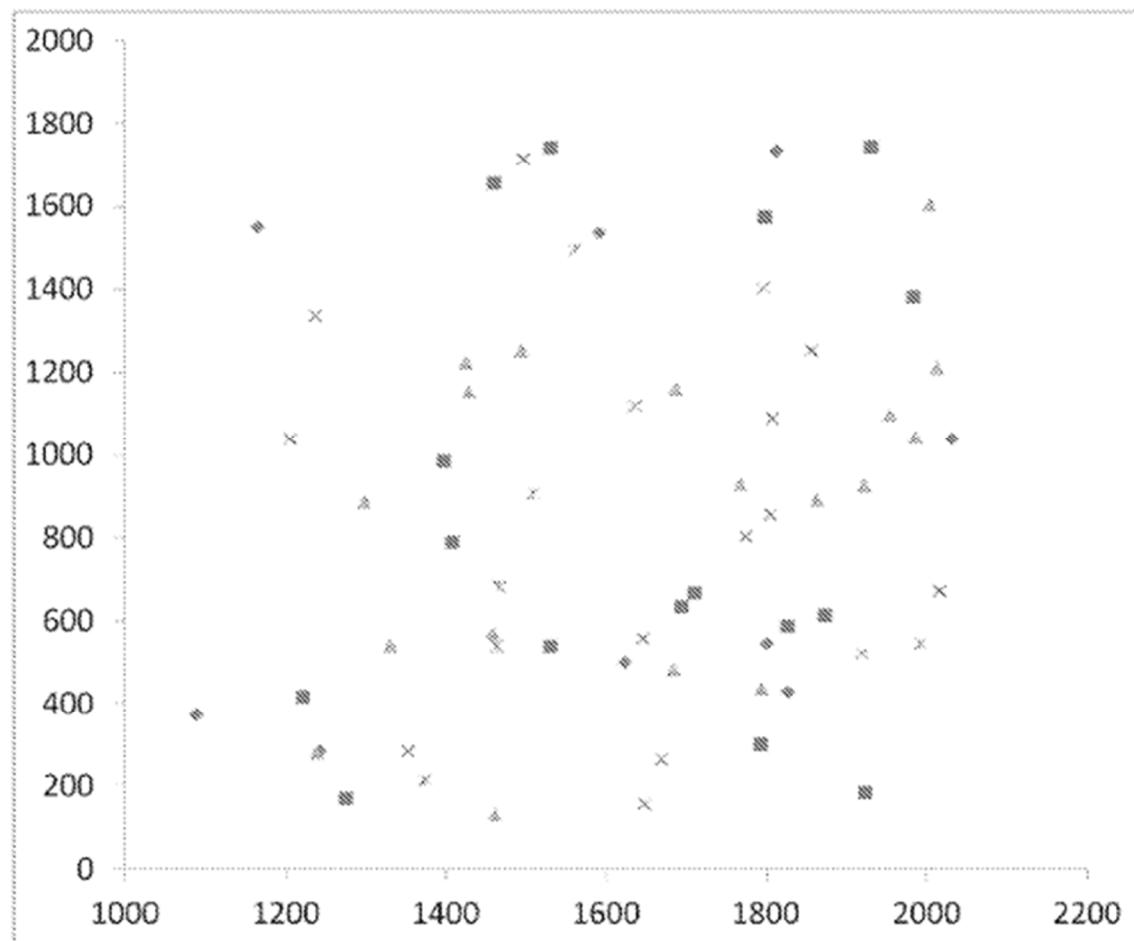
Figura 3

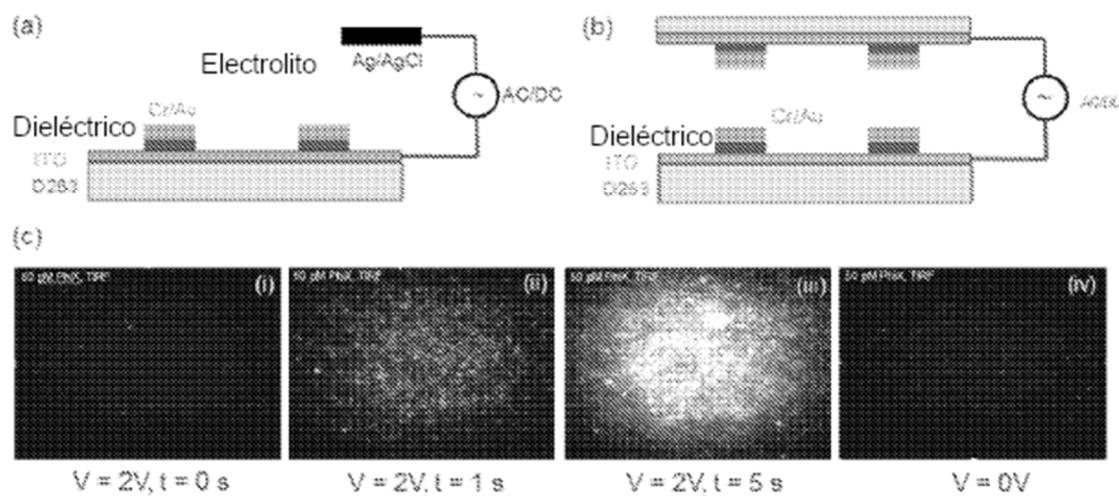
Figura 4

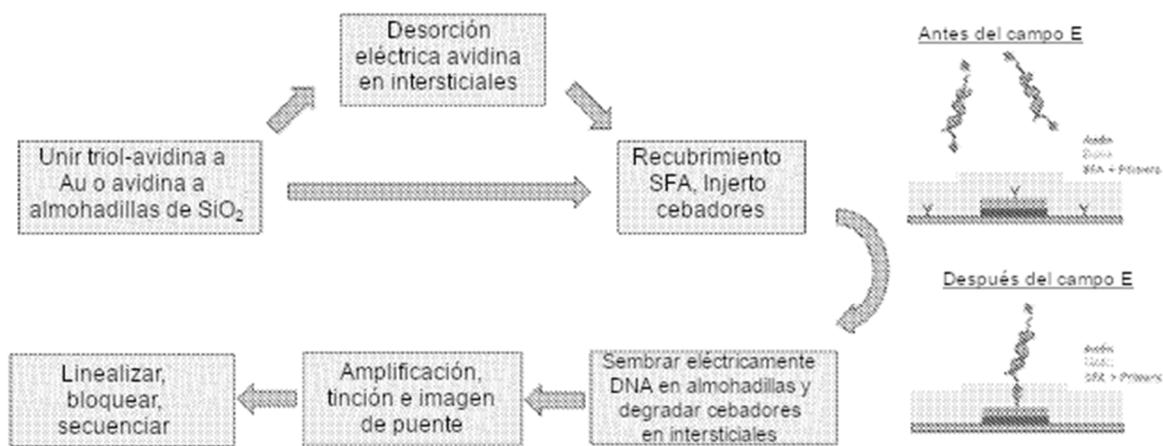
