

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 193**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2016 E 20200077 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3783109**

54 Título: **Concatemerización de moldes en la superficie**

30 Prioridad:

31.03.2015 US 201562141165 P

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

29.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BOUTELL, JONATHAN, MARK

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 984 193 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

Concatemerización de moldes en la superficie

5 **Antecedentes**

La tarea de catalogar la variación genética humana y correlacionar esta variación con la susceptibilidad a las enfermedades es abrumadora y costosa. Es indispensable una reducción drástica de este coste para avanzar en la comprensión de la salud y la enfermedad. La reducción de los costes de secuenciación requerirá una serie de avances técnicos en el campo. Los avances técnicos que podrían reducir el coste del análisis del genoma incluyen: (1) generación de bibliotecas; (2) amplificación y análisis clonales con alto grado de paralelismo; (3) desarrollo de una bioquímica sólida de secuenciación cíclica; (4) desarrollo de tecnología de imagen ultrarrápida; y (5) desarrollo de algoritmos para el ensamblaje de secuencias a partir de lecturas cortas.

La creación de amplificaciones clonales con alto grado de paralelismo es importante para una secuenciación rentable. La secuenciación se realiza generalmente en poblaciones clonales de moléculas de ADN preparadas tradicionalmente a partir de plásmidos cultivados a partir de la recolección de colonias bacterianas individuales. En el proyecto del genoma humano, cada clon se seleccionó individualmente, se cultivó y se extrajo o amplificó el ADN del clon. En los últimos años, se han producido una serie de innovaciones que permiten el análisis con alto grado de paralelismo de los clones de ADN, en particular utilizando enfoques basados en matrices. En el enfoque más simple, la biblioteca se puede analizar a nivel de una sola molécula que, por su propia naturaleza, es clonal. La principal ventaja de la secuenciación de una sola molécula es que la secuenciación cíclica puede ocurrir de forma asincrónica, ya que cada molécula se lee individualmente. Por el contrario, el análisis de las amplificaciones clonales requiere una finalización casi cuantitativa de cada ciclo de secuenciación; de lo contrario, el ruido de fondo aumenta progresivamente y cada ciclo subsiguiente limita gravemente la longitud de lectura. Como tal, el análisis clonal supone una carga mayor para la solidez de la bioquímica de secuenciación y puede limitar potencialmente la longitud de lectura.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos para mejorar el análisis genómico y proporcionar métodos más rentables para el análisis de secuencias. La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Breve resumen

Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción permiten la amplificación en la superficie a densidades mejoradas. En la presente descripción se describen métodos para concatenar cadenas de molde durante el proceso de amplificación en puente, de manera que cada cebador de la superficie de la cubeta de lectura pueda terminar con múltiples copias de la cadena de molde extendidas sobre el mismo. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción permiten la creación de grupos que son más brillantes, pero a las mismas densidades que las que se consiguen actualmente usando la amplificación de grupo estándar. Los grupos más brillantes pueden tener una serie de ventajas, por ejemplo, una mejor calidad de lectura, la compatibilidad con longitudes de lectura más largas, tiempos de escaneo más rápidos para la secuenciación y una mayor solidez del sistema.

En la presente descripción se presenta un método para preparar moldes inmovilizados para una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido que tiene un cebador de amplificación directo e inverso inmovilizado en el mismo; (b) proporcionar un ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana comprende: (i) una primera región de secuencia conocida complementaria a la del cebador de amplificación directo; (ii) una primera región molde; (iii) una segunda región de secuencia conocida sustancialmente idéntica a la del cebador de amplificación inverso, en donde la primera región molde está entre la primera región de secuencia conocida y la segunda región de secuencia conocida; y (iv) una tercera región de secuencia conocida complementaria a la del cebador de amplificación directo, en donde la primera región molde y la segunda región de secuencia conocida están entre la primera región de secuencia conocida y la tercera región de secuencia conocida; (c) aplicar el ácido nucleico diana al soporte sólido en condiciones adecuadas para la hibridación, de modo que la primera región de secuencia conocida se hibrida con el cebador de amplificación directo; y (d) extender el cebador de amplificación directo hibridado para generar un molde inmovilizado que comprende una copia complementaria del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además: (e) desnaturalizar el ácido nucleico diana del molde inmovilizado; (f) hibridar el molde inmovilizado con el cebador de amplificación inverso, de modo que una copia complementaria de la segunda secuencia flanqueante se hibrida con el cebador de amplificación inverso; y (g) extender el cebador de amplificación inverso hibridado para generar una segunda cadena inmovilizada que comprende la primera región molde situada entre la primera región de secuencia conocida y la segunda región de secuencia conocida.

En algunas realizaciones, el método puede comprender además: (h) desnaturalizar la segunda cadena inmovilizada del primer molde inmovilizado; (i) hibridar la segunda cadena inmovilizada con el primer molde inmovilizado, de modo

- 5 que la primera región de secuencia conocida de la segunda cadena inmovilizada se hibrida con una copia complementaria de la primera región de secuencia conocida en el molde inmovilizado; (j) extender un OH 3' de la primera región de secuencia conocida para generar un concatémero de la segunda cadena inmovilizada; y (k) extender un OH 3' de la copia complementaria de la primera región de secuencia conocida para generar un concatémero del primer molde inmovilizado.
- En algunas realizaciones, el método puede comprender además: (l) desnaturalizar los concatémeros y repetir las etapas (i), (j) y (k) para generar más concatémeros de cada cadena.
- 10 En algunos aspectos de las realizaciones anteriores, el cebador de amplificación directo puede comprender una región de complementariedad directa, teniendo dicha región de complementariedad directa complementariedad con una región de complementariedad inversa del cebador de amplificación inverso.
- 15 En algunos aspectos, la primera región de complementariedad está situada directamente en 5' de una región que tiene complementariedad con la primera región de secuencia conocida del ácido nucleico diana.
- En algunos aspectos, la región de complementariedad inversa está situada directamente en 5' de una región que tiene una secuencia sustancialmente idéntica a la segunda región de secuencia conocida del ácido nucleico diana.
- 20 En algunos aspectos, la región de complementariedad directa y la segunda región de complementariedad están configuradas de tal manera que los ciclos repetidos de hibridación y extensión producen un concatémero de la primera cadena inmovilizada, cada copia del concatémero está separada de la siguiente por secuencia de la región de complementariedad directa.
- 25 En algunos aspectos, la región de complementariedad directa y la segunda región de complementariedad están configuradas de tal manera que los ciclos repetidos de hibridación y extensión producen un concatémero de la segunda cadena inmovilizada, cada copia del concatémero está separada de la siguiente por secuencia de la región de complementariedad inversa.
- 30 En algunos aspectos, los concatémeros comprenden múltiples copias de dicha molécula de ácido nucleico diana de al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o al menos 10.000 copias.
- En algunos aspecto, el soporte sólido es plano. En algunos aspectos, el soporte sólido comprende micropocillos.
- 35 En algunos aspectos, el ácido nucleico diana tiene una longitud de al menos 10, 20, 50, 100, 200 o de al menos 500 nucleótidos.
- En algunos aspectos, el ácido nucleico diana comprende además una cuarta región de secuencia conocida sustancialmente idéntica a la del cebador de amplificación inverso, en donde la primera región de secuencia conocida, la primera región molde y la segunda región de secuencia conocida están entre la tercera región de secuencia conocida y la cuarta región de secuencia conocida.
- 40 En algunos aspectos, el cebador de amplificación directo comprende un resto enlazador químico no nucleotídico situado para impedir la copia de cualquier nucleótido que esté en 5' del resto enlazador químico no nucleotídico. En algunos aspectos, el cebador de amplificación inverso comprende un resto enlazador químico no nucleotídico situado para impedir la copia de cualquier nucleótido que esté en 5' del resto enlazador químico no nucleotídico. En aspectos de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el resto enlazador químico no nucleotídico puede comprender un resto diol. En algunos aspectos, el resto enlazador químico no nucleotídico comprende un enlazador no nucleotídico que une el cebador al soporte sólido.
- 45 En algunos aspectos, el cebador de amplificación inverso comprende un resto enlazador químico no nucleotídico situado para impedir la copia de cualquier nucleótido que esté en 5' del resto enlazador químico no nucleotídico. En aspectos de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el resto enlazador químico no nucleotídico puede comprender un resto diol. En algunos aspectos, el resto enlazador químico no nucleotídico comprende un enlazador no nucleotídico que une el cebador al soporte sólido.
- 50 En algunos casos, el método puede comprender además la secuenciación del ácido nucleico diana. Por ejemplo, en algunos aspectos, la secuenciación del ácido nucleico diana comprende: hibridar uno o más cebadores de secuenciación con el primer molde inmovilizado o la segunda cadena inmovilizada; extender los cebadores de secuenciación incorporando uno o más nucleótidos marcados en la cadena naciente; y detectar los nucleótidos marcados, obteniendo así información de secuencia sobre el ácido nucleico diana.
- 55 En algunos casos, el ácido nucleico diana se prepara amplificando con un par de cebadores configurados con un resto de unión, de modo que una cadena de un producto de amplificación generado usando el par de cebadores se puede separar de la cadena opuesta. En algunos aspectos, el resto de unión comprende biotina y puede separarse uniéndose a un soporte sólido que comprende estreptavidina.
- 60 Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y a partir de las reivindicaciones.
- 65

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema que muestra la amplificación en fase sólida según una realización.

