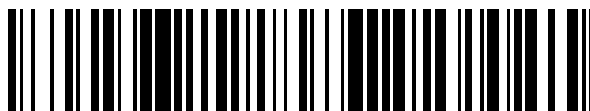


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 395**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015 PCT/GB2015/051720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015 E 15729911 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3155122**

54 Título: **Métodos de estimación de números de cúmulos**

30 Prioridad:

11.06.2014 GB 201410420

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

16.04.2019

73 Titular/es:

**ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (100.0%)
Chesterford Research Park Little Chesterford Nr
Saffron Walden
Essex CB10 1XL, GB**

72 Inventor/es:

**RASOLONJATOVO, ISABELLE MARIE JULIA;
BOUTELL, JONATHAN MARK;
SMITH, VINCENT PETER y
RIGATTI, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de estimación de números de cúmulos

La presente invención versa sobre métodos para estimar o predecir números de cúmulos después de una amplificación en fase sólida mediante una obtención de imágenes de la hibridación de plantilla antes de la amplificación en fase sólida y la secuenciación. Más en particular, se lleva a cabo una ronda inicial de obtención de imágenes de moléculas individuales en la etapa de hibridación de la plantilla que permite predecir una estimación general de los números de cúmulos antes de que se formen los cúmulos. La amplificación de la señal permite que se lleve a cabo la obtención de imágenes de moléculas individuales usando un aparato estándar de obtención de imágenes de secuenciación.

La tecnología de vanguardia basada en soportes sólidos, tales como los chips de ADN de fase sólida —por ejemplo, la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina—, es útil para permitir la secuenciación masivamente paralela, permitiendo opciones de secuenciación mucho más rápidas y rentables para mirar secuencias variables. La tecnología tiene una amplia gama de aplicaciones, incluyendo en la genómica, la transcriptómica y la epigenómica.

La tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) de Illumina usa cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente para secuenciar en paralelo las decenas de millones de cúmulos en la superficie de la celda de flujo. Durante cada ciclo de secuenciación, se añade a la cadena de ácido nucleico un desoxinucleósido trifosfato marcado (dNTP) individual. Los dNTP tienen un bloque azida 3', así como la marca fluorescente unida a la base. La azida 3' actúa como terminador, por lo que, tras cada incorporación de dNTP, se toma una imagen de la tinción fluorescente para identificar la base y, a continuación, tanto el bloque azida como la marca fluorescente son escindidos químicamente para permitir la incorporación del siguiente nucleótido (la propia marca fluorescente no actúa como terminador). Dado que los cuatro dNTP (A, C, T, G) unidos a terminadores reversibles están presentes como moléculas individuales separadas, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación. Las identificaciones de nucleótidos se efectúan directamente a partir de mediciones de intensidad de la señal durante cada ciclo, lo que reduce muchísimo las tasas de errores no tratados con respecto a otras tecnologías. El resultado final es una secuenciación base a base sumamente precisa que elimina errores específicos del contexto de la secuencia, permitiendo una robusta identificación de nucleótidos en todo el genoma, incluyendo las regiones de secuencia repetitiva y dentro de los homopolímeros.

En particular, hay disponibles varias tecnologías SBS diferentes. La tecnología de secuenciación SBS de Illumina anteriormente descrita usa cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente, mientras que otras tecnologías de secuenciación pueden usar menos marcas (por ejemplo, química de 2 tinciones) o dNTP no marcados (por ejemplo, 454, torrente de iones). Aunque aquí se ejemplifica la tecnología de Illumina, una persona experta entenderá que la tecnología podría ser adaptada para ser usada con otras tecnologías de secuenciación.

Las bibliotecas presentadas para SBS consistirán generalmente en una secuencia de interés flanqueada a ambos lados por constructos adaptadores. En cada extremo, estos constructos adaptadores tienen sitios de enlace que permiten que el fragmento de biblioteca se una a un soporte sólido, tal como una superficie de la celda de flujo. Los constructos también contienen varios sitios adicionales de enlace de cebadores. A menudo, antes de la secuenciación, el ADN diana es etiquetado y fragmentado. Esto puede hacerse usando la tecnología Nextera de Illumina, en la que el etiquetado y la fragmentación se llevan a cabo en una sola etapa, a menudo denominada eticmentación. Simultáneamente, los transposomas fragmentan el ADN y añaden secuencias de adaptador a los extremos. A continuación, el ADN eticmentado (etiquetado y fragmentado) es amplificado mediante PCR de ciclo limitado que también añade índices y secuencias de cebadores de secuenciación requeridas para la formación de cúmulos.

Antes de su unión a una celda de flujo, los fragmentos de la biblioteca son desnaturalizados. Las regiones P5' y P7' de fragmentos monocatenarios de biblioteca se hibridan con los oligonucleótidos (oligos) complementarios, que están inmovilizados en la superficie de la celda de flujo. Los oligonucleótidos de la celda de flujo actúan como cebadores, y se sintetiza una cadena complementaria al fragmento de la biblioteca.

La cadena original se elimina por lavado, dejando copias de fragmentos que se enlazan covalentemente con la superficie de la celda de flujo.

La amplificación de puentes genera múltiples copias de cada fragmento, creando cúmulos. Durante la generación de cúmulos, se inmovilizan plantillas de secuenciación en una superficie de la celda de flujo patentada. La amplificación en fase sólida, denominada amplificación de puentes crea aproximadamente 1.000 copias idénticas de cada molécula individual de la plantilla en estrecha proximidad (diámetro de un micrómetro o menos). Dado que este proceso no implica fotolitografía, manchado mecánico o colocación de perlas en pocillos, se logran densidades del orden de 100 millones de cúmulos unimoleculares por centímetro cuadrado.

A continuación, la región P5 es escindida, dando lugar a cúmulos que contienen fragmentos que están unidos por la región P7. El cebador de secuenciación se hibrida con el extremo del fragmento, e inicia la secuenciación por un proceso de síntesis. El terminador reversible marcado fluorescentemente es visualizado (mediante excitación por láser) cuando se añade cada dNTP, y luego escindido para permitir la incorporación de la base siguiente. Las identificaciones de nucleótidos se realizan directamente a partir de mediciones de la intensidad de la señal durante cada ciclo.

Acto seguido, se quita todo de la plantilla y se reforman los cúmulos de ADNbc mediante resíntesis (ciclos de amplificación de puentes). A continuación, se corta P7 en lugar de P5, dando lugar a fragmentos que están unidos por la región P5. El cebador de secuenciación híbrida y secuencia el otro extremo de la plantilla.

5 Dado que los cuatro dNTP enlazados con un terminador reversible están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza la incorporación de sesgos en los casos estándar.

Los sistemas SBS permiten una cantidad masiva de lecturas de secuencias en paralelo. Se usan un muestreo profundo y una cobertura uniforme para generar un consenso y garantizar una alta confianza en la determinación de diferencias genéticas. El muestreo profundo permite el uso de una votación de mayoría ponderada y un análisis estadístico, de forma similar a métodos convencionales, para identificar homocigotos y heterocigotos y distinguir errores de secuenciación. Se asigna a cada base leída no tratada una puntuación de calidad para que el soporte lógico pueda aplicar un factor de ponderación en diferencias de identificación y en la generación de puntuaciones de confianza.

15 Aunque tales tecnologías han revolucionado la secuenciación en comparación con los métodos tradicionales de Sanger y de Maxam y Gilbert, una de las dificultades actuales más significativas de la tecnología está relacionada con la cuantificación precisa de bibliotecas para permitir la predicción de números de cúmulos. La cuantificación imprecisa lleva a varios problemas. La subcarga, que da lugar a demasiados pocos cúmulos, no afecta a los datos de secuenciación, pero sí da lugar a que la producción de datos sea menor de la deseada, dando como resultado aumentos de coste e ineficiencias en el sistema. Sin embargo, la sobrecarga, que da lugar a demasiados cúmulos, puede poner en peligro la calidad de las secuencias.

20 Por ejemplo, Iraad et al., Current Protocols in Human Genetics (2014) y el documento WO 2012/134602 dan a conocer que la cuantificación precisa es importante para lograr buenas densidades de cúmulos.

La presente invención proporciona un método de obtención de imágenes de cadenas en la etapa de hibridación de la plantilla que permite la predicción de números de cúmulos y posibles correcciones en los casos de subcarga y de sobrecarga de una celda de flujo o un soporte sólido.

25 Según la presente invención, se proporciona un método de predicción de números de cúmulos a partir de la amplificación en fase sólida de ácidos nucleicos que comprende:

proporcionar un soporte sólido que tiene varios cebadores de captura inmovilizados sobre sí mismo;

proporcionar cadenas de plantilla capaces de hibridarse con al menos algunos de dichos cebadores de captura;

marcar las cadenas de plantilla o las extensiones de las mismas, si dichas cadenas no están ya marcadas;

detectar la señal de las cadenas marcadas o extensiones de las mismas; y

30 analizar dicha señal detectada para determinar el número de cadenas individuales de plantilla presentes en el soporte sólido;

estimar el número de cúmulos o la densidad de cúmulos que se obtendrán después de la amplificación de los cúmulos de dichas cadenas de plantilla.

35 El término cúmulo está relacionado con “colonias” de moléculas inmovilizadas de ácidos nucleicos, estando formado cada cúmulo o colonia de varias cadenas idénticas inmovilizadas de polinucleótidos y de varias cadenas idénticas inmovilizadas de polinucleótidos complementarios que son creadas mediante amplificación de cúmulos.

40 A diferencia de la fluorescencia en masa medida en un análisis de tipo micromatriz, el presente método no detecta simplemente un “nivel” de señal en el ensayo. En realidad, la presente invención cuenta o calcula los eventos basados en la molécula diferenciada única (pero a menudo amplificados) vistos en el ensayo, y correlaciona esto para predecir el número de cúmulos que se obtendrán después de la amplificación de los cúmulos.

45 Preferentemente, el método incluye la amplificación de la señal de las marcas tras marcar la cadena de plantilla o las extensiones de la misma. Aunque la amplificación de la señal sería usada en muchos instrumentos actuales de secuenciación debido a sus prestaciones para la obtención de imágenes, puede que la amplificación de la señal no se requiera siempre. El uso de un instrumento o detector de secuenciación que sea capaz de detectar moléculas individuales no requeriría la etapa de amplificación de la señal.

50 Preferentemente, la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de un oligonucleótido marcado con la cadena de plantilla. Alternativamente, las cadenas de plantilla pueden estar ya marcadas, por ejemplo, si se usa una biblioteca que ya esté marcada. Esta puede ser, por ejemplo, una biblioteca con una biotina o una tinción en el extremo 5'. También se contempla que, cuando se forme una biblioteca, pueda haber una mezcla de oligonucleótidos marcados y no marcados que sería útil cuando se trabaja con densidades elevadas, dado que no todas las moléculas serían detectables por imágenes (por ejemplo, solo podría detectarse un 10% o un 1% de las moléculas, y podría aplicarse un factor de corrección —por ejemplo, 10× o 100×— para calcular la densidad real).

Preferentemente, dichas cadenas de plantilla comprenden cada una al menos un sitio de enlace de marca.

Opcionalmente el sitio de enlace de marca es un sitio de cebador de secuenciación.

5 Preferentemente, la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de dichas cadenas de plantilla con dichas sondas de captura en presencia de oligonucleótidos marcados capaces de hibridarse con los sitios de enlace de marca.

Opcionalmente, el método incluye la etapa de extensión de cebadores de plantilla.

Opcionalmente, la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende el uso de dNTP marcado durante la etapa de extensión.