Figura 5

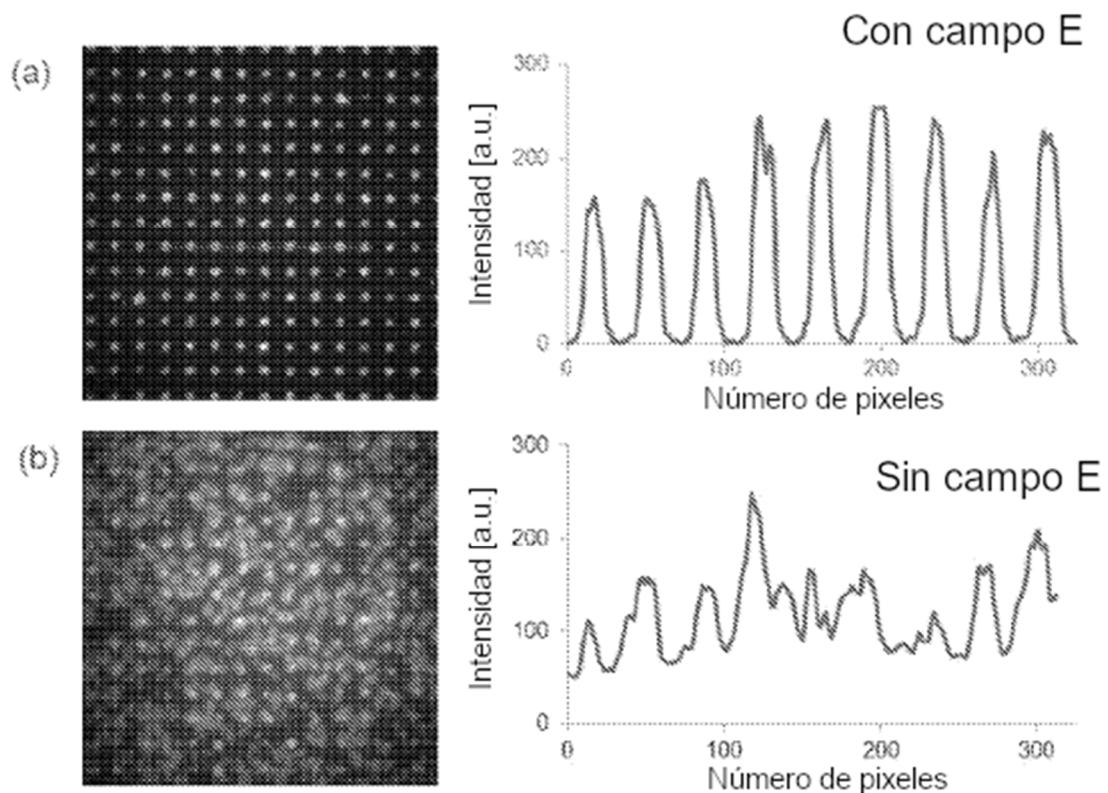
Figura 6

Figura 7

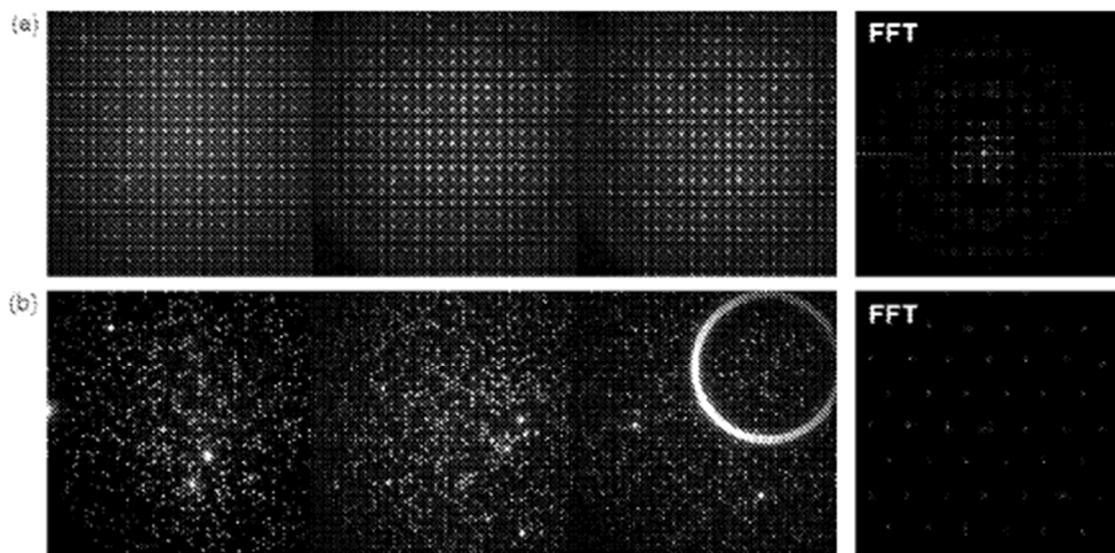