5 La figura 2 es un esquema que muestra construcciones de biblioteca alternativas para su uso en la amplificación en fase sólida.

La figura 3 es un esquema que muestra la amplificación en fase sólida según una realización.

10 La figura 4A es una imagen de microscopio de fluorescencia de grupos de amplificación según protocolos estándar en comparación con una realización presentada en la presente descripción.

La figura 4B es un gráfico del número de grupos frente a la intensidad de la señal SYBR de las cubetas de lectura descritas en la figura 4A.

15 La figura 5 es un conjunto de imágenes de fluorescencia de los nucleótidos fluorescentes C, T y G incorporados en grupos amplificados según protocolos estándar o según una realización presentada en la presente descripción.

20 La figura 6 muestra imágenes de fluorescencia (arriba) e histogramas (abajo) de grupos amplificados según protocolos estándar o según una realización presentada en la presente descripción.

La figura 7 muestra una comparación de la intensidad y el tamaño del grupo para varios protocolos de amplificación.

25 La figura 8 muestra una comparación de la intensidad de la señal durante 100 ciclos en grupos que contienen concatémicos en la superficie frente a grupos estándar.

Descripción detallada

30 La tecnología estándar para la amplificación en la superficie de moldes de ácidos nucleicos (“formación de grupos”) ha permitido densidades muy altas (500-600 k/mm²) en una cubeta de lectura típica. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de metodologías mejoradas para la amplificación en la superficie de moldes de ácidos nucleicos. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción permiten la amplificación en la superficie a densidades mejoradas. En la presente descripción se describen métodos para concatenar cadenas de molde durante el proceso de amplificación en puente, de manera que cada cebador de la superficie de la cubeta de lectura pueda terminar con múltiples copias de la cadena de molde extendidas sobre el mismo. Los métodos y composiciones proporcionados en la presente descripción permiten la creación de grupos que son más brillantes, pero a las mismas densidades que las que se consiguen actualmente usando la amplificación de grupo estándar. Los grupos más brillantes pueden tener una serie de ventajas, por ejemplo, una mejor calidad de lectura, la compatibilidad con longitudes de lectura más largas, tiempos de escaneo más rápidos para la secuenciación y una mayor solidez del sistema.

Una realización se ilustra en la figura 1, que expone un método para formar concatémicos de un ácido nucleico diana. Como se muestra en la parte recuadrada de la figura 1, se proporciona un soporte sólido que tiene inmovilizados sobre el mismo una pluralidad de cebadores de amplificación directos e inversos, denominados P5 y P7 en la figura. También se proporciona un ácido nucleico diana que tiene una primera región de secuencia conocida (P5'), complementaria al cebador P5, una segunda región de secuencia conocida sustancialmente idéntica a la del cebador de amplificación inverso (P7) y una tercera región de secuencia conocida (P5'), complementaria al cebador P5. Una primera región molde se sitúa entre las regiones primera (P5') y segunda (P7) de la secuencia conocida. El ácido nucleico diana se aplica al soporte sólido en condiciones adecuadas para la hibridación de manera que la secuencia P5' se hibride con la secuencia P5 del cebador inmovilizado. El cebador se extiende en condiciones favorables a la extensión, por ejemplo, en presencia de una ADN polimerasa y dNTP. El producto de extensión resultante es un molde inmovilizado que comprende una copia complementaria del ácido nucleico diana, como se ilustra en la figura 1 después de la 1ª extensión.

55 Otras rondas de amplificación en puente pueden incluir desnaturalizar el ácido nucleico diana del molde inmovilizado y permitir que el molde inmovilizado se hibride con el cebador de amplificación inverso. En el ejemplo mostrado en la figura 1, la copia complementaria de la segunda secuencia conocida (P7') se hibrida con el cebador inverso (P7) y se extiende en las condiciones de extensión descritas anteriormente. El producto de extensión resultante es una segunda cadena inmovilizada que comprende la primera región molde situada entre la primera región de secuencia conocida y la segunda región de secuencia conocida, como se ilustra en la figura 1 después de la 2ª extensión. Los ciclos posteriores de desnaturalización, hibridación y extensión permiten que el proceso continúe de manera que la segunda cadena inmovilizada pueda hibridarse con el primer molde inmovilizado y uno o ambos 3' OH de la segunda cadena inmovilizada y/o el primer molde inmovilizado se extiendan para generar más productos de extensión. Los productos de extensión adicionales que resultan de estos ciclos adicionales son concatémicos de una o ambas de la segunda cadena inmovilizada y/o el primer molde inmovilizado, como se ilustra en la figura 1 después de los siguientes ciclos. Los concatémicos pueden incluir 2 o más copias de la región molde (o complemento de la misma) situadas entre las

secuencias conocidas. En algunos casos, los concatémoros pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o más de 10.000 copias de la región molde (o complemento de la misma) situadas entre las secuencias conocidas. Tras las rondas de amplificación, un cebador de secuenciación en solución puede hibridarse con una región de secuencia conocida y extenderse. El cebador de secuenciación se hibridará con múltiples ubicaciones en la misma cadena inmovilizada y/o molde inmovilizado. Por lo tanto, pueden tener lugar múltiples reacciones de secuenciación en la misma cadena, lo que da como resultado una señal que se amplifica enormemente con respecto a los métodos anteriores, donde solo se genera una señal por cadena.

Tal como se usa en la presente descripción, el término “concatémoro” se refiere a una molécula de ácido nucleico larga y continua que contiene múltiples copias de las mismas secuencias unidas en serie. Las copias múltiples pueden estar separadas por otra secuencia, por ejemplo, por una secuencia conocida que flanquea la secuencia concatemerizada en el extremo 3' y/o 5'. Se puede intercalar cualquier número de copias de la secuencia flanqueante entre la secuencia concatemerizada. En algunas realizaciones, los concatémoros pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o más de 10.000 copias de una región molde (o complemento de la misma) en un solo concatémoro. En algunos casos, los concatémoros pueden comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o más de 10.000 copias de la secuencia conocida, situadas de manera repetitiva entre copias de las secuencias conocidas. Una ilustración adicional de esta realización se expone en el ejemplo 1 a continuación.

La figura 2 ilustra una realización alternativa, en donde se proporciona una cadena complementaria al ácido nucleico diana. Esto puede resultar naturalmente en casos donde el ácido nucleico diana se proporciona en forma bicatenaria. Como se muestra en la figura 2, la cadena opuesta se hibrida con el cebador de amplificación inverso y se extiende. Sin embargo, a diferencia de la realización ilustrada en la figura 1, se genera una única copia del ácido nucleico diana. Los ciclos adicionales de amplificación no generarán concatémoros, como se muestra en la figura 2. Para evitar este resultado, se pueden generar construcciones de biblioteca alternativas que comprendan tanto la primera como la segunda regiones conocidas tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' de la construcción bicatenaria, como se ilustra en la figura 2. La amplificación de la cadena superior o de la cadena inferior generará concatémoros, de una manera similar a la mostrada en la figura 1.

La figura 3 ilustra otra realización, en donde los cebadores de amplificación directos e inversos comprenden una secuencia adicional situada en 5' de la secuencia que se hibrida con la secuencia conocida. En algunos casos, la secuencia adicional del cebador directo es complementaria a la secuencia adicional del cebador inverso. Por ejemplo, como se ilustra en la figura 3, los cebadores de superficie comprenden una secuencia de oligo dA y oligo dT situada en 5' de las secuencias P5 y P7 (denominadas 20T-P7 y 20A-P5). Por lo tanto, después de un 1^{er} ciclo de extensión, el molde inmovilizado comprende la secuencia de complementariedad (20-mero de A) inmovilizada en el extremo 5' del molde, como se muestra en la figura 1 después de la 1^a extensión. Tras una extensión posterior, la copia resultante comprende el complemento de la secuencia de complementariedad (20-mero de T) inmovilizada en el extremo 5' de la cadena copiada y nuevamente en el extremo 3' del producto de extensión. A medida que tienen lugar rondas adicionales de amplificación, las secuencias de complementariedad se incorporan en tándem, flanqueando las secuencias conocidas, por ejemplo, P5 y P7, como se ilustra en la figura 3. Una ilustración adicional de esta realización se expone en el ejemplo 2 a continuación.