10 Opcionalmente, la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de un oligonucleótido marcado con la cadena de plantilla extendida.

Preferentemente, el soporte sólido es una celda de flujo.

Preferentemente, los cebadores de captura comprenden los oligonucleótidos P5 y P7.

15 Preferentemente las cadenas de plantilla contienen secuencias de adaptador. Dichas secuencias de adaptador son complementarias de al menos uno de los cebadores de captura y se hibridarán con los mismos en condiciones apropiadas.

Opcionalmente, el sitio de cebador de secuenciación comprende una secuencia SBS3 o SBS12.

Preferentemente, los oligonucleótidos marcados son secuencias marcadas SBS3' o SBS12'.

Preferentemente, los oligonucleótidos marcados o dNTP están marcados con biotina.

20 Preferentemente, la amplificación de la señal se produce exponiendo el soporte sólido a estreptavidina marcada con tinción.

Se produce una amplificación adicional proporcionando exposiciones posteriores a antiavidina y estreptavidina marcada con tinción.

Preferentemente, las exposiciones posteriores a antiavidina y estreptavidina marcada con tinción dan lugar a entre 10 y 100 moléculas de tinción por cadena de plantilla hibridada.

25 La estreptavidina marcada con tinción comprende una tinción fluorescente. Tinciones ejemplares incluyen tinciones disponibles comercialmente tales como Cy3 o Cy5.

Preferentemente, la etapa de detección de la señal de las cadenas marcadas o de las extensiones de las mismas comprende la obtención de una imagen.

Opcionalmente, la obtención de imágenes se lleva a cabo con un microscopio de fluorescencia.

30 El generador de imágenes debería poder generar una imagen en la que se puedan distinguir objetos que estén separados entre 1 y algunos micrómetros. No tiene que tener una resolución tan alta como nuestros sistemas de secuenciación (que pueden resolver objetos separados por solo ~700nm), sino muy cercana a lo indicado.

Preferentemente, el método comprende la etapa de analizar la imagen y de proporcionar una estimación o predicción de números de cúmulos.

35 Opcionalmente, para minimizar la densidad de los objetos que han de ser analizados, puede usarse una mezcla de oligonucleótidos marcados y no marcados. Por ejemplo, podría usarse un 10% de oligonucleótidos marcados cuando un usuario esperase, en consecuencia, recoger el 10% de las cadenas del ensayo. Entonces, 1000 manchas en el ensayo serían equivalentes a 10.000 cúmulos. Esto se determina por la mezcla usada de oligonucleótidos marcados con respecto a los no marcados. En realidad, pequeñas variaciones en la etapa de mezclado de oligonucleótidos
40 darán lugar a cierta variabilidad en los números obtenidos, por lo que la puede ser preciso calibrar la relación verdadera exacta para cada lote de oligonucleótidos si se requiere mayor precisión.

Si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos o el número de cúmulos es buena —es decir, estando dentro de un intervalo predeterminado deseado—, se lleva a cabo entonces una primera extensión para copiar las moléculas en la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procedimiento estándares de los cúmulos.

45 Si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos o el número de cúmulos son demasiado altos —es decir, estando por encima de un intervalo predeterminado deseado—, las moléculas originales son eliminadas (por ejemplo, lavando con hidróxido sódico). Preferentemente, la hibridación de las cadenas de plantilla se lleva a cabo a continuación a una concentración de plantilla más baja y se lleva a cabo una etapa de extensión para copiar las

moléculas a la superficie de la celda de flujo, procediendo así a una amplificación y un procesamiento estándares de los cúmulos. No se requiere una segunda obtención de imágenes a escala unimolecular.

Alternativamente, también se contempla que, si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos o el número de cúmulos son demasiado altos —es decir, estando por encima de un intervalo predeterminado deseado—, solo se pueda eliminar del soporte sólido una porción o fracción de las moléculas originales. Varios oligonucleótidos de eliminación diferentes, preferentemente dos oligonucleótidos de eliminación diferentes, pueden ser hibridados en diferentes proporciones con las moléculas de la plantilla. Una proporción de los oligonucleótidos de eliminación crea un sitio de restricción, llevándose luego a cabo una etapa de digestión de restricción para eliminar selectivamente las moléculas con el sitio de restricción. En una realización, se elimina cierta fracción de las moléculas hibridando dos conjuntos diferentes de oligonucleótidos de eliminación —uno que crea un sitio de restricción, otro que no crea dicho sitio de restricción— en proporciones diferentes. Por ejemplo, la secuencia P5-SBS3 ya incluye un sitio BglII para la digestión de restricción y este podría ser usado como uno de los oligonucleótidos de eliminación, no teniendo el segundo grupo de oligonucleótidos de eliminación el sitio de restricción BglII. Entonces puede llevarse a cabo la digestión de restricción usando la endonucleasa de restricción BglII, digiriéndose y eliminándose únicamente las cadenas con el oligonucleótido con el sitio de restricción BglII.

Una opción adicional si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos o el número de cúmulos son demasiado altos —es decir, estando por encima de un intervalo predeterminado deseado— es que pudiera usarse exonucleasa; por ejemplo, exonucleasa I. Entonces, seleccionando oligonucleótidos protectores que se enlacen únicamente con una porción del extremo “libre” (normalmente, el extremo 3') de las moléculas de la biblioteca unidas a la superficie, una porción de las moléculas de la biblioteca es protegida y las moléculas restantes son digeridas o eliminadas. La cantidad de oligonucleótidos protectores puede determinarse por titulación, si hace falta. También pueden usarse oligonucleótidos protectores adicionales para proteger a cualquier cebador P5 o P7 que no deseemos que sea eliminado de la superficie, ya que pueden hacer falta para etapas de amplificación clonal adicionales.

Si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos es demasiado baja, las moléculas que ya están en la celda de flujo son extendidas, y luego se lleva a cabo una etapa adicional de hibridación para hibridar cadenas de plantilla adicionales con dichas sondas de captura, que son entonces extendidas también antes de proceder a una amplificación y un procesamiento estándares de los cúmulos. No se requiere una segunda obtención de imágenes a escala unimolecular después de la etapa de hibridación adicional.

Opcionalmente, el método incluye la etapa de llevar a cabo una primera extensión de las cadenas de plantilla. La etapa de extensión puede usar una ADN-polimerasa de alta fidelidad para ensamblar nucleótidos proporcionados en solución.

La etapa de extensión da como resultado que se eliminen el oligonucleótido marcado y las moléculas asociadas con la amplificación de la señal. Se cree que esto es por el desplazamiento de los oligonucleótidos marcados y de las moléculas de amplificación asociadas.

Opcionalmente, el método incluye la etapa adicional de llevar a cabo la amplificación en fase sólida seguida por la secuenciación. La amplificación en fase sólida es, preferentemente, una amplificación de puentes. Preferentemente, la secuenciación es una secuenciación por síntesis.

Para proporcionar una mejor comprensión de la presente invención, se describen métodos ejemplares de recuento de cúmulos en la etapa de hibridación de plantilla y una posible regulación. Esto puede ser seguido por secuenciación, preferentemente secuenciación por síntesis, usando, por ejemplo, las plataformas MiSeq™, HiSeq™ 2000 o HiSeq™ 2500 de Illumina, y también se proporcionan ejemplos de la metodología en uso en una plataforma automatizada o semiautomatizada. Se hace referencia a las siguientes figuras, en las que:

la Figura 1 es un esquema básico que muestra las etapas del método;

la Figura 2 son varias imágenes que muestran los resultados de la obtención de imágenes de cadenas simples usando un microscopio de fluorescencia (parte superior) o el generador de imágenes MiSeq™ (parte inferior);

la Figura 3 muestra una comparación de totales de hibridación de plantilla con una densidad de cúmulos para 14 bibliotecas TruSeq™ estándar;

la Figura 4 muestra una comparación de totales de hibridación de plantilla con una densidad de cúmulos para 14 bibliotecas TruSeq™ estándar e incorpora, además, 10 bibliotecas adicionales de doble índice;

la Figura 5 muestra los resultados de la corrección de la subcarga y la sobrecarga;

la Figura 6 muestra los resultados de la corrección de la subcarga y la sobrecarga para dar una densidad de cúmulos preferida; y

la Figura 7 es un flujo ejemplar de trabajo para un sistema automatizado tal como MiSeq™.

Amplificación de cúmulos

En la técnica se conocen metodologías de amplificación de cúmulos y están ejemplificadas por las divulgaciones de las patentes estadounidenses n^{os} 7.985.565 y 7.115.400.

Las patentes estadounidenses n^{os} 7.985.565 y 7.115.400 describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos en fase sólida que permiten inmovilizar productos de amplificación en un soporte sólido para formar matrices que comprenden cúmulos o "colonias" de moléculas inmovilizadas de ácidos nucleicos. Cada cúmulo o colonia en tal matriz está formado de varias cadenas idénticas inmovilizadas de polinucleótidos y varias cadenas idénticas inmovilizadas de polinucleótidos complementarios. Generalmente, en la presente memoria las matrices así formadas son denominadas "matrices de cúmulos". Reacciones de productos de amplificación en fase sólida como las descritas en las patentes estadounidenses n^{os} 7.985.565 y 7.115.400 son las denominadas estructuras "puenteadas", formadas hibridando pares de cadenas inmovilizadas de polinucleótidos y de cadenas inmovilizadas de polinucleótidos complementarios, estando inmovilizadas ambas cadenas en el soporte sólido en el extremo 5', preferentemente mediante una unión covalente. Las metodologías de amplificación de cúmulos son ejemplos de métodos en los que se usa una plantilla inmovilizada de ácidos nucleicos para producir amplicones inmovilizados.

Se apreciará que cualquiera de las metodologías de amplificación anteriormente descritas o generalmente conocida en la técnica puede ser utilizada con cebadores universales o específicos a una diana para amplificar fragmentos inmovilizados de ADN. Métodos adecuados para la amplificación incluyen, sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación arbitrada por transcripción (TMA) y la amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), según se describe en la patente estadounidense n^o 8.003.354. Los anteriores métodos de amplificación pueden ser empleados para amplificar uno o más ácidos nucleicos de interés. Por ejemplo, pueden utilizarse PCR —incluyendo la PCR múltiple—, SDA, TMA, NASBA y similares para amplificar fragmentos inmovilizados de ADN. En algunas realizaciones, en la reacción de amplificación se incluyen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés.

Otros métodos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir la extensión y la ligación de oligonucleótidos, la amplificación en círculo rodante (RCA) (Lizardi et al., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)) y el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (véanse, en general, las tecnologías de las patentes estadounidenses n^{os} 7.582.420, 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907 y de los documentos EP 0 320 308 B1, EP 0 336 731 B1, EP 0 439 182 B1, WO 90/01069, WO 89/12696 y WO 89/09835. Se apreciará que estas metodologías de amplificación pueden estar diseñadas para amplificar fragmentos de ADN. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir la amplificación de la sonda de ligación o reacciones del ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir una reacción de extensión-ligación de cebadores que contiene cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. Como ejemplo no limitante de extensión de cebadores y de cebadores de ligación que pueden estar específicamente diseñados para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores usados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, California), ejemplificado por las patentes estadounidenses n^{os} 7.582.420 y 7.611.869.

Métodos ejemplares de amplificación isotérmica que pueden ser usados en un método de la presente divulgación incluyen, sin limitación, la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), ejemplificada, por ejemplo, por Dean et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002), o la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos por desplazamiento de cadena, ejemplificada, por ejemplo, por la patente estadounidense n^o 6.214.587.