Figura 8

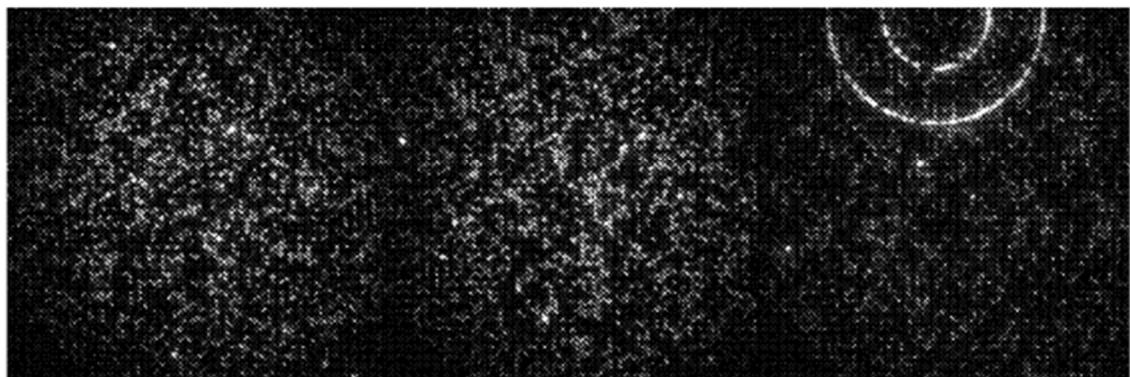


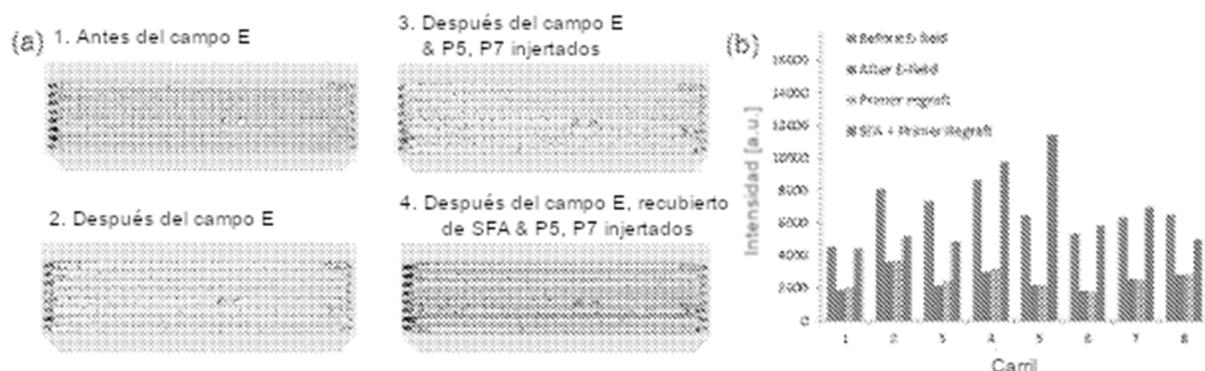
Figura 9

Figura 10