Amplificación de grupo

En la presente descripción se describen métodos para concatenar cadenas molde durante el proceso de amplificación en puente. La amplificación en puente también se denomina en la presente descripción “amplificación de grupo”. En algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican usando metodologías de amplificación de grupo, como se ilustra en las divulgaciones de las patentes US-7.985.565 y US-7.115.400.

Los materiales incorporados de las patentes US-7.985.565 y US-7.115.400 describen métodos de amplificación de ácido nucleico en fase sólida, que permiten que los productos de amplificación se inmovilicen sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas por grupos o “colonias” de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Cada grupo o colonia en dicha matriz se forma a partir de una pluralidad de cadenas de polinucleótidos idénticas inmovilizadas y una pluralidad de cadenas de polinucleótidos complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas se denominan generalmente en la presente descripción “matrices agrupadas”. Los productos de reacciones de amplificación en fase sólida tales como los descritos en las patentes US-7.985.565 y US-7.115.400 se denominan estructuras “con puente” formadas por la hibridación de pares de cadenas polinucleotídicas inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, estando ambas cadenas inmovilizadas en el soporte sólido en el extremo 5', preferiblemente mediante una unión covalente. Las metodologías de amplificación de grupos son ejemplos de métodos en donde para producir amplicones inmovilizados se utiliza un molde de ácido nucleico inmovilizado. También pueden utilizarse otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en la presente descripción. Por ejemplo, pueden formarse uno o más grupos o colonias mediante PCR en fase sólida si uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación se inmovilizan.

En otras realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican en solución. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se escinden o se liberan de otro modo del soporte sólido y los cebadores de amplificación se hibridan a continuación en solución con las moléculas liberadas. En otras realizaciones, los cebadores de amplificación se hibridan con los fragmentos de ADN inmovilizados para una o más etapas de amplificación iniciales, seguidas de etapas de amplificación posteriores en solución. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede usar un molde de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones en fase de solución.

Se apreciará que cualquiera de las metodologías de amplificación descritas en la presente descripción o generalmente conocidas en la técnica pueden utilizarse con cebadores universales o específicos de la diana para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. Como métodos de amplificación adecuados se incluyen, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por transcripción (TMA) y la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), como se describe en la patente US-8.003.354.

Los métodos de amplificación anteriores pueden emplearse para amplificar uno o más ácidos nucleicos de interés. Por ejemplo, la PCR, que incluye PCR múltiple, SDA, TMA, NASBA y similares, puede utilizarse para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. 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 tecnologías de extensión y ligamiento de oligonucleótidos, amplificación por círculo rodante (RCA) [Lizardi y col., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)] y ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (véase de forma general las patentes US-7.582.420, US-5.185.243, 5.679.524 y US-5.573.907; 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 se pueden diseñar para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir amplificación de sonda de ligamiento o reacciones de ensayo de ligamiento 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 de cebador por ligamiento que contiene cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. Como ejemplo no limitativo de extensión de cebadores y cebadores de ligamiento que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores utilizados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, CA) como se ilustra en las patentes US-7.582.420 y US-7.611.869.

Como ejemplos de métodos de amplificación isotérmica que pueden utilizarse en un método de la presente descripción se incluyen, pero sin limitación, Multiple Displacement Amplification (Amplificación de desplazamiento múltiple - MDA) como se ilustra, por ejemplo, en Dean y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 99:5261-66 (2002) o amplificación isotérmica de ácido nucleico por desplazamiento de cadena ilustrada, por ejemplo, en la patente US-6.214.587.

Otros métodos no basados en PCR que pueden utilizarse en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) que se describe, por ejemplo, en Walker y col., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; patentes US-5.455.166 y US-5.130.238, y en Walker y col., Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992) o amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada que se describe, por ejemplo, en Lage y col., Genome Research 13:294-307 (2003).

Para la amplificación aleatoria de cebador de ADN genómico, pueden utilizarse métodos de amplificación isotérmica con la polimerasa Phi 29 de desplazamiento de cadena o el fragmento grande de ADN polimerasa de Bst, exo- 5'->3'. El uso de estas polimerasas aprovecha su alta procesividad y actividad de desplazamiento de cadenas. La alta procesividad permite que las polimerasas produzcan fragmentos que tienen una longitud de 10-20 kb. Como se ha expuesto anteriormente, pueden producirse fragmentos más pequeños en condiciones isotérmicas utilizando polimerasas que tienen baja procesividad y actividad de desplazamiento de cadena tal como la polimerasa Klenow. Se expone una descripción adicional en detalle de las reacciones, condiciones y componentes de amplificación en la descripción de la patente US-7.670.810.

Otro método de amplificación de ácidos nucleicos que es útil en la presente descripción es la PCR con marcaje que utiliza una población de cebadores de dos dominios que tienen una región 5' constante seguida por una región 3' aleatoria como se describe, por ejemplo, en Grothues y col. Nucleic Acids Res. 21(5):1321-2 (1993).

Las primeras rondas de amplificación se llevan a cabo para permitir una multitud de iniciaciones en ADN desnaturalizado por calor basadas en hibridación individual de la región 3' sintetizada al azar. Debido a la naturaleza de la región 3', se contempla que los sitios de iniciación sean aleatorios en todo el genoma. Posteriormente, los cebadores no unidos pueden retirarse y puede producirse una replicación adicional utilizando cebadores complementarios a la región 5' constante.

Métodos de secuenciación

Los métodos descritos en la presente descripción pueden utilizarse junto con una variedad de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Las técnicas particularmente aplicables son aquellas en donde los ácidos nucleicos se fijan en ubicaciones fijas en una matriz, de manera que sus posiciones relativas no cambien, y en donde se obtienen imágenes de la matriz de manera repetida. Son particularmente aplicables las realizaciones en las que se obtienen imágenes en diferentes canales de color, por ejemplo, coincidiendo con diferentes marcadores utilizados para distinguir un tipo de base de nucleótido de otro. En algunas realizaciones, el proceso para determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede ser un proceso automatizado. Las realizaciones preferidas incluyen técnicas de secuenciación por síntesis ("SBS").

Las técnicas de SBS generalmente implican la extensión enzimática de una cadena de ácido nucleico en formación mediante la adición iterativa de nucleótidos frente a una cadena molde. En los métodos tradicionales de SBS, en cada suministro, puede proporcionarse un monómero de un solo nucleótido a un nucleótido diana en presencia de una polimerasa. Sin embargo, en los métodos descritos en la presente descripción, en un suministro puede proporcionarse más de un tipo de monómero nucleotídico a un ácido nucleico diana en presencia de una polimerasa.

La SBS puede utilizar monómeros de nucleótidos que tienen un resto terminador o aquellos que carecen de restos terminadores. Los métodos que utilizan monómeros de nucleótidos que carecen de terminadores incluyen, por ejemplo, pirosecuenciación y secuenciación utilizando nucleótidos marcados con γ -fosfato, como se expone con más detalle a continuación. En los métodos en los cuales se utilizan monómeros de nucleótidos que carecen de terminadores, el número de nucleótidos añadidos en cada ciclo es generalmente variable y depende de la secuencia molde y del modo de suministro de los nucleótidos. Para las técnicas de SBS que utilizan monómeros de nucleótidos que tienen un resto terminador, el terminador puede ser efectivamente irreversible en las condiciones de secuenciación utilizadas como es el caso de la secuenciación tradicional de Sanger que utiliza didesoxinucleótidos, o el terminador puede ser reversible como es el caso de los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (ahora Illumina, Inc.).

Las técnicas de SBS pueden utilizar monómeros de nucleótidos que tengan un resto marcador o que carezcan de este. Por consiguiente, pueden detectarse acontecimientos de incorporación basándose en una característica del marcador, tal como fluorescencia del marcador; una característica del monómero nucleotídico, tal como la carga o el peso molecular; un subproducto de incorporación del nucleótido, tal como la liberación de pirofosfato; o similares. En las realizaciones, donde están presentes dos o más nucleótidos diferentes en un reactivo de secuenciación, los diferentes nucleótidos pueden distinguirse entre sí o, como alternativa, los dos o más marcadores diferentes pueden ser indistinguibles según las técnicas de detección que se utilizan. Por ejemplo, los diferentes nucleótidos presentes en un reactivo de secuenciación, pueden tener diferentes marcadores y se pueden distinguir usando ópticas apropiadas como se ilustra mediante los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (ahora Illumina, Inc.).