Otros métodos no basados en PCR que pueden usarse en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), que se describe, por ejemplo, en Walker et al., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc, 1995, en las patentes estadounidenses n^{os} 5.455.166 y 5.130.238, y en Walker et al., Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992), o la amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada, que es descrita, por ejemplo, en Lage et al., Genome Research 13:294-307 (2003).

Los métodos de amplificación isotérmica pueden ser usados con la polimerasa ϕ 29 de desplazamiento de cadena o el gran fragmento de Bst ADN-polimerasa, 5'->3' exo-, para la amplificación aleatoria de cebadores de ADN genómico. El uso de estas polimerasas aprovecha su elevada procesabilidad y su actividad de desplazamiento de la cadena. La elevada procesabilidad permite que las polimerasas produzcan fragmentos que tienen una longitud de 10-20 kb. Según se ha definido anteriormente, pueden producirse fragmentos más pequeños en condiciones isotérmicas usando polimerasas que tienen baja procesabilidad y actividad de desplazamiento de cadena, tales como la polimerasa de Klenow. En la divulgación de la patente estadounidense n^o 7.670.810 se presenta con detalle una descripción adicional de reacciones, condiciones y componentes de amplificación.

Otro método de amplificación de ácidos nucleicos que es útil en la presente divulgación es la PCR etiquetada, que usa una población de cebadores de dos dominios que tienen una región 5' constante seguida por una región 3' aleatoria, según se describe, por ejemplo, en Grothues et al. Nucleic Acids Res. 21(5):1321-2 (1993).

Las primeras rondas de amplificación se llevan a cabo para permitir una multitud de iniciaciones en el ADN desnaturalizado por calor basadas en la hibridación individual de la región 3' sintetizada aleatoriamente. Debido a la

naturaleza de la región 3', se prevé que los sitios de iniciación sean aleatorios en todo el genoma. Posteriormente, los cebadores no unidos pueden ser eliminados y puede tener lugar una duplicación adicional usando cebadores complementarios de la región 5' constante.

La metodología de recuento de cúmulos de la presente invención permite a un usuario obtener imágenes de moléculas de plantilla hibridadas con un soporte sólido, tal como la superficie de una celda de flujo antes de que se produzca realmente la amplificación de cúmulos. Después del análisis de las imágenes, debería ser posible estimar cuántos cúmulos se crearían si esas moléculas fueran llevadas a la secuenciación. A continuación, puede tomarse la decisión de cómo procesar la celda de flujo. Si la densidad estimada está dentro de un intervalo deseado, entonces es preciso, simplemente, en primer lugar, extender y amplificar las moléculas, usando, por ejemplo, amplificación de puentes. Si se desea una densidad menor, entonces las moléculas originales pueden ser quitadas (deshibridadas), y usarse una menor concentración de plantilla para sembrar los cúmulos. Si se desea una densidad mayor, entonces es preciso, simplemente, en primer lugar, extender las moléculas originales, y usar una segunda mezcla de plantilla para aumentar el número de cúmulos creados. En casos en los que la concentración de la biblioteca es muy baja, es posible llevar a cabo rondas adicionales de hibridación y de extensión, según se requiera. Esto permitirá a los usuarios obtener de manera más fiable las densidades requeridas de cúmulos diana, optimizando así el rendimiento en las plataformas de secuenciación y minimizando el desperdicio y mejorando adicionalmente la experiencia del usuario.

A menudo, antes de la secuenciación, el ADN diana es etiquetado y fragmentado. Esto puede realizarse usando la tecnología Nextera de Illumina, en la que el etiquetado y la fragmentación se llevan a cabo en una sola etapa, a menudo denominada eticmentación. Simultáneamente, los transposomas fragmentan el ADN y añaden secuencias de adaptador a los extremos. A continuación, el ADN eticmentado (etiquetado y fragmentado) es amplificado mediante PCR de ciclo limitado que también añade índices y secuencias de cebadores de secuenciación requeridas para la formación de cúmulos.

En los métodos de secuenciación por síntesis (SBS), se construyen bibliotecas y, con independencia del método de construcción de la biblioteca, las bibliotecas presentadas para la SBS generalmente consisten en una secuencia de interés flanqueada a ambos lados por constructos adaptadores. En cada extremo, estos constructos adaptadores tienen sitios de enlace a la celda de flujo que permiten que el fragmento de biblioteca se una a una superficie de la celda de flujo. Los constructos también contienen varios sitios adicionales de enlace de cebadores que incluyen sitios de enlace de secuenciación; por ejemplo, SBS3/SBS12.

Antes de su unión a la celda de flujo, los fragmentos de biblioteca son desnaturalizados y, así, se copia por extensión una copia monocatenaria del fragmento de biblioteca. Las regiones P5' (SEC ID NO 1) y P7' (SEC ID NO 2) de fragmentos monocatenarios de biblioteca se hibridan con sus oligonucleótidos complementarios, que están inmovilizados en la superficie de la celda de flujo. Habitualmente, en esta etapa, los oligonucleótidos de la celda de flujo actúan como cebadores, y se sintetiza una cadena complementaria al fragmento de la biblioteca. La cadena original se elimina por lavado, dejando copias de fragmentos que se enlazan covalentemente con la superficie de la celda de flujo y se convierten en una población clonal; por ejemplo, la amplificación de puentes genera múltiples copias de cada fragmento. Sin embargo, el presente método permite obtener imágenes o contar las cadenas hibridadas a escala unimolecular antes de la formación de los cúmulos. Se ha descubierto con sorpresa que esta determinación del número de cadenas unimoleculares hibridadas permite que se logre la predicción general de qué números de cúmulos se obtendrá después de la amplificación de puentes, permitiendo así que se realicen posibles correcciones para garantizar el máximo uso de la celda de flujo.

En la Figura 1 se muestra una visión general básica de la metodología. La etapa 1 muestra una celda de flujo estándar a la que está unido covalentemente un césped de cebadores. Se obtienen cadenas de plantilla según se ha descrito anteriormente, y la etapa 2 muestra cadenas de plantilla siendo hibridadas en un extremo del césped de cebadores en la celda de flujo bajo las condiciones apropiadas. La hibridación se lleva a cabo en presencia de oligonucleótidos biotinilados que se hibridan con sitios de cebador de secuenciación en el otro extremo de la plantilla, como puede verse en la etapa 3. Para obtener imágenes de los resultados, puede ser necesario amplificar la señal de cada molécula individual unida, a no ser que se use una plataforma de secuenciación que sea capaz de obtener imágenes de manera efectiva de moléculas individuales. La etapa 4 muestra la amplificación de la señal usando capas de reactivos de detección en ensayo con Infinium que se vierten para proporcionar la amplificación de la señal requerida para la obtención de imágenes con sensibilidad unimolecular en plataformas estándar de obtención de imágenes (por ejemplo, microscopio Manteia™, MiSeq™). La metodología actual preferida es usar 4 capas de tinción-estreptavidina (STM) y 3 capas de antiestreptavidina (ATM). Esto da como resultado que de 10 a 100 moléculas de tinción estén asociadas con cada molécula individual de plantilla unida, haciendo así posible obtener imágenes de ellas usando un equipo estándar de obtención de imágenes ya usado en la tecnología de secuenciación. Una vez que la obtención de imágenes se ha completado, pueden eliminarse los oligonucleótidos biotinilados y las moléculas de amplificación de la señal. El enjuague con enzimas normales de extensión puede eliminar las moléculas marcadas.

STM = estreptavidina marcada con tinción a 10ug/ml en tampón 1×B/W [enlace/lavado] (por ejemplo, la receta de tampón B/W del protocolo de perlas MyOne, Thermo Fisher Scientific)

ATM = anticuerpo de antiestreptavidina biotinilado a una disolución 1/100 en tampón XC3 (Illumina Inc.)

Los lavados entre capas de STM o ATM son con HT2 o PR2 (Illumina Inc). Todas las etapas de STM/ATM y de lavado se realizan a temperatura ambiente, con incubaciones de 5 minutos cada una.

La Figura 2 muestra los resultados de la obtención de imágenes de cadenas individuales usando el microscopio de fluorescencia (parte superior) o el generador de imágenes MiSeq™ (parte inferior) después de realizar la metodología de la presente invención. Se tituló PhiX™ y se obtuvieron imágenes, y puede verse que en las imágenes pueden identificarse cadenas individuales.

A continuación, se llevó a cabo un trabajo adicional en el que también se obtuvieron imágenes de los cúmulos finales. La imagen de los cúmulos fue superpuesta sobre las imágenes de las cadenas individuales y se descubrió que había una correlación. Se notó que el número de cadenas individuales objeto de formación de imágenes se correlacionaba en hasta un 10% con el número de cúmulos finalmente formados.

La Figura 3 muestra una comparación de recuentos de hibridación de plantilla con la densidad de cúmulos para 14 bibliotecas estándar TruSeq™, incluyendo B. cereus, E. coli y Rhodobacter humanos, de tres usuarios diferentes. Esto mostró una correlación general que permite una predicción general de números de cúmulos y, así, una oportunidad de corrección de la subcarga o la sobrecarga antes de avanzar más. La Figura 4 muestra una imagen similar que, además, incorpora 10 bibliotecas adicionales de doble índice. De nuevo, puede verse la correlación general. El ensayo de las 14 bibliotecas TruSeq™ y de las 10 de doble índice (todas en formato SBS3/SBS12) muestra una buena correlación general entre el ensayo de hibridación de plantilla y el recuento de cúmulos determinado a partir del experimento de secuenciación. Esto permite la detección de eventos de subcarga o sobrecarga y la corrección con una precisión de aproximadamente +/-10%.

Una vez que se ha obtenido una estimación de los números de cúmulos, puede tomarse una decisión en cuanto a si se requiere corrección de la subcarga o la sobrecarga. Por ejemplo, un usuario de la celda de flujo buscaría una densidad óptima de cúmulos de 1 a 1,3 millones de cúmulos por mm². Si la densidad estimada de cúmulos se encuentra dentro del intervalo deseado, entonces se lleva a cabo una primera extensión para copiar las moléculas a la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procesamiento estándares de cúmulos. Si la densidad estimada de cúmulos es demasiado alta, puede hacerse un ajuste quitando las moléculas originales (por ejemplo, lavando con hidróxido sódico y volviendo a hibridar a una menor concentración de plantilla). El sistema procede entonces a una primera extensión para copiar las moléculas a la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procesamiento estándares de cúmulos.

La Figura 5 muestra los resultados para la corrección de la subcarga y la sobrecarga, y puede verse que, después de la obtención de imágenes de la hibridación de la plantilla, los números de cúmulos pueden ser potenciados extendiendo las primeras moléculas hibridadas, luego hibridando una segunda porción de plantilla (por ejemplo, IR3 8pM+8pM tiene el doble de cúmulos que IR3 8pM) o reducidos al no extender las moléculas objeto de formación de imágenes, y usar luego una menor concentración de la biblioteca para la 2ª hibridación (por ejemplo, IR8 usado a 10pM para una 1ª hibridación, pero luego hibridado de nuevo a 7,5pM —las primeras moléculas hibridadas son eliminadas por completo durante el 2º evento de hibridación—). La Figura 6 también muestra los resultados de la corrección de la subcarga y la sobrecarga para dar una densidad preferida de cúmulos.

Ejemplos de metodología en plataformas automatizadas

Los métodos son compatibles con plataformas que lleven a cabo una generación de cúmulos integrada. Esto puede requerir cierta modificación del flujo de trabajo de dichas plataformas para permitir un movimiento adicional entre las estaciones de obtención de imágenes y las estaciones de formación de cúmulos, ya que el método incluye una etapa adicional de obtención de imágenes anterior a la formación de cúmulos cuando se compara con los flujos de trabajo actuales.