Las realizaciones preferidas incluyen técnicas de pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en la cadena en formación (Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. y Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release". *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing". *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. y Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate". *Science* 281(5375), 363; patentes US-6.210.891; patentes US-6.258.568 y la patente US-6.274.320. En la pirosecuenciación, el PPi liberado puede detectarse convirtiéndolo inmediatamente en adenosín trifosfato (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado se detecta mediante fotones producidos por luciferasa. Los ácidos nucleicos que se van a secuenciar se pueden fijar a las casillas de una matriz y se pueden obtener imágenes de la matriz para capturar las señales quimioluminiscentes que se producen debido a la incorporación de nucleótidos en las casillas de la matriz. Puede obtenerse una imagen después de que la matriz se trate con un tipo de nucleótido particular (por ejemplo, A, T, C o G). Las imágenes obtenidas después de la adición de cada tipo de nucleótido diferirán con respecto a las casillas de la matriz que se detecten. Estas diferencias en la imagen reflejan el contenido de secuencia diferente de las casillas en la matriz. Sin embargo, las ubicaciones relativas de cada casilla permanecerán sin cambios en las imágenes. Las imágenes pueden almacenarse, procesarse y analizarse utilizando los métodos expuestos en la presente descripción. Por ejemplo, las imágenes obtenidas después del tratamiento de la matriz con cada tipo de nucleótido diferente se pueden manejar de la misma manera que se ilustra en la presente descripción para imágenes obtenidas de diferentes canales de detección para métodos de secuenciación basados en terminadores reversibles.

En otro tipo ilustrativo de SBS, la secuenciación del ciclo se logra mediante la adición escalonada de nucleótidos terminadores reversibles que contienen, por ejemplo, un marcador de colorante escindible o fotoblanqueable como se describe, por ejemplo, en el documento WO 04/018497 y en la patente US-7.057.026.

Este enfoque está siendo comercializado por Solexa (ahora Illumina Inc.), y también se describe en los documentos WO 91/06678 y WO 07/123.744.

La disponibilidad de terminadores marcados con fluorescencia, en los cuales se puede invertir tanto la terminación como escindir el marcador fluorescente, facilita la secuenciación eficaz de la terminación cíclica reversible (CRT). Las polimerasas también pueden diseñarse conjuntamente para incorporar y extenderse eficazmente a partir de estos nucleótidos modificados.

Preferiblemente, en realizaciones de secuenciación basadas en terminadores reversibles, los marcadores no inhiben sustancialmente la extensión en las condiciones de reacción de SBS. Sin embargo, los marcadores de detección pueden eliminarse, por ejemplo, mediante escisión o degradación. Las imágenes pueden capturarse después de la incorporación de marcadores en las casillas de ácidos nucleicos de la matriz. En realizaciones particulares, cada ciclo implica el suministro simultáneo de cuatro tipos de nucleótidos diferentes a la matriz y cada tipo de nucleótido tiene un marcador espectralmente distinto. A continuación, se pueden obtener cuatro imágenes, cada una de las cuales utiliza un canal de detección que es selectivo para uno de los cuatro marcadores diferentes. Como alternativa, se pueden añadir secuencialmente diferentes tipos de nucleótidos y se puede obtener una imagen de la matriz entre cada etapa de adición. En dichas realizaciones, cada imagen mostrará casillas de ácido nucleico que han incorporado nucleótidos de un tipo particular. En las diferentes imágenes habrá o no diferentes casillas debido al diferente contenido de secuencia de cada casilla. Sin embargo, la posición relativa de las casillas permanecerá sin cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de dichos métodos de SBS con terminador reversible pueden almacenarse, procesarse y analizarse como se expone en la presente descripción. Después de la etapa de captura de imágenes, los marcadores se pueden eliminar y los restos terminadores reversibles se pueden eliminar para los ciclos posteriores de adición y detección de nucleótidos. La eliminación de los marcadores después de que se hayan detectado en un ciclo particular y antes de un ciclo posterior, puede proporcionar la ventaja de reducir la señal de fondo y la diafonía entre ciclos. A continuación se exponen ejemplos de marcadores útiles y de métodos de eliminación.

En realizaciones particulares, algunos o todos los monómeros de nucleótidos pueden incluir terminadores reversibles. En tales realizaciones, los terminadores reversibles/compuestos de flúor escindibles pueden incluir flúor unido al resto de ribosa mediante un enlace éster 3' (Metzker, *Genome Res.* 15:1767-1776 (2005)). Otros enfoques han separado la química del terminador de la escisión del marcador de fluorescencia (Ruparel y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5932-7 (2005)).

Ruparel y col., describieron el desarrollo de terminadores reversibles que utilizaban un pequeño grupo alilo 3' para bloquear la extensión, pero podían desbloquearse fácilmente mediante un tratamiento corto con un catalizador de paladio. El fluoróforo se unió a la base mediante un enlazador fotoescindible que podía escindirse fácilmente mediante una exposición de 30 segundos a luz UV de longitud de onda larga. Por tanto, como un enlazador escindible, puede utilizarse la reducción de disulfuro o la fotoescisión. Otro enfoque de la terminación reversible es el uso de la terminación natural que se produce después de la colocación de un colorante voluminoso en un dNTP. La presencia de un colorante voluminoso cargado en el dNTP puede actuar como un terminador eficaz a través de un impedimento estérico y/o electrostático. La presencia de un acontecimiento de incorporación impide otras incorporaciones a menos que se elimine el colorante. La división del tinte elimina el flúor e invierte eficazmente la terminación. También se describen ejemplos de nucleótidos modificados en la patente US-7.427.673, y la patente US-7.057.026.

Los sistemas y métodos de SBS ilustrativos adicionales que pueden utilizarse con los métodos y sistemas descritos en la presente descripción se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0166705, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0188901, la patente US-7.057.026, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0240439, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0281109, la publicación PCT n.º WO 05/065814, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0100900, la publicación PCT n.º WO 06/064199, la publicación PCT n.º WO 07/010.251, la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0270305 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0260372, 2013/026372.

Algunas realizaciones pueden utilizar la detección de cuatro nucleótidos diferentes usando menos de cuatro marcadores diferentes. Por ejemplo, la SBS puede realizarse utilizando métodos y sistemas descritos en los materiales incorporados de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0079232. Como primer ejemplo, puede detectarse un par de tipos de nucleótidos en la misma longitud de onda, pero distinguirse en función de la diferencia de intensidad de un miembro del par en comparación con el otro, o en función de un cambio en un miembro del par (por ejemplo, mediante modificación química, modificación fotoquímica o modificación física) que hace que aparezca o desaparezca una señal aparente en comparación con la señal detectada para el otro miembro del par. Como segundo ejemplo, pueden detectarse tres de los cuatro tipos de nucleótidos diferentes en condiciones particulares, mientras que un cuarto tipo de nucleótido carece de un marcador que sea detectable en esas condiciones, o se detecta mínimamente en esas condiciones (por ejemplo, detección mínima debido a la fluorescencia de fondo, etc.). La incorporación de los primeros tres tipos de nucleótidos en un ácido nucleico se puede determinar basándose en la presencia de sus respectivas señales y la incorporación del cuarto tipo de nucleótidos en el ácido nucleico se puede determinar basándose en la ausencia o detección mínima de cualquier señal. Como un tercer ejemplo, un tipo de nucleótidos puede incluir un(os) marcador(es) que se detecta(n) en dos canales diferentes, mientras que otros tipos de nucleótidos se detectan en no más de uno de los canales. Las tres configuraciones ilustrativas mencionadas anteriormente no se consideran mutuamente excluyentes y pueden usarse en varias combinaciones. Una realización ilustrativa que combina los tres ejemplos es un método de SBS basado en fluorescencia que usa un primer tipo de nucleótido que se detecta en un primer canal (por ejemplo, dATP que tiene un marcador que se detecta en el primer canal cuando se excita con una primera longitud de onda de excitación), un segundo tipo de nucleótido que se detecta en un segundo canal (por ejemplo, dCTP que tiene un marcador que se detecta en el segundo canal cuando se excita con una segunda longitud de onda de excitación), un tercer tipo de nucleótido que se detecta tanto en el primer como

en el segundo canal (por ejemplo, dTTP que tiene al menos un marcador que se detecta en ambos canales cuando se excita con la primera y/o segunda longitud de onda de excitación) y un cuarto tipo de nucleótido que carece de un marcador que no se detecta, o se detecta mínimamente, en ninguno de los canales (por ejemplo, dGTP sin marcador).

5 Además, como se describe en los materiales incorporados de la publicación de patente estadounidense n.º 2013/0079232, los datos de secuenciación pueden obtenerse utilizando un único canal. En los llamados enfoques de secuenciación de un colorante, el primer tipo de nucleótido se marca pero el marcador se elimina después de que se genere la primera imagen, y el segundo tipo de nucleótido se marca solo después de que se genere una primera imagen. El tercer tipo de nucleótido conserva su marcador tanto en la primera como en la segunda imagen, y el cuarto tipo de nucleótido permanece sin marcar en ambas imágenes.

15 Algunas realizaciones pueden utilizar secuenciación mediante técnicas de ligamiento. Tales técnicas utilizan ADN ligasa para incorporar oligonucleótidos e identificar la incorporación de tales oligonucleótidos. Los oligonucleótidos tienen normalmente diferentes marcadores que se correlacionan con la identidad de un nucleótido particular en una secuencia con la que hibridan los oligonucleótidos. Al igual que con otros métodos de SBS, se pueden obtener imágenes después del tratamiento de una matriz de casillas de ácidos nucleicos con los reactivos de secuenciación marcados. Cada imagen mostrará casillas de ácido nucleico que hayan incorporado marcadores de un tipo particular. En las diferentes imágenes habrá o no diferentes casillas debido al diferente contenido de secuencia de cada casilla, pero la posición relativa de las casillas permanecerá sin cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de métodos de secuenciación basados en ligamiento se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente descripción. Sistemas y métodos de SBS ilustrativos que pueden utilizarse con los métodos y sistemas descritos en la presente descripción se describen en la patente US-6.969.488, la patente US-6.172.218, y la patente US-6.306.597.

25 Algunas realizaciones pueden utilizar la secuenciación de nanoporos (Deamer, D. W. y Akesson, M. "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing". Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer, D. y D. Branton, "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis". Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002); Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin y J. A. Golovchenko, "DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope" Nat. Mater. 2:611-615 (2003)). En tales realizaciones, el ácido nucleico objetivo pasa a través de un nanoporo. El nanoporo puede ser un poro sintético o una proteína de membrana biológica, tal como la α -hemolisina. Cuando el ácido nucleico diana pasa a través del nanoporo, cada par de bases puede identificarse midiendo las fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro. (US-7.001.792; Soni, G. V. & Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores". Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis". Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft, S. L., Chu, J., Amorin, M. & Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution". J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 [2008]). Los datos obtenidos de la secuenciación de nanoporos se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente descripción. En particular, los datos se pueden tratar como una imagen según el tratamiento ilustrativo de imágenes ópticas y otras imágenes que se expone en la presente descripción.

40 Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que suponen la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse mediante interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa portadora de fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato como se describe, por ejemplo, en la patente US-7.329.492 y la patente US-7.211.414 o las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse con guías de onda en modo cero como se describe, por ejemplo, en la patente US-7.315.019 y utilizando análogos de nucleótidos fluorescentes y polimerasas diseñadas mediante ingeniería como se describe, por ejemplo, en la patente US-7.405.281 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0108082.

50 La iluminación se puede restringir a un volumen a escala de zeptolitros alrededor de una polimerasa anclada a la superficie, de modo que se pueda observar la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia con un fondo bajo (Levene, M. J. y col. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations". Science 299, 682-686 (2003); Lundquist, P. M. y col. "Parallel confocal detection of single molecules in real time". Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008); Korlach, J. y col. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures". Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 105, 1176-1181 [2008]).

Las imágenes obtenidas de dichos métodos se pueden almacenar, procesar y analizar tal como se expone en la presente descripción.

60 Algunas realizaciones de SBS (secuenciación por síntesis) 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 usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que son comercializados por Ion Torrent (Guilford, CT, una subsidiaria de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en los documentos US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; o US 2010/028617 A1.

65

Los métodos expuestos en la presente descripción para amplificar ácidos nucleicos diana utilizando exclusión cinética pueden aplicarse fácilmente a sustratos utilizados para detectar protones. Más específicamente, los métodos expuestos en la presente descripción pueden utilizarse para producir poblaciones clonales de amplicones que se utilizan para detectar protones.

Los métodos de SBS anteriores se pueden llevar a cabo ventajosamente en formatos multiplexados de modo que se manipulen simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana diferentes. En realizaciones particulares, se pueden tratar diferentes ácidos nucleicos diana en un recipiente de reacción común o en una superficie de un sustrato particular. Esto permite el suministro conveniente de reactivos de secuenciación, la eliminación de reactivos que no han reaccionado y la detección de acontecimientos de incorporación de manera multiplexada. En realizaciones que usan ácidos nucleicos diana unidos a la superficie, los ácidos nucleicos diana pueden estar en un formato de matriz. En un formato de matriz, los ácidos nucleicos diana pueden unirse normalmente a una superficie de una manera espacialmente distinguible. Los ácidos nucleicos diana pueden unirse mediante unión covalente directa, unión a una perla u otra partícula o unión a una polimerasa u otra molécula que esté unida a la superficie. La matriz puede incluir una única copia de un ácido nucleico diana en cada sitio (también denominado como una característica) o pueden estar presentes múltiples copias que tienen la misma secuencia en cada sitio o característica. Pueden producirse múltiples copias mediante métodos de amplificación tales como amplificación en puente o PCR en emulsión, como se describe con más detalle a continuación.

Los métodos expuestos en la presente descripción pueden usar matrices que tienen características en cualquiera de una variedad de densidades que incluyen, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 características/cm², 100 características/cm², 500 características/cm², 1000 características/cm², 5000 características/cm², 10.000 características/cm², 50.000 características/cm², 100.000 características/cm², 1.000.000 características/cm², 5.000.000 características/cm² o superior.

Una ventaja de los métodos expuestos en la presente descripción es que proporcionan una detección rápida y eficiente de una pluralidad de ácidos nucleicos diana en paralelo. Por consiguiente, la presente descripción proporciona sistemas integrados capaces de preparar y detectar ácidos nucleicos usando técnicas conocidas en la materia tales como las ilustradas anteriormente. Por tanto, un sistema integrado de la presente descripción puede incluir componentes fluidicos capaces de administrar reactivos de amplificación y/o reactivos de secuenciación a uno o más fragmentos de ADN inmovilizados, comprendiendo el sistema componentes tales como bombas, válvulas, depósitos, líneas fluidicas y similares. En un sistema integrado para la detección de ácidos nucleicos diana puede configurarse y/o utilizarse una cubeta de lectura. Se describen cubetas de lectura ilustrativas, por ejemplo, en el documento US 2010/0111768 A1.

Como se ilustra en las cubetas de lectura, puede utilizarse uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado para un método de amplificación y para un método de detección. Tomando como ejemplo una realización de secuenciación de ácidos nucleicos, puede utilizarse uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado para un método de amplificación expuesto en la presente descripción y para el suministro de reactivos de secuenciación en un método de secuenciación como en los ilustrados anteriormente. Como alternativa, un sistema integrado puede incluir sistemas fluidicos distintos para llevar a cabo métodos de amplificación y para llevar a cabo métodos de detección. Como ejemplos de sistemas de secuenciación integrados que son capaces de crear ácidos nucleicos amplificados y también de determinar la secuencia de los ácidos nucleicos se incluyen, sin limitación, la plataforma MiSeq™ (Illumina, Inc., San Diego, CA) y los dispositivos asociados.

En los métodos y composiciones presentados en la presente descripción, los polinucleótidos se inmovilizan en el soporte sólido. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se inmovilizan covalentemente al soporte. Cuando se hace referencia a la inmovilización de moléculas (p. ej., ácidos nucleicos) a un soporte sólido, los términos “inmovilizado” y “unido” se usan indistintamente en la presente descripción y se pretende que ambos términos abarquen la unión directa o indirecta, covalente o no covalente, salvo que se indique lo contrario, ya sea de forma explícita o por el contexto. En determinadas realizaciones de la invención, se puede preferir una unión covalente, pero generalmente todo lo que se requiere es que las moléculas (p. ej., ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas al soporte en las condiciones en las que se pretende usar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieren la amplificación y/o secuenciación de ácidos nucleicos.

Determinadas realizaciones de la invención pueden utilizar soportes sólidos compuestos por un sustrato o matriz inerte (p. ej., portaobjetos de vidrio, perlas de polímero, etc.) que se han “funcionalizado”, por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o recubrimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente a biomoléculas, tales como polinucleótidos. Los ejemplos de dichos soportes incluyen, pero sin limitación, hidrogeles de poliacrilamida sostenidos sobre un sustrato inerte tal como vidrio, particularmente hidrogeles de poliacrilamida como se describe en los documentos WO 2005/065814 y US 2008/0280773.

En dichas realizaciones, las biomoléculas (p. ej., polinucleótidos) pueden estar unidas directamente de manera covalente al material intermedio (p. ej., al hidrogel), pero el propio material intermedio puede estar unido de manera no covalente al sustrato o matriz (p. ej., al sustrato de vidrio). Por consiguiente, la expresión “unión covalente a un soporte sólido” debe interpretarse como que abarca este tipo de disposición.

Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen, por ejemplo, los que resultan del uso de técnicas químicas de clic. Los ejemplos de enlaces no covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacciones no específicas (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones de van der Waals, etc.) o interacciones específicas (por ejemplo, interacciones de afinidad, interacciones receptor-ligando, interacciones anticuerpo-epítipo, interacciones avidina-biotina, interacciones de estreptavidina-biotina, interacciones de lectina-hidrato de carbono, etc.). Los enlaces ilustrativos se exponen en las patentes US-6.737.236; US-7.259.258; US-7.375.234 y US-7.427.678; y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0059865 A1.