Cuando se usan MiSeq™, HiSeq™ u otros sistemas automatizados, se entendería que se requerirían soporte lógico/secuencias de ejecución de control apropiados para automatizar el proceso; por ejemplo, ejecutar el ensayo de obtención de imágenes de hibridación de la plantilla en el cBot™ para permitir un escaneo monocíclico del ensayo en el HiSeq™, y permitir el ajuste del número de cúmulos en el cBot™, etc. También puede usarse un soporte lógico que permita el recuento de las moléculas en la etapa de hibridación de plantilla. Debido a la naturaleza del ensayo, estas moléculas solo aparecen en una sola imagen, que es diferente de las varias imágenes a lo largo de varios ciclos que normalmente se usan para identificar cúmulos.

Se usan reactivos de amplificación de la señal para amplificar la señal procedente de las plantillas de oligonucleótidos y de cebadores marcados hibridados. Los reactivos de amplificación de la señal incluyen una mezcla de estreptavidina marcada con tinción, una mezcla de antiestreptavidina y anticuerpo, y un tampón modificado de hibridación y pueden ser usados para el ensayo de obtención de imágenes de hibridación de la plantilla (véase *supra* para detalles sobre STM y ATM. El tampón modificado de hibridación es un tampón de hibridación con los oligonucleótidos marcados/no marcados presentes cada uno a una concentración de 0,25uM. Oligonucleótidos ejemplares son SBS3', SBS8', SBS12', NxtR1' y NxtR2').

Se lleva a cabo una hibridación estándar de plantilla en presencia de cebadores marcados, en este caso oligonucleótidos biotinilados. A continuación, se lleva a cabo la amplificación de la señal y se vierten capas de reactivos

de detección por ensayo con Infinium en la celda de flujo para proporcionar la amplificación de la señal requerida para obtener una imagen con sensibilidad unimolecular.

La mezcla de escaneo puede ser vertida en la celda de flujo antes de la obtención de imágenes. La primera lectura del generador de imágenes en un sistema de secuenciación como MiSeq™ o HiSeq™ escaneará la celda de flujo para obtener imágenes de las moléculas hibridadas como una lectura de un solo ciclo.

Un protocolo ejemplar usando MiSeq™ sería:

1. Descongelar el cartucho de reactivo MiSeq™ según las instrucciones del fabricante, y descongelar también 1 tubo de cada de STM (~5ml), ATM (~5ml) y tampón modificado de hibridación (~5ml).
2. Pipetear 750ul de STM (reactivo del ensayo de obtención de imágenes de hibridación de plantilla: estreptavidina marcada con tinción) en la posición 18 del cartucho MiSeq™.
3. Pipetear 750ul de ATM (reactivo del ensayo de obtención de imágenes de hibridación de plantilla: antiestreptavidina) en la posición 20 del cartucho MiSeq™.
4. Desnaturalizar la plantilla según el protocolo estándar de Illumina Inc. para la desnaturalización de la plantilla, salvo el uso del tampón modificado de hibridación (tampón de hibridación+complementos marcados de cebadores de secuenciación) en lugar del tampón de hibridación HTI para la disolución de la plantilla desnaturalizada.
5. Pipetear 600ul de plantilla desnaturalizada en tampón modificado de hibridación (TMP) en la posición 17 del cartucho MiSeq™.
6. Ejecutar el proceso TemplatelImage en un único ciclo, siguiendo las indicaciones en pantalla en el MiSeq™.
7. Al final de la ejecución, el soporte lógico contará o determinará el número de los objetos vistos en las imágenes. Los resultados de este análisis determinan as etapas restantes.

Si se determina que la densidad estimada de cúmulos se encuentra en el intervalo deseado, se lleva a cabo entonces una primera extensión para copiar las moléculas en la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y procesamiento estándares de los cúmulos. En esta etapa puede realizarse cualquier combinación estándar de lecturas y lecturas de índices.

Si se determina que la densidad estimada de cúmulos es mayor que el intervalo deseado, puede realizarse un ajuste quitando las moléculas originales y volviendo a hibridar a una concentración menor de la plantilla. El sistema procede entonces a una primera extensión para copiar las moléculas en la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procesamiento estándares de los cúmulos. Nuevamente, en esta etapa puede realizarse cualquier combinación estándar de lecturas y lecturas de índices. Un protocolo ejemplar usando MiSeq™ sería:

8. Diluir la biblioteca desnaturalizada a una concentración menor, o desnaturalizar la biblioteca y diluir a una concentración menor en tampón modificado de hibridación.
9. Retirar del MiSeq™ el cartucho de reactivo.
10. Pipetear 600ul de plantilla desnaturalizada en tampón modificado de hibridación (TMP2) en la posición 19 del cartucho MiSeq™.
11. Iniciar otra ejecución de MiSeq™.

Si se determina que la densidad estimada de cúmulos es menor que el intervalo deseado, puede realizarse un ajuste extendiendo las moléculas que ya están en la celda de flujo, e hibridando algunas más de esa plantilla. Se lleva a cabo una primera extensión para copiar las moléculas a la superficie de la celda de flujo, seguida por una hibridación de la plantilla. A continuación, se lleva a cabo una segunda extensión para copiar el 2º conjunto de moléculas a la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procesamiento estándares de los cúmulos. Nuevamente, en esta etapa puede realizarse cualquier combinación estándar de lecturas y lecturas de índices. Un protocolo ejemplar usando MiSeq™ sería:

8. Volver a diluir la biblioteca desnaturalizada a una concentración mayor, o volver a desnaturalizar la biblioteca y diluir a una concentración mayor en tampón modificado de hibridación. Alternativamente, puede ser posible usar otra parte alícuota de la biblioteca diluida a la misma concentración usada para la ejecución de TemplatelImage: será preciso que esto sea determinado por el usuario.
9. Retirar del MiSeq™ el cartucho de reactivo.
10. Pipetear 600ul de plantilla desnaturalizada en tampón modificado de hibridación (TMP2) en la posición 19 del cartucho MiSeq™.

11. Iniciar otra ejecución de MiSeq™ usando la SampleSheet creada en la etapa 17, siguiendo las indicaciones en pantalla.

La Figura 7 muestra un posible flujo de trabajo, siendo la etapa 1, la etapa 3a y la etapa 3d etapas de acciones de usuario y siendo las restantes etapas automatizadas.

- 5 La metodología también se puede llevar a cabo en otros sistemas de secuenciación; por ejemplo, en el sistema HiSeq™ 2000. El flujo de trabajo del HiSeq™ 2000 consiste en 4 etapas principales:
 1. Ensayo de hibridación de la plantilla en el cBot™
 2. Obtener imágenes del ensayo de hibridación de la plantilla en el HiSeq™
 3. Ajuste del número de cúmulos (únicamente se realiza si la primera densidad determinada de cúmulos está fuera del intervalo deseado), amplificación y lectura de 1 preparación en el cBot™
 4. Secuenciación estándar en el HiSeq™
 - 1a. Copiar al HiSeq™ secuencias de ejecución relevantes de soporte lógico.
 - 1b. Descongelar 1 tubo de cada de STM (~5ml), ATM (~5ml) y tampón modificado de hibridación (~5ml).
 - 1c. Pipetear 600ul de STM (reactivo del ensayo de obtención de imágenes de hibridación de plantilla: estreptavidina marcada con tinción) en cada tubo de una tira de tubos de una placa de reactivos de un cBot. Poner este tubo de la tira en la posición 2 de la placa.
 - 1d. Pipetear 600ul de STM (reactivo del ensayo de obtención de imágenes de hibridación de plantilla: antiestreptavidina) en cada tubo de una tira de tubos de una placa de reactivos de un cBot™. Poner este tubo de la tira en la posición 4 de la placa.
 - 1e. Pipetear 1000ul de PR2 en cada tubo de una tira de tubos de una placa de reactivos de 2 cBot™. Poner estos en las posiciones 1 y 3 de la placa.

El diseño de la placa cBot™ es según se describe a continuación:

Fila	Reactivo	Etiqueta en el equipo de reactivos de cúmulos	Volumen (ul/pocillo)
1	Lavado PR2	PR2	1000
2	STM	STM	600
3	Lavado PR2	PR2	1000
4	ATM	ATM	600
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

- 25 1f. Desnaturalizar la plantilla según las instrucciones del fabricante —por ejemplo, según el manual de Illumina Inc.— usando el tampón modificado de hibridación en lugar del tampón de hibridación HTI para la disolución de la plantilla desnaturalizada.
- 1g. Pipetear 120ul de plantilla desnaturalizada en tubos de 0,2ml en tiras (tubos de plantilla) de tampón modificado de hibridación.
- 1h. Iniciar una ejecución de cBot™ usando una celda de flujo HiSeq™ v3, la placa de reactivos configurada en las

etapas 1b-1e, y el tubo de tira de la mezcla de la plantilla configurado en las etapas 1f-g.

1i. Al final de la ejecución, la celda de flujo está lista para ser escaneada en el HiSeq™.

2a-d. Configurar el soporte lógico de obtención de imágenes.

2e. Descongelar reactivos de HiSeq™.

5 2f. Iniciar ejecución de HiSeq™.

2g. Seleccionar la receta de secuenciación requerida.

2h. Seleccionar "Guardar todas las imágenes" en el menú desplegable.

2i. Cebiar los reactivos mediante una celda de flujo de prueba.

2j. Montar la celda de flujo de la etapa 1 en el HiSeq™ y realizar una prueba de bombeo.

10 2k. Iniciar la ejecución.

2l. Al final de la ejecución, contar los objetos vistos en las imágenes (usando las etapas 3a-3e).

3a. Descongelar una placa estándar de reactivos cBot™, y un tubo de AMX (mezcla de amplificación).

3b. Pipetear 1ml de PR2 en cada tubo de una tira vacía de tubos de placa de reactivos cBot™.

15 3c. Retirar el tubo de tira HTI (fila 1) de la placa de reactivos cBot™ y sustituirlo con el tubo de tira PR2 de la etapa 3b.

3d. Pipetear 1,3ml de AMX (mezcla de amplificación) en cada tubo de una tira vacía de tubos de placa de reactivos cBot™.

3e. Retirar el tubo de tira HFE (fila 2) de la placa de reactivos cBot y sustituirlo con el tubo de tira AMX de la etapa 3d.

20 3f. Para carriles que requieren la extensión de las moléculas en la celda de flujo, pipetear 250ul de AMX en un tubo de tira de reactivos cBot™, que ha de ser puesto en la posición 12 de la placa de reactivos.

3g. Para carriles que requieren la deshibridación de las moléculas en la celda de flujo, pipetear 250ul de PR2 en un tubo de tira de reactivos cBot™, que ha de ser puesto en la posición 12 de la placa de reactivos.

25 3h. Para carriles que requieren una segunda hibridación de la plantilla, pipetear 120ul de mezcla de plantilla a la concentración deseada en un tubo de tira de 0,2ml, que ha de ser puesto en la posición 13.

3i. Para carriles que no requieren una segunda hibridación de la plantilla, pipetear 120ul de HTI en un tubo de tira de 0,2ml, que ha de ser puesto en la posición 13.

El diseño de la placa cBot es según se describe a continuación:

Fila	Reactivo	Etiqueta en el equipo de reactivos de cúmulos	Volumen (ul/pocillo)
1	Lavado PR2	PR2	1000
2	Mezcla de amplificación	AMX	1300
3	Premezcla	LPM1	1150
4	Mezcla de amplificación	LAM1	1150
5	Formamida	LDR1	1150
6	Mezcla de amplificación	LAM1	1150
7	Tampón de lavado	HT2	1000
8	Mezcla de linealización	LMX1	300
9	Mezcla de bloqueo	BMX	350
10	0,1N NaOH	HP5	500

Fila	Reactivo	Etiqueta en el equipo de reactivos de cúmulos	Volumen (ul/pocillo)
11	Mezcla de cebadores	HP1	300
12	Mezcla de extensión/Tampón de lavado	AMX/PR2	250

3j. Volver a transferir la celda de flujo del HiSeq™ al cBot™ y ejecutar usando la placa de reactivos configurada en las etapas 3a-3g, y el tubo de tira de mezcla de la plantilla configurado en las etapas 3h-i.

3k. Al final de la ejecución, la celda de flujo está lista para ser secuenciada en el HiSeq™ 2000.

5 4a. La cuarta etapa del flujo de trabajo del HiSeq™ 2000 es la misma que configurar una ejecución estándar del HiSeq™ 2000, ya que los números de cúmulos han sido ajustados, amplificados y procesados en el cBot™ en la etapa 3.

4b. Reiniciar el HCS para que se restauren las configuraciones de escaneo.

4c. Configurar de forma normal la ejecución del HiSeq™ 2000.

10 Se entiende que el término “amplificación” usado en la presente memoria significa el procedimiento de aumentar los números de una secuencia de polinucleótidos de la plantilla produciendo una o más copias. En consecuencia, estará claro que el procedimiento de amplificación puede ser exponencial o lineal. En la amplificación exponencial, el número de copias creadas de la secuencia de polinucleótidos de la plantilla aumenta a una tasa exponencial. Por ejemplo, en una reacción ideal de PCR con 30 ciclos, 2 copias de ADN de plantilla producirán 2^{30} o 1.073.741.824 copias. En la

15 amplificación lineal, el número de copias creadas de las secuencias de polinucleótidos de la plantilla aumentan a una tasa lineal. Por ejemplo, en una reacción ideal de amplificación de 4 horas cuya velocidad de copia sea de 2000 copias por minuto, una molécula de ADN de plantilla producirá 480.000 copias.

20 Se entiende que el término “inmovilizado” o “enlazado” usado en la presente memoria abarca la unión directa o indirecta, covalente o no covalente, a no ser que se indique algo distinto, ya sea explícitamente o por el contexto. En ciertas realizaciones de la invención puede preferirse la unión covalente, pero generalmente todo lo que se requiere es que las moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) permanecen inmovilizados o unidos a un soporte en condiciones en las que sea prevea usar el soporte; por ejemplo, en aplicaciones que requieran la amplificación y/o la secuenciación de ácidos nucleicos.

25 En muchas realizaciones de la invención, los cebadores de amplificación para una amplificación en fase sólida son inmovilizados mediante unión covalente a un soporte sólido en el extremo 5' del cebador o cerca del mismo, dejando libre la porción del cebador específica a la plantilla para hibridarse con su plantilla afín y al grupo hidroxilo 3' libre para funcionar en la extensión del cebador. La química de unión elegida dependerá de la naturaleza del soporte sólido, y de cualquier funcionalización o derivatización aplicada al mismo. El propio cebador puede incluir un resto, que puede ser una modificación química no nucleotídica, para facilitar la unión. En realizaciones particulares, el cebador puede

30 incluir un nucleófilo que contenga azufre, tal como fosfotioato o tiofosfato en el extremo 5'. En el caso de hidrogeles de poli(acrilamida) en soporte sólido, este nucleófilo puede enlazarse a un grupo bromoacetamida presente en el hidrogel. En una realización preferente, el medio de unión de los cebadores al soporte sólido es a través de una unión del fosfotioato 5' a un hidrogel que comprende acrilamida polimerizada y N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA). Tal disposición es descrita más completamente en la solicitud WO 05/065814, en tramitación como la

35 presente.

Las moléculas de polinucleótidos monocatenarios de plantilla pueden estar unidas a un soporte sólido mediante hibridación con cebadores inmovilizados o, alternativamente, las moléculas de polinucleótidos monocatenarios también pueden estar unidas directamente al soporte sólido en el extremo 5' o cerca del mismo. La química de unión elegida dependerá de la naturaleza del soporte sólido, y de cualquier funcionalización o derivatización aplicada al mismo. La propia molécula de polinucleótido monocatenario puede incluir un resto, que puede ser una modificación química no nucleotídica, para facilitar la unión. En realizaciones particulares, una molécula de polinucleótido monocatenario puede incluir un nucleófilo que contenga azufre, tal como fosfotioato o tiofosfato en el extremo 5'. En el caso de hidrogeles de poli(acrilamida) en soporte sólido, este nucleófilo puede enlazarse a los grupos bromoacetamida presentes en el hidrogel. En una realización, el medio de unión de la molécula de polinucleótido monocatenario al soporte sólido es a través de una unión del fosfotioato 5' a un hidrogel que comprende acrilamida polimerizada y N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA). Tal disposición es descrita más completamente en la

40 solicitud WO 05/065814, en tramitación como la presente.

45

El término “soporte sólido” usado en la presente memoria se refiere a cualquier superficie, sustrato o matriz inerte a la que puedan unirse los ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, perlas —incluyendo perlas de látex o dextrano—, una

50 superficie, tal como una superficie de poliestireno o polipropileno, gel de poli(acrilamida), superficies de oro, superficies de vidrio y obleas de silicio. El soporte sólido puede ser una superficie de vidrio. El soporte sólido puede ser una

superficie planaria, aunque la invención también funciona en perlas que sean movidas entre recipientes de tampones diferentes, o perlas dispuestas en una superficie planaria. El soporte sólido puede ser una celda de flujo, resina, gel, una perla, un pocillo, una columna, un chip, una membrana, una matriz, una placa o un filtro.

En ciertas realizaciones, el soporte sólido puede comprender un sustrato o matriz inerte que haya sido “funcionalizado”; por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o revestimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten una unión covalente a moléculas tales como polinucleótidos. A título de ejemplo no limitante, tales soportes pueden incluir hidrogeles de poli(acrilamida sobre un sustrato inerte, tal como vidrio. En tales realizaciones, las moléculas (por ejemplo, polinucleótidos) pueden unirse de forma covalente directamente al material intermedio (por ejemplo, el hidrogel), pero el propio material intermedio puede estar unida de forma no covalente al sustrato o matriz (por ejemplo, el sustrato de vidrio). Tal disposición es descrita más completamente en la solicitud WO 05/065814, en tramitación como la presente, cuyo contenido está incluido en la presente memoria por referencia.

Los cebadores o los oligonucleótidos de los cebadores son secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridarse específicamente a una o más plantillas de polinucleótidos monocatenarios que han de ser amplificadas en condiciones encontradas en la etapa de hibridación de cebadores de cada ciclo de la reacción de amplificación. Generalmente, las reacciones de amplificación pueden usar al menos dos cebadores de amplificación, a menudo denotados cebadores “directo” e “inverso”. En ciertas realizaciones, los cebadores directo e inverso pueden ser idénticos. Los oligonucleótidos del cebador directo incluyen una “porción específica a la plantilla”, que es una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse con una secuencia de enlace de cebador en al menos una cadena de la molécula que ha de ser amplificada. Los oligonucleótidos del cebador inverso pueden incluir una porción específica a la plantilla capaz de hibridarse al complemento de la cadena con la que se hibrida el cebador directo durante la etapa de hibridación. Generalmente, los oligonucleótidos de cebadores son estructuras de polinucleótidos monocatenarios. También pueden contener una mezcla de bases naturales y no naturales y también ligamentos naturales y no naturales de esqueleto, siempre que ninguna modificación no natural no excluya la función como cebador, que es definida como la capacidad de hibridarse con una cadena de polinucleótidos de plantilla durante las condiciones de la reacción de amplificación y de actuar como punto de iniciación para la síntesis de una nueva cadena de polinucleótidos complementaria de la cadena de plantilla.

Los cebadores pueden comprender, además, modificaciones químicas no nucleotídicas, siempre que, de nuevo, tales modificaciones no impidan permanentemente la función del cebador. Las modificaciones químicas pueden, por ejemplo, facilitar la unión covalente del cebador a un soporte sólido. Ciertas modificaciones químicas pueden mejorar por sí solas la función de la molécula como cebador, o pueden proporcionar alguna otra funcionalidad útil, tal como proporcionar un sitio para la escisión para permitir que el cebador (o una cadena de polinucleótidos extendida del mismo) sea escindido de un soporte sólido.

“Amplificación en fase sólida”, según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier reacción de amplificación de ácidos nucleicos llevada a cabo sobre un soporte sólido o en asociación con el mismo de modo que la totalidad o una porción de los productos amplificados quede inmovilizada sobre el soporte sólido. En particular, la expresión abarca reacciones de amplificación en fase sólida análogas a la PCR estándar en fase de solución, salvo que uno o ambos de los cebadores directo e inverso de amplificación está/están inmovilizados sobre el soporte sólido.

En la amplificación en fase sólida, pueden aplicarse condiciones adecuadas a una molécula de polinucleótidos monocatenarios o a varios oligonucleótidos de cebador inmovilizado de modo que la secuencia Z en el extremo 3' de la molécula de polinucleótidos monocatenarios se hibride con una secuencia X de oligonucleótidos de cebador para formar un complejo en el que el oligonucleótido del cebador se hibride con la plantilla monocatenaria creando una estructura en “puente”. En la técnica se conocen las condiciones adecuadas, tales como tampones de neutralización y/o hibridación (véanse Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Current Protocols, ed. Ausubel et al.). A continuación, puede eliminarse el tampón de neutralización y/o hibridación. Un tampón adecuado de hibridación es denominado “premezcla de amplificación”, y contiene 2 M de betaína, 20 mM de Tris, 10 mM de sulfato amónico, 2 mM de sulfato de magnesio, 0,1% de Triton™, 1,3% de DMSO, pH 8,8.

Aplicando condiciones adecuadas, puede efectuarse una reacción de extensión para un complejo formado entre el cebador inmovilizado y la plantilla de polinucleótidos monocatenarios. El oligonucleótido del complejo puede ser extendido mediante adición secuencial de nucleótidos para generar un producto de extensión complementario de la molécula de polinucleótidos monocatenarios.

Ejemplos de enzimas con actividad de polimerasa que pueden ser usadas en la presente invención son la ADN-polimerasa (fragmento de Klenow, T4 ADN-polimerasa, Bst polimerasa), ADN-polimerasas termoestables procedentes de diversas bacterias termoestables (tales como Taq, VENT, Pfu, Tfi, Phusion ADN-polimerasas) así como sus derivados modificados genéticamente (TaqGold, VENTexo, Pfu exo). También puede usarse una combinación de ARN polimerasa y transcriptasa inversa para generar productos de extensión. Una enzima polimerasa útil puede tener actividad de desplazamiento de cadena. La enzima polimerasa puede ser activa a un pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, en particular entre pH 7,9 y pH 8,8. Las moléculas de trifosfato de nucleósidos usadas pueden ser trifosfatos de desoxirribonucleótidos —por ejemplo, dATP, dTTP, dCTP, dGTP—, o pueden ser trifosfatos de ribonucleósidos; por ejemplo, ATP, UTP, CTP, GTP. Las moléculas de trifosfato de nucleósidos pueden presentarse

en forma natural o no natural. Una reacción de amplificación también puede contener aditivos tales como DMSO y/o betaína, por ejemplo, para normalizar las temperaturas de fusión de las diferentes secuencias de las cadenas de plantilla. Una solución adecuada para los ciclos iniciales de extensión es denominada “mezcla de amplificación” y contiene 2 M de betaína, 20 mM de Tris, 10 mM de sulfato amónico, 2 mM de sulfato de magnesio, 0,1% de Triton™, 1,3% de DMSO, pH 8,8, más 200 mM de dNTP y 80 unidades/mL de Bst polimerasa (por ejemplo, el producto NEB de referencia M0275L).