Las expresiones “ácido nucleico diana”, “molécula de ácido nucleico diana”, “especie de ácido nucleico diana” y cualquier equivalente gramatical de las mismas, se refieren a moléculas de ácido nucleico que se desea detectar, secuenciar o analizar de otro modo. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de moléculas de ácido nucleico deseadas, que incluyen, pero no se limitan a, exones o moléculas de ácido nucleico complementarias a los mismos; moléculas de ADNc o moléculas de ácido nucleico complementarias a las mismas; regiones no traducidas (UTR) o ácidos nucleicos complementarios a las mismas; regiones promotoras y/o potenciadoras, o moléculas de ácido nucleico complementarias a las mismas; regiones conservadas evolutivamente (ECR), o moléculas de ácido nucleico complementarias a las mismas; regiones genómicas transcritas, o moléculas de ácido nucleico complementarias a las mismas. Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos para obtener moléculas de ácido nucleico específicas, como se describe en la presente descripción. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, la obtención de una molécula de ácido nucleico diana mediante hibridación-extensión, captura y enriquecimiento; el uso de sitios de restricción específicos, por ejemplo, el uso de un oligonucleótido diseñado con una horquilla que tiene un sitio de enzima de restricción de tipo IIS, tal como un sitio de enzima de restricción FokI y una región específica del locus; el uso de la amplificación por círculo rodante hiperramificado específico del locus; el uso de la amplificación por cebadores específicos de un locus aleatorio; el uso de PCR en emulsión multiplex; el uso de PCR de puente multiplex; el uso de la amplificación de sonda de candado; y el uso de minibibliotecas de bibliotecas específicas, como se divulga en la presente descripción.

Tal como se usan en la presente descripción, las expresiones “secuencia de ácido nucleico diana”, “secuencia de ácido nucleico de muestra” y expresiones similares se refieren a secuencias de ácido nucleico obtenidas de muestras que se desean analizar.

Una muestra de ácido nucleico que se amplifica, secuenciar o manipula de otro modo en un método descrito en la presente descripción puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. Las especies de ADN de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ADN genómico (ADNg), ADN mitocondrial, ADN de cloroplasto, ADN episómico, ADN viral y copias de ADN (ADNc). Un ejemplo no limitante de un subconjunto de ADN genómico es un cromosoma particular o una región de un cromosoma particular. Las especies de ARN de ejemplo incluyen, sin limitación, ARN codificante tal como ARN mensajero (ARNm) y ARN no codificante (ARNnc) tal como ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN), ARN nuclear pequeño (ARNnp) y ARN ribosómico (ARNr). Otras especies de ADN o ARN incluyen fragmentos o porciones de las especies enumeradas anteriormente o productos amplificados derivados de estas especies, fragmentos de las mismas o porciones de las mismas. Los métodos descritos en la presente descripción son aplicables a las especies anteriores que abarcan todo o parte del complemento presente en una célula. Por ejemplo, usando los métodos descritos en la presente descripción, se puede determinar la secuencia de un genoma sustancialmente completo o se puede determinar la secuencia de secuencias de ácido nucleico diana sustancialmente completas, como ARNm o ADNc complemento de una célula.

Pueden prepararse moléculas de ADN diana de secuencia diferente mezclando un número, mayor de uno, de moléculas de ADN individuales. En el procedimiento preferido, el ADN genómico está fragmentado en moléculas pequeñas, preferiblemente menores de 1000 pares de bases de longitud. La fragmentación del ADN puede conseguirse mediante diversos métodos incluyendo: digestión enzimática, escisión química, sonicación, nebulización o hidrocizamiento, preferiblemente nebulización.

Las secuencias conocidas se pueden añadir a los extremos 3' y 5' de las secuencias de ácido nucleico diana usando cualquiera de las diversas metodologías conocidas en la técnica, como se ilustra, por ejemplo, en las patentes US-7.741.463, US-7.985.565 y US-7.115.400.

Por ejemplo, en algunos casos, las secuencias conocidas se añaden ligando adaptadores a fragmentos de ácido nucleico. En algunos casos, las secuencias conocidas se añaden mediante amplificación usando cebadores que tienen una secuencia conocida adicional en sus extremos 5'. En algunos casos, las secuencias conocidas pueden comprender secuencias que son idénticas o complementarias a los cebadores de amplificación inmovilizados sobre un soporte sólido. Por ejemplo, en ciertos casos, la secuencia conocida puede incluir una de las dos regiones de captura universales, tales como las regiones P5 o P7. Una región P5 incluye la secuencia de nucleótidos 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'. Una región P7 incluye la secuencia de nucleótidos 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'. En ciertas realizaciones, la secuencia conocida es el complemento inverso de la secuencia de la región P5 (“anti-P5”: 5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3') o la secuencia de la región P7 (“anti-P7”: 5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3') del cebador de amplificación. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede hibridarse con los cebadores de amplificación P5 (extremo emparejado) (5'-AATGATACGGCGACCAGAUCTACAC-

3') o P7 (extremo emparejado) (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA (8-oxo-G) AT-3'). En ciertas realizaciones, el oligonucleótido puede hibridarse con el complemento inverso del cebador de captura P5 (extremo emparejado) de Illumina[®] ("anti-P5 (extremo emparejado)": 5'-GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGATCATT-3') o P7 (extremo emparejado) ("anti-P7 (extremo emparejado)": 5'-ATCTCGTATGCCGTCTCTG-3').

Las expresiones "superficie sólida", "soporte sólido" y otros equivalentes gramaticales en la presente descripción se refieren a cualquier material que sea adecuado o pueda modificarse de modo que sea adecuado para la unión de los complejos transposómicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de sustratos posibles es muy grande. Posibles sustratos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon[™], etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, cerámicas, resinas, sílice o materiales basados en sílice que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas y una variedad de otros polímeros. Los soportes sólidos y superficies sólidas especialmente útiles para algunas realizaciones están situados dentro de un aparato de celda de flujo. A continuación se exponen celdas de flujo ilustrativas con mayor detalle.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una superficie con patrones adecuada para la inmovilización de complejos transposómicos en un patrón ordenado. Una "superficie con patrones" se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un soporte sólido. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser características donde haya uno o más complejos transposómicos. Las características pueden estar separadas por regiones intersticiales donde no haya complejos transposómicos. En algunas realizaciones, el patrón puede ser un formato de casillas x-y que estén en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición repetitiva de casillas y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición aleatoria de casillas y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, los complejos transposómicos se distribuyen aleatoriamente sobre el soporte sólido. En algunas realizaciones, los complejos transposómicos se distribuyen en una superficie con patrones. Se describen superficies con patrones ilustrativas que pueden utilizarse en los métodos y composiciones expuestos en la presente descripción en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0316086 A1.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una matriz de pocillos o surcos en una superficie. Este puede fabricarse, como se sabe generalmente en la técnica, utilizando una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica utilizada dependerá de la composición y forma del sustrato de la matriz.

La composición y la geometría del soporte sólido pueden variar con su uso. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una estructura plana, tal como un portaobjetos, un chip, un microchip y/o una matriz. Como tal, la superficie de un sustrato puede tener la forma de una capa plana. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una o más superficies de una cubeta de lectura. El término "cubeta de lectura", como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una cámara que comprende una superficie sólida a través de la cual pueden fluir uno o más reactivos líquidos. Se describen ejemplos de cubetas de lectura y de sistemas fluidos y plataformas de detección relacionados que pueden utilizarse fácilmente en los métodos de la presente descripción, por ejemplo, en Bentley y col., Nature 456:53-59 (2008), documentos 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.

En algunas realizaciones, el soporte sólido o su superficie no forma un plano, tal como la superficie interna o externa de un tubo o un recipiente. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende microesferas o perlas. Por "microesferas" o "perlas" o "partículas" o equivalentes gramaticales se entiende en la presente descripción partículas discretas pequeñas. Las composiciones de perlas adecuadas incluyen, pero sin limitación, plástico, cerámica, vidrio, poliestireno, metilmetacrilato, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de toria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados, tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y teflón, así como cualquier otro material indicado en la presente descripción para soportes sólidos. La "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers Ind. es una guía útil. En determinadas realizaciones, las microesferas son microesferas o perlas magnéticas.