La desnaturalización se puede llevar a cabo usando calor o usando un tampón de desnaturalización. Los tampones de desnaturalización adecuados son muy conocidos en la técnica (véanse Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Current Protocols, ed. Ausubel et al.). A título de ejemplo, se sabe que las alteraciones en pH y las soluciones de baja fuerza iónica pueden desnaturalizar ácidos nucleicos a temperaturas sustancialmente isotérmicas. Para la desnaturalización pueden usarse formamida y urea. En una realización particular, la concentración de formamida es del 50% o más, y puede ser usada pura. Tales condiciones dan lugar a la desnaturalización de moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios, produciendo moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios. Alternativamente, o además, las cadenas pueden ser separadas mediante tratamiento con una solución muy baja en sal (por ejemplo, menos de 0,1 mM en condiciones catiónicas) y pH elevado (>12) o usando una caotrópica (por ejemplo, clorhidrato de guanidinio). En una realización particular, puede usarse una base fuerte. Una base fuerte es un compuesto químico básico que es capaz de desprotonar ácidos muy débiles en una reacción ácido-base. La fuerza de una base está indicada por su valor pK_b . Los compuestos con un valor pK_b inferior a aproximadamente 1 son denominados bases fuertes y son muy conocidos para un experto en la técnica. En una realización particular, la base fuerte es una solución de hidróxido sódico (NaOH) usada a una concentración entre 0,05 M y 0,25 M. Más en particular, se usa NaOH a una concentración de 0,1 M.

Puede ser ventajoso llevar a cabo etapas opcionales de lavado entre las etapas de un método de amplificación. Por ejemplo, podría aplicarse un tampón de extensión sin enzima polimerasa con o sin dNTP a un soporte sólido sobre el que se esté llevando a cabo la amplificación, y puede ser aplicado antes de ser eliminado y sustituido con tampón de extensión completo (tampón de extensión que incluye todos los componentes necesarios para que la extensión prosiga).

Múltiples ciclos de amplificación sobre una superficie sólida en las condiciones ejemplificadas anteriormente pueden dar lugar a una colonia o “cúmulo” de ácido nucleico que comprenda múltiples copias inmovilizadas de una secuencia particular de polinucleótidos monocatenarios y de su secuencia complementaria. La inmovilización inicial de una molécula de polinucleótido monocatenario en las condiciones ejemplificadas en la presente memoria puede dar lugar a que la molécula de polinucleótido monocatenario se hibride únicamente con oligonucleótidos de cebador situados a una distancia dentro de la longitud total de la molécula de polinucleótido monocatenario. Así, la demarcación de la colonia o cúmulo de ácidos nucleicos formada puede estar limitada a un área relativamente local, concretamente el área en la que se inmovilizó la molécula inicial de polinucleótido monocatenario. Si se usan condiciones en las que las plantillas y las copias complementarias de las mismas siguen inmovilizadas en todo el proceso de amplificación, entonces las plantillas no se entremezclan, salvo en la medida en que se vuelvan lo bastante grandes para solaparse en la superficie. En realizaciones particulares, no hay ningún ácido nucleico no inmovilizado durante parte alguna del proceso de amplificación y, así, las plantillas no pueden difundir ni iniciar cúmulos adicionales en otro lugar de la superficie.

Un procedimiento de amplificación puede conllevar ciclos de exposición a condiciones para la hibridación, la extensión y la desnaturalización de secuencias de ácidos nucleicos. Los ciclos pueden repetirse para obtener un nivel suficiente de amplificación. El procedimiento de amplificación (por ejemplo, en una ronda) puede llevarse a cabo usando, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 o más ciclos de amplificación. Cada ciclo puede ser llevado a cabo usando los mismos reactivos y las mismas condiciones, o los reactivos y/o las condiciones pueden variar entre ciclos diferentes. Por ejemplo, los primeros 5, 10, 15, 20 o 25 ciclos, en una primera ronda, pueden llevarse a cabo usando condiciones de extensión con concentraciones equimolares de cuatro tipos de nucleótidos diferentes, y los ciclos subsiguientes, en una segunda ronda, pueden llevarse a cabo usando condiciones que den lugar a que los nucleótidos se incorporen de manera menos eficiente. Pueden usarse condiciones de amplificación normalizadas que usen nucleótidos incorporados de manera menos eficiente. Puede llevarse a cabo un número mayor de ciclos de amplificación, dado que la eficiencia global de la amplificación se reduce, y las secuencias ricas en AT no llegan a ser amplificadas en demasía. Por lo tanto, es posible llevar a cabo, por ejemplo, 25 ciclos de amplificación en una primera ronda usando concentraciones equimolares de nucleótidos, y 15 o más ciclos de amplificación adicionales en una segunda ronda usando condiciones que usen nucleótidos incorporados con menor eficiencia (por ejemplo, concentraciones limitadas de nucleótidos A y/o T). Tales ciclos adicionales en la segunda ronda amplifican los cúmulos ricos en GC con preferencia a los cúmulos ricos en AT, normalizando, por ende, la intensidad de cúmulos de diferentes composiciones de secuencia.

Las etapas de hibridación, extensión y desnaturalización de un método de amplificación definido en la presente memoria pueden llevarse todas a cabo a la misma temperatura, sustancialmente isotérmica. Preferentemente, la temperatura se entre 37°C y aproximadamente 75°C, dependiendo de la elección de enzima, más preferentemente entre 50°C y 70°C, aún más preferentemente entre 60°C y 65°C para la Bst polimerasa. En una realización particular, la temperatura sustancialmente isotérmica puede estar en torno a la temperatura de fusión del cebador o de los cebadores de oligonucleótidos. En la técnica se conocen métodos de cálculo de las temperaturas apropiadas de fusión.

Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede estar aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores de oligonucleótidos. En otra realización particular adicional, la temperatura sustancialmente isotérmica puede ser determinada empíricamente. La temperatura puede ser aquella a la que el oligonucleótido presente la mayor especificidad hacia el sitio de enlace al cebador, a la vez que reduzca el enlace no específico. Aunque la información anterior es ejemplar de un método isotérmico, un experto en la técnica comprenderá que las etapas de hibridación, extensión y desnaturalización de la amplificación se llevan a cabo a diferentes temperaturas, dependiendo del instrumento de secuenciación que se esté usando.

Aunque las realizaciones anteriores describen la detección de señales fluorescentes procedentes de cadenas individuales, la detección no tiene que contar necesariamente las moléculas individuales; por ejemplo, podría usarse un escáner Typhoon para captar una señal de fluorescencia en masa; siempre que pueda hacerse una correlación entre la señal y el número final de cúmulos, entonces el método seguiría funcionando. Además, la detección no tiene por qué estar basada en la fluorescencia, ni siquiera en la óptica; por ejemplo, podrían usarse cascadas de amplificación de señales de tipo HRP y detectar la señal por quimioluminiscencia, o usar algún tipo de cascada que genere iones de H^+ y detectar cambios de pH.

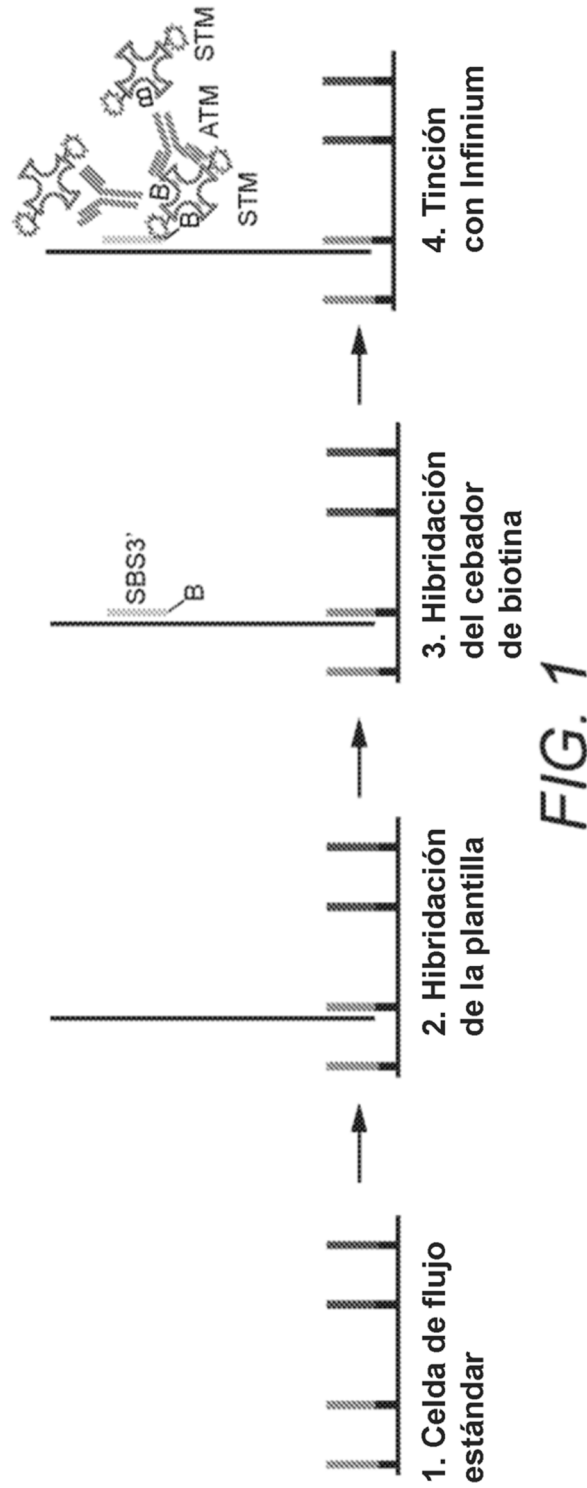
REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos que se producirán a partir de la amplificación en fase sólida de ácidos nucleicos que comprende: proporcionar un soporte sólido que tiene varios cebadores de captura inmovilizados sobre sí mismo; proporcionar cadenas de plantilla capaces de hibridarse con al menos algunos de dichos cebadores de captura; marcar las cadenas de plantilla o las extensiones de las mismas, si dichas cadenas no están ya marcadas; detectar la señal de las cadenas marcadas o extensiones de las mismas para determinar el número de cadenas individuales de plantilla presente en el soporte sólido; y analizar dicha señal detectada para estimar el número de cúmulos o las densidades de cúmulos que se obtendrán después de la amplificación de cúmulos de dichas cadenas de plantilla correlacionando el número de cadenas individuales de plantilla presentes con el número o las densidades previstos de cúmulos.
2. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en la reivindicación 1 en el que la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de un oligonucleótido marcado con la cadena de plantilla.
3. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que cada una de dichas cadenas de plantilla comprende al menos un sitio de enlace de marca; en el que, preferentemente, el sitio de enlace de marca es un sitio de cebador de secuenciación.
4. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de dichas cadenas de plantilla con dichas sondas de captura en presencia de oligonucleótidos marcados capaces de hibridarse con los sitios de enlace de marca.
5. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas, incluyendo el método la etapa de extender los cebadores de plantilla; y, opcionalmente, en el que la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende el uso de dNTP marcado durante la etapa de extensión; o en el que la etapa de marcado de las cadenas de plantilla o de las extensiones de las mismas comprende la hibridación de un oligonucleótido marcado con la cadena de plantilla extendida.
6. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el soporte sólido es una celda de flujo; y/o los cebadores de captura comprenden los oligonucleótidos P5 y P7.
7. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que las cadenas de plantilla comprenden secuencias de adaptador; y en el que, preferentemente, dichas secuencias de adaptador son complementarias de al menos uno de los cebadores de captura y se hibridarán con los mismos en condiciones apropiadas.
8. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que el sitio de cebador de secuenciación comprende una secuencia SBS3 o SBS12; y/o en el que los oligonucleótidos marcados son secuencias marcadas SBS3' o S8S12'; y/o en el que los oligonucleótidos marcados están marcados con biotina.
9. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas, incluyendo el método la etapa de amplificar la señal de las cadenas marcadas o extensiones de las mismas; en el que se produce, preferentemente, una amplificación de señal exponiendo el soporte sólido con oligonucleótidos marcados unido al mismo a estreptavidina marcada con tinción y, opcionalmente, proporcionando exposiciones subsiguientes a antiavidina y estreptavidina marcada con tinción; y/o en el que la amplificación de la señal da lugar a entre 2 y 1000, preferentemente entre 10 y 100 moléculas de tinción por cadena de plantilla hibridada; y preferentemente, además, en el que la estreptavidina marcada con tinción comprende una tinción fluorescente.
10. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que la obtención de imágenes se lleva a cabo con un microscopio de fluorescencia.
11. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas en el que, si el análisis sugiere que la densidad predicha de cúmulos está dentro de un intervalo predeterminado deseado, entonces se efectúa una primera extensión para copiar las moléculas en la superficie de la celda de flujo, antes de la amplificación y el procesamiento estándar de cúmulos; o