Las perlas no tienen por qué ser esféricas; pueden utilizarse partículas irregulares. De forma alternativa o adicional, las perlas pueden ser porosas. Los tamaños de las perlas varían de nanómetros, es decir, 100 nm, a milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose las perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, prefiriéndose particularmente las de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones pueden utilizarse perlas más pequeñas o más grandes.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la amplificación en fase sólida según una realización, tal como se ilustra en la figura 1. Se usó una biblioteca PhiX o CT418 universal estándar que contenía las regiones P5 y P7' para unir el P5' adicional en el extremo 5' de la biblioteca ya preparada. Esto se logró realizando 18 ciclos de PCR adicionales. Las bibliotecas se diluyeron hasta 200 pM final y se amplificaron usando un cebador estándar o un cebador P7-P5'. Cada reacción de PCR de 50 µl contenía 22 µl de H₂O, 25 µl de 2X Phusion Mastermix (NEB), 1 µl de cada uno de los cebadores y ADN

apropiados. Tras la PCR, las concentraciones de la biblioteca resultante se determinaron con el Nanodrop (Thermo Scientific) y se diluyeron a 10 nM en el tampón EB (QIAGEN) + Tween20 al 0,05 %. Se preparó una cubeta de lectura injertando cebadores HEG (carriles 1-4) o cebadores PE estándar (carriles 5-8) usando el protocolo descrito en las patentes US-8.536.477, US-8.715.966 y en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0280773, cuyo contenido se incorpora por referencia en la presente descripción en su totalidad. Las bibliotecas generadas anteriormente se usaron para generar grupos en la cubeta de lectura injertada.

Los grupos se amplificaron utilizando el kit de generación de grupos TruSeq para Genome Analyzer (Illumina) según el protocolo recomendado por el fabricante durante 35 ciclos. La cubeta de lectura se tiñó con SYBR Green (Molecular Probes) y se obtuvieron imágenes en un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en el panel superior de la figura 4A, los grupos generados con cebadores estándar dieron como resultado grupos normales, mientras que lo mismo con cebadores adicionales modificados con P5 dio como resultado una mezcla de grupos grandes y normales (panel inferior de la figura 4A). Los gráficos del número de grupos frente a la intensidad de la señal de SYBR de las cubetas de lectura descritas en la figura 4A se muestran en la figura 4B. Los grupos de cebadores estándar dieron como resultado una baja intensidad de SYBR (gráfico superior), mientras que los de cebadores modificados con P5 añadido dieron como resultado una intensidad 10 veces mayor (gráfico inferior).

La cubeta de lectura se preparó entonces para realizar un primer ciclo de incorporación de secuenciación, usando un conjunto de fluoróforos de luz blanca. Las imágenes del primer ciclo de C, T y G con la escala de grises de la imagen ajustada al brillo de la imagen T en el carril de cebador modificado mostraron que los grupos que utilizan los cebadores modificados son más brillantes que los grupos formados con cebadores estándar. (Fig. 5)

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la amplificación en fase sólida según una realización, tal como se ilustra en la figura 3. Los experimentos descritos en la figura 6 muestran los resultados de la concatemerización de los enlazadores 20T/A en los cebadores de injerto P5/P7 (denominados 20T-P7/20A-P5) en lugar de unir los cebadores facilitadores del concatémero a la biblioteca durante el proceso de PCR. En este experimento, la cubeta de lectura se injertó con cebadores P5/P7 de extremos emparejados 20A/T junto con cebadores estándar. Se siguió el protocolo de injerto estándar descrito en los materiales incorporados de las patentes US-8.536.477, US-8.715.966 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0280773 y esta cubeta de lectura injertada se utilizó para la amplificación de grupo en un sistema de amplificación clonal cBot (Illumina Cat n.º SY-301-2002) utilizando el kit de generación de grupos TruSeq para Genome Analyzer (Illumina) según el protocolo recomendado por el fabricante. Se usaron bibliotecas CT418 como molde; se amplificaron 105 ciclos a 60 °C. La cubeta de lectura se tiñó con SYBR Green y se obtuvieron imágenes como se describe en la figura 4. Los gráficos del número de grupos frente a la intensidad de la señal de SYBR mostraron que al utilizar cebadores de superficie 20T-P7/20A-P5 (6A), el brillo del grupo aumentó en comparación con los cebadores de superficie estándar (6B). Sin embargo, se observaron menos grupos con mayor intensidad en comparación con el ejemplo dado en las figuras 4 y 5.

Efecto de la temperatura en la intensidad del grupo: Se probaron intervalos de temperatura de 50 °C a 60 °C y ciclos de amplificación que varían de 25 a 45 para la generación de grupos. El injerto de la cubeta de lectura y el procedimiento del experimento fueron los descritos anteriormente para la figura 6, excepto que se probaron temperaturas de 50 y 55 °C para la amplificación de grupo durante 35 o 45 ciclos. Como se muestra en la figura 7, los cebadores de superficie 20T/20A amplificados a 50 °C y teñidos con SYBR Green mostraron que los grupos de 20T/20A son de 3 a 5 veces más brillantes que aquellos con cebadores de superficie estándar (7A). El diámetro del grupo permaneció igual para los cebadores de superficie 20T/20A y los cebadores estándar (7B). Las bibliotecas utilizadas fueron PhiX de 1, 9 y 18 pM y CT418 de 1 pM. Los inventores descubrieron que a temperaturas iguales o inferiores a 55 °C y la amplificación de 45 ciclos daba como resultado grupos más brillantes utilizando cebadores 20T/20A en comparación con los cebadores estándar. El aumento de la concentración de la polimerasa Bst junto con el aumento de los tiempos de extensión a 72 segundos desde los 36 segundos estándar utilizados durante la amplificación en puente también dio como resultado grupos más brillantes cuando se usaron cebadores de 20T/20A en comparación con los grupos estándar (datos no mostrados).

La figura 8 es una comparación en paralelo de la intensidad de los grupos con respecto al número de ciclos durante un experimento de secuenciación estándar de 100 ciclos en un GA, que muestra que la intensidad de los grupos de cebadores 20T-P7/20A-P5 al final de un experimento de secuenciación de 100 ciclos es similar a la intensidad de los grupos con cebadores estándar al inicio de la serie.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar moldes inmovilizados para una reacción de secuenciación de ácido nucleico que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido que tiene un cebador de amplificación directo e inverso inmovilizado en el mismo;
 (b) proporcionar un ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana comprende:

(i) una primera región de secuencia conocida complementaria a la del cebador de amplificación directo;
 (ii) una primera región molde;
 (iii) una segunda región de secuencia conocida sustancialmente idéntica a la del cebador de amplificación inverso, en donde la primera región molde está entre la primera región de secuencia conocida y la segunda región de secuencia conocida; y
 (iv) una tercera región de secuencia conocida complementaria a la del cebador de amplificación directo, en donde la primera región molde y la segunda región de secuencia conocida están entre la primera región de secuencia conocida y la tercera región de secuencia conocida;

(c) aplicar el ácido nucleico diana al soporte sólido en condiciones adecuadas para la hibridación, de modo que la primera región de secuencia conocida se hibrida con el cebador de amplificación directo;
 (d) extender el cebador de amplificación directo hibridado para generar un primer molde inmovilizado que comprende una copia complementaria del ácido nucleico diana;
 (e) desnaturalizar el ácido nucleico diana del primer molde inmovilizado;
 (f) hibridar el primer molde inmovilizado con el cebador de amplificación inverso, de modo que una copia complementaria de la segunda región de secuencia conocida se hibrida con el cebador de amplificación inverso; y
 (g) extender el cebador de amplificación inverso hibridado para generar una segunda cadena inmovilizada que comprende la primera región molde situada entre la primera región de secuencia conocida y la segunda región de secuencia conocida;
 (h) desnaturalizar la segunda cadena inmovilizada del primer molde inmovilizado;
 (i) hibridar la segunda cadena inmovilizada con el primer molde inmovilizado, de modo que la primera región de secuencia conocida de la segunda cadena inmovilizada se hibrida con una copia complementaria de la tercera región de secuencia conocida en el molde inmovilizado;
 (j) extender un OH 3' de la primera región de secuencia conocida para generar un concatémero de la segunda cadena inmovilizada; y
 (k) extender un OH 3' de la copia complementaria de la tercera región de secuencia conocida para generar un concatémero del primer molde inmovilizado.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

(1) desnaturalizar los concatémeros y repetir las etapas (i), (j) y (k) para generar más concatémeros de cada cadena.

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el cebador de amplificación directo comprende una región de complementariedad directa, teniendo dicha región de complementariedad directa complementariedad con una región de complementariedad inversa del cebador de amplificación inverso.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la región de complementariedad directa está situada directamente en 5' de una región que tiene complementariedad con la primera región de secuencia conocida del ácido nucleico diana; y/o

en donde la región de complementariedad inversa está situada directamente en 5' de una región que tiene una secuencia sustancialmente idéntica a la segunda región de secuencia conocida del ácido nucleico diana; y/o
 en donde la región de complementariedad directa y la región de complementariedad inversa están configuradas de tal manera que los ciclos repetidos de hibridación y extensión producen un concatémero de la primera cadena inmovilizada, cada copia del concatémero está separada de la siguiente por la secuencia de la región de complementariedad directa y/o
 en donde la región de complementariedad directa y la región de complementariedad inversa están configuradas de manera que los ciclos repetidos de hibridación y extensión producen un concatémero de la segunda cadena inmovilizada, cada copia del concatémero está separada de la siguiente por la secuencia de la región de complementariedad inversa.