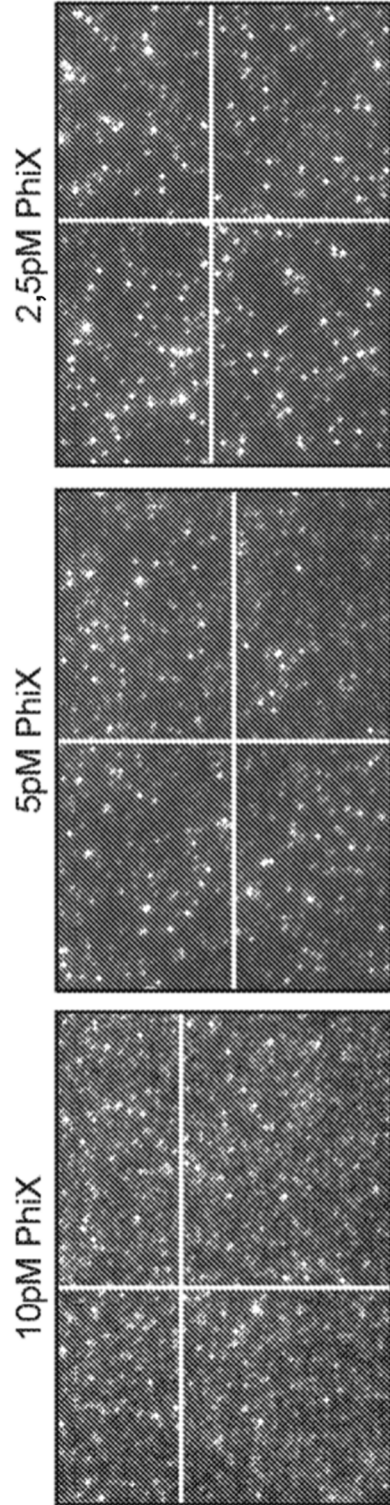
si el análisis indica que la densidad predicha de cúmulos es mayor que un intervalo predeterminado deseado, las moléculas originales de la plantilla son eliminadas del soporte sólido; en el que, preferentemente,

las moléculas originales de la plantilla son eliminadas lavando con hidróxido sódico.

- 5 12. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que, si el análisis indica que la densidad predicha de cúmulos es mayor que un intervalo predeterminado deseado, una fracción de las moléculas originales de la plantilla es eliminada del soporte sólido; y, opcionalmente, (i) en el que varios oligonucleótidos de eliminación diferentes, preferiblemente dos oligonucleótidos de eliminación diferentes, son hibridados en diferentes proporciones con las moléculas de la plantilla, y en el que solo una proporción de los oligonucleótidos de eliminación crea un sitio de restricción, llevándose luego a cabo una etapa de digestión de restricción para eliminar selectivamente las moléculas con el sitio de restricción o (ii) en el que los oligonucleótidos protectores son hibridados con una porción de las moléculas de la biblioteca unidas a la superficie, usándose endonucleasa para eliminar, por digestión, las moléculas no protegidas de la biblioteca unidas a la superficie, y
- 10 en el que la cantidad de oligonucleótido protector puede ser determinada por titulación o
- 15 en el que también pueden usarse oligonucleótidos protectores adicionales para proteger a cualquier cebador (por ejemplo, los cebadores P5 y P7) de su eliminación por la exonucleasa.
13. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en la reivindicación 9 en el que la hibridación de las cadenas de plantilla se efectúa entonces a una concentración de plantilla más baja y se lleva a cabo una etapa de extensión para copiar las moléculas a la superficie de la celda de flujo.
- 20 14. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que, si el análisis indica que la densidad predicha de cúmulos es menor que un intervalo predeterminado deseado, las moléculas que ya están en la celda de flujo son extendidas y, a continuación, se lleva a cabo una etapa adicional de hibridación para hibridar cadenas de plantilla adicionales con dichas sondas de captura.
- 25 15. Un método de predicción de números de cúmulos o densidades de cúmulos como en cualquiera de las reivindicaciones previas, incluyendo el método la etapa adicional de llevar a cabo una amplificación en fase sólida; en el que, opcionalmente,
- la amplificación en fase sólida es amplificación de puentes; y, además, opcionalmente,
- incluyendo el método la etapa adicional de efectuar una secuenciación por síntesis.



Titulación de PhiX vista en Manteia



Obtención de imágenes tras la hibridación de la plantilla en un MiSeq

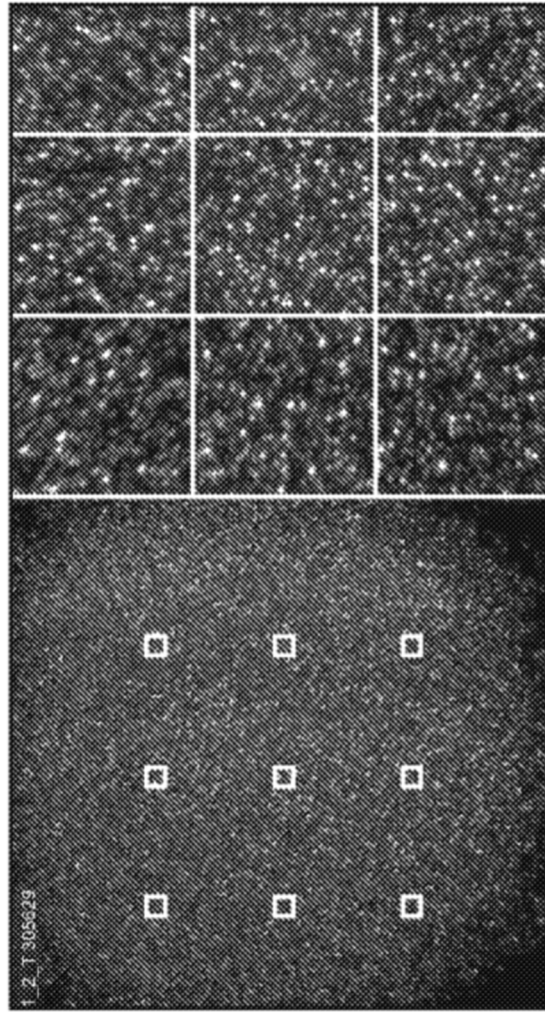


FIG. 2

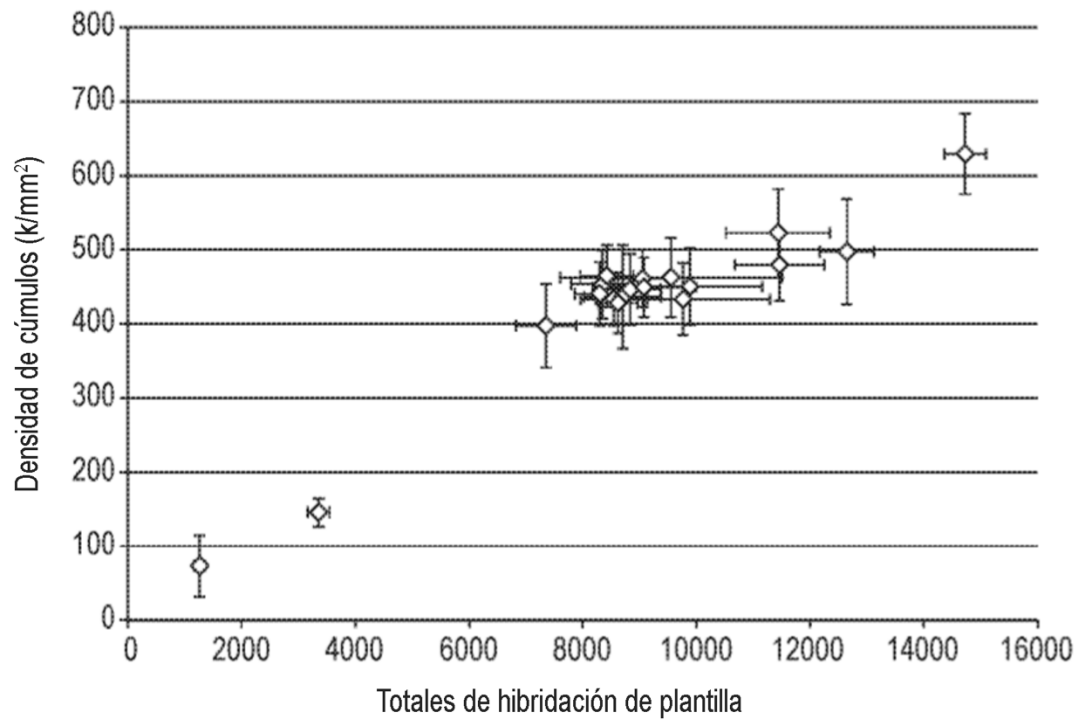


FIG. 3

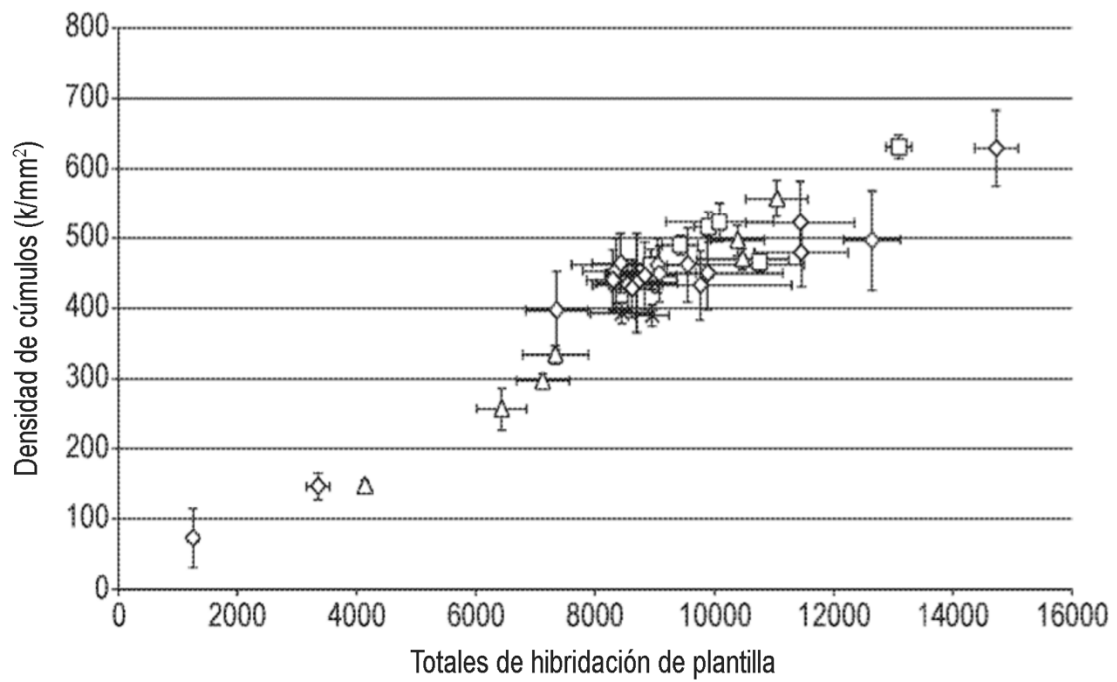


FIG. 4

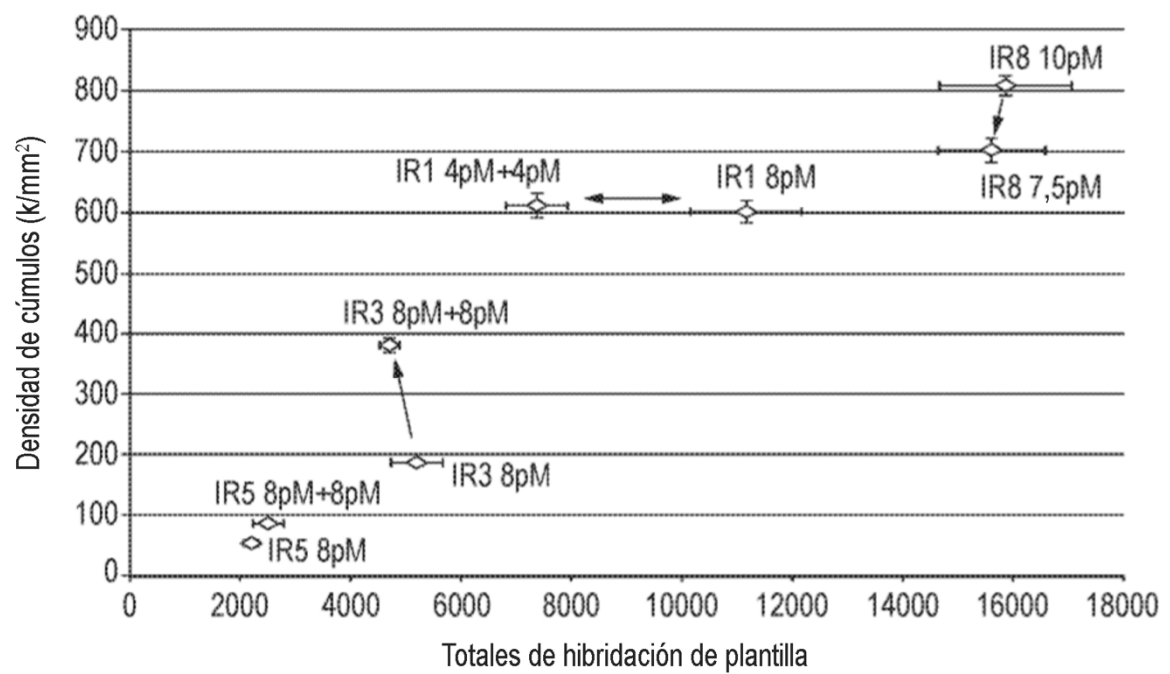


FIG. 5

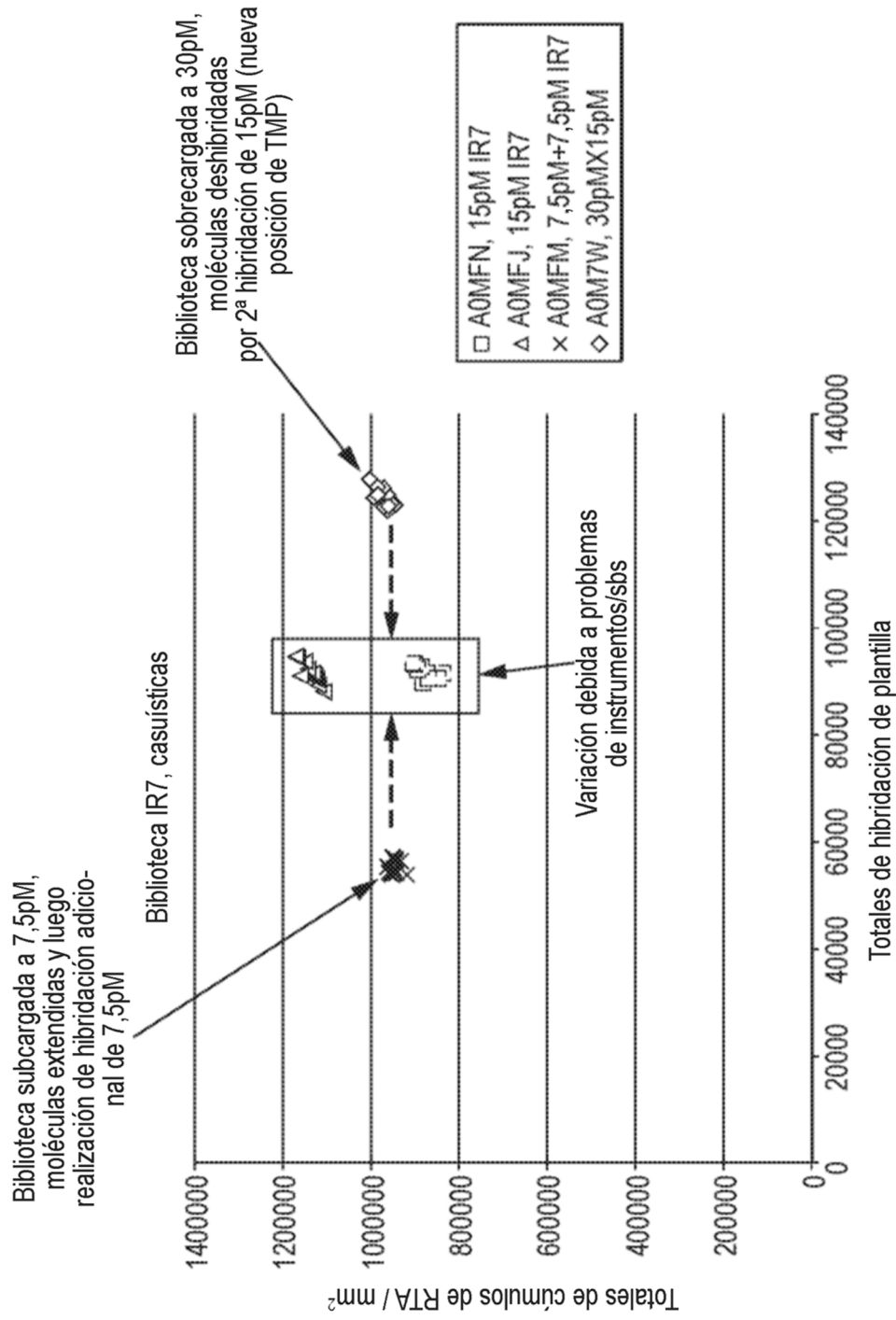


FIG. 6

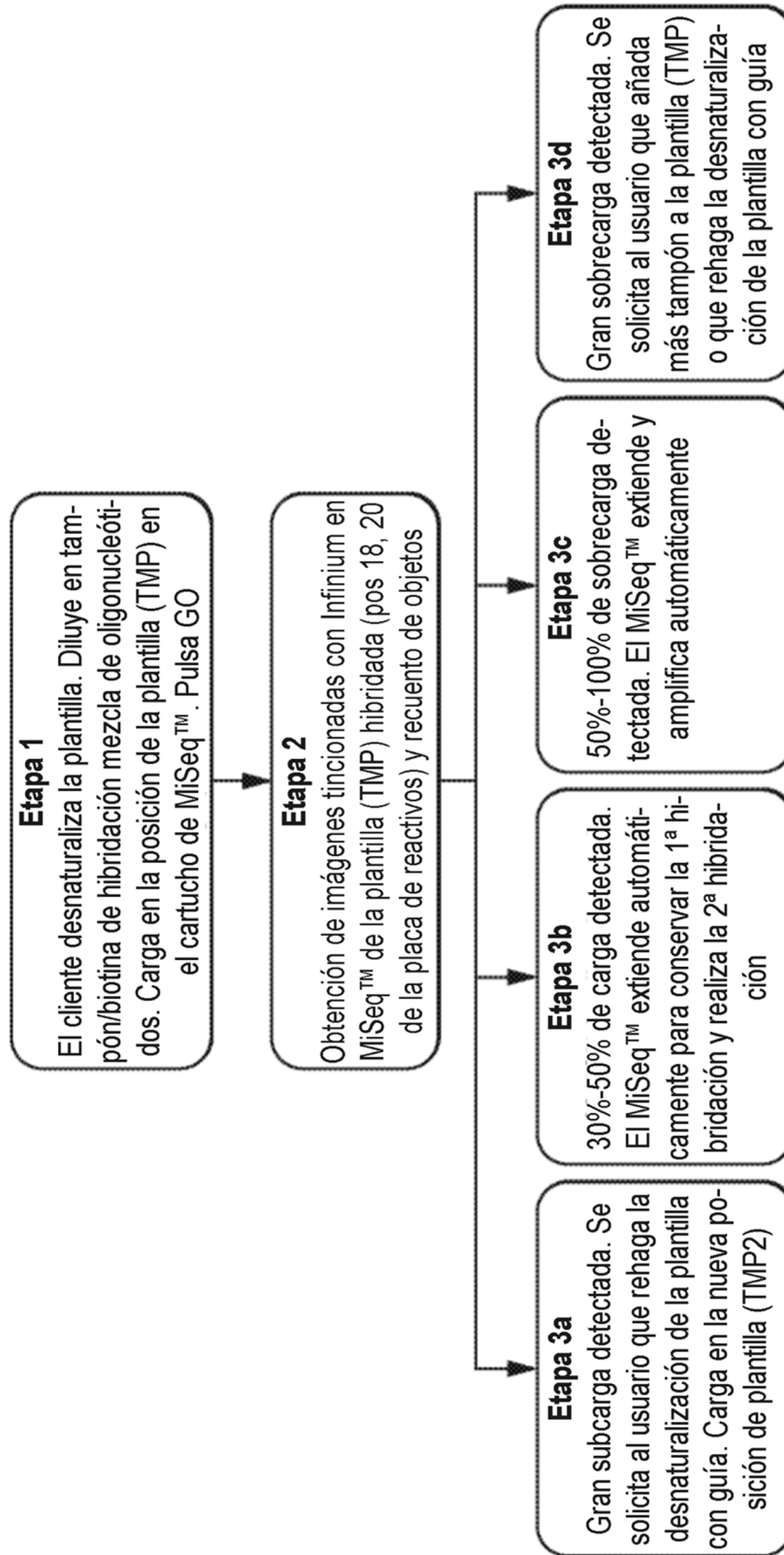


FIG. 7