ES 2 984 193 T3

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dichos concatémoros comprenden múltiples copias de dicha molécula de ácido nucleico diana de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o al menos 10.000 copias.
- 5 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho soporte sólido es plano; o en donde dicho soporte sólido comprende micropocillos o perlas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho ácido nucleico diana tiene una longitud de al menos 10, 20, 50, 100, 200 o de al menos 500 nucleótidos.
- 10 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico diana comprende además una cuarta región de secuencia conocida sustancialmente idéntica a la del cebador de amplificación inverso, en donde la primera región de secuencia conocida, la primera región molde y la segunda región de secuencia conocida están entre la tercera región de secuencia conocida y la cuarta región de secuencia conocida.
- 15 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cebador de amplificación directo comprende un resto enlazador químico no nucleotídico situado para impedir la copia de cualquier nucleótido que esté en 5' del resto enlazador químico no nucleotídico.
- 20 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cebador de amplificación inverso comprende un resto enlazador químico no nucleotídico situado para impedir la copia de cualquier nucleótido que esté en 5' del resto enlazador químico no nucleotídico.
- 25 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde el resto enlazador químico no nucleotídico comprende un diol o, en donde el resto enlazador químico no nucleotídico comprende un enlazador no nucleotídico que une el cebador al soporte sólido.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además secuenciar el ácido nucleico diana.
- 30 13. El método de la reivindicación 12, en donde la secuenciación del ácido nucleico diana comprende:
hibridar uno o más cebadores de secuenciación con el primer molde inmovilizado o la segunda
35 cadena inmovilizada;
extender los cebadores de secuenciación incorporando uno o más nucleótidos marcados en la
cadena naciente; y
detectar los nucleótidos marcados, obteniendo así información de la secuencia del ácido nucleico
diana.
- 40 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el ácido nucleico diana se prepara amplificando con un par de cebadores configurados con un resto de unión, de modo que una cadena de un producto de amplificación generado usando el par de cebadores puede separarse de la cadena opuesta.
15. El método de la reivindicación 14, en donde el resto de unión comprende biotina.

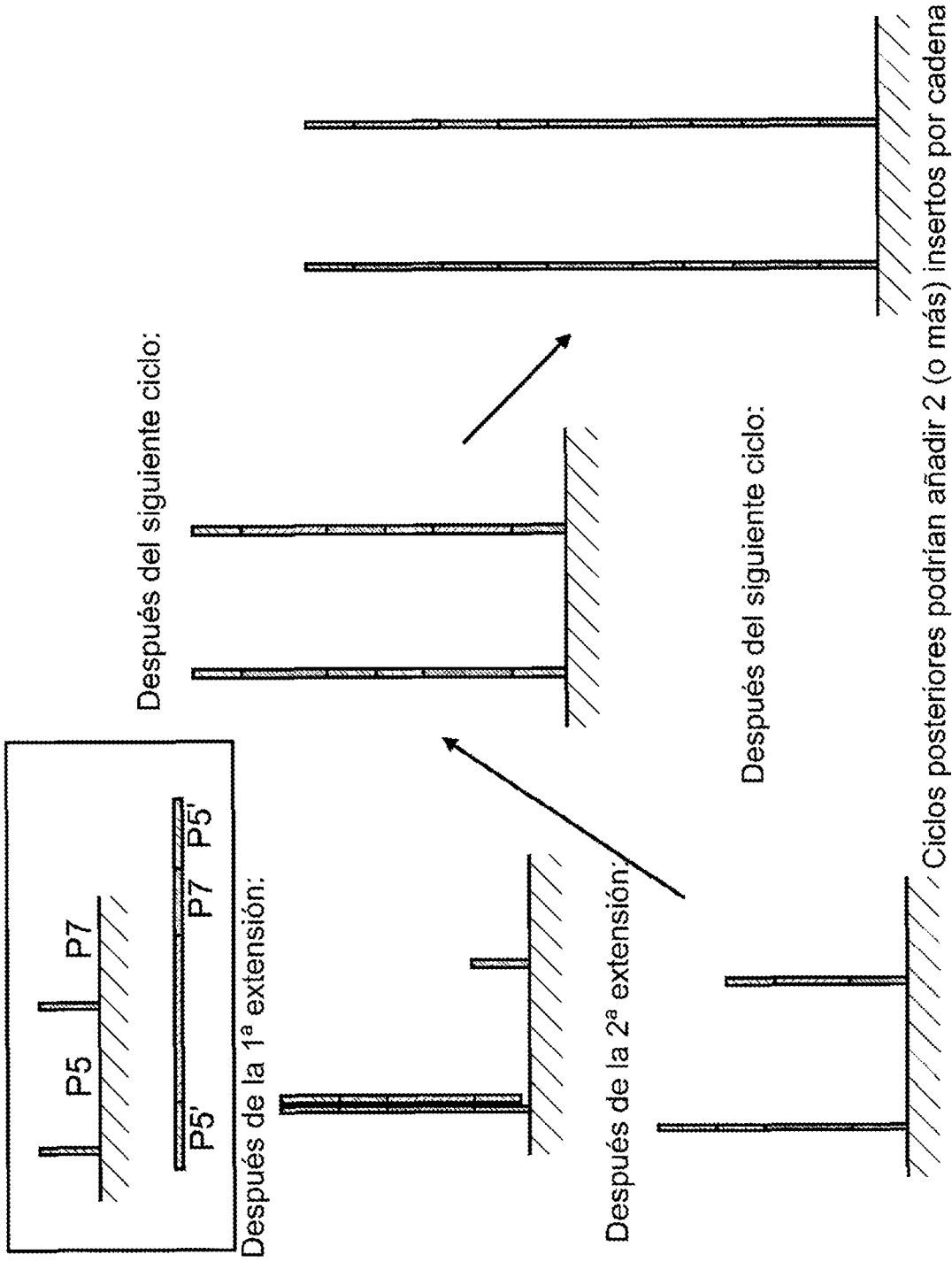
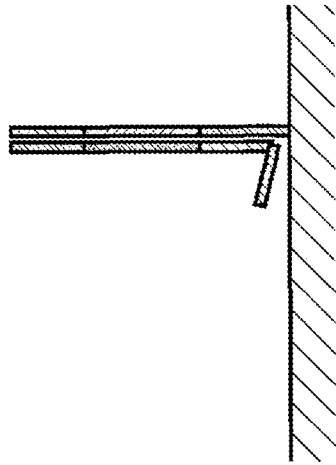


Figura 1



Después de la 1ª extensión



Construcciones de bibliotecas alternativas (ambas cadenas pueden concatenarse):

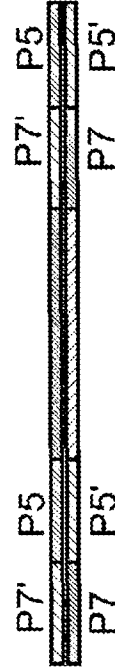
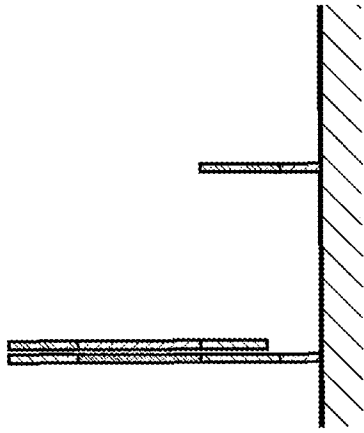


Figura 2

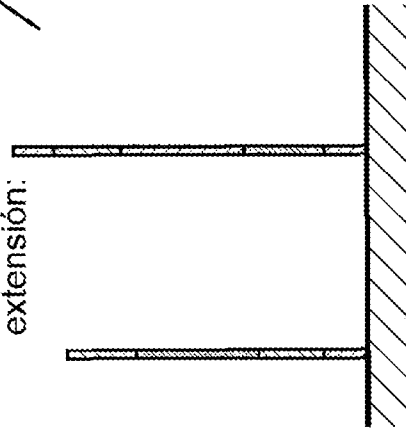
Y los cebadores de superficie son 20T-P7/20A-P5



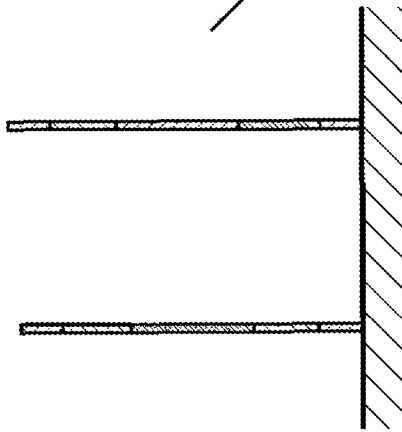
Después de la 1ª extensión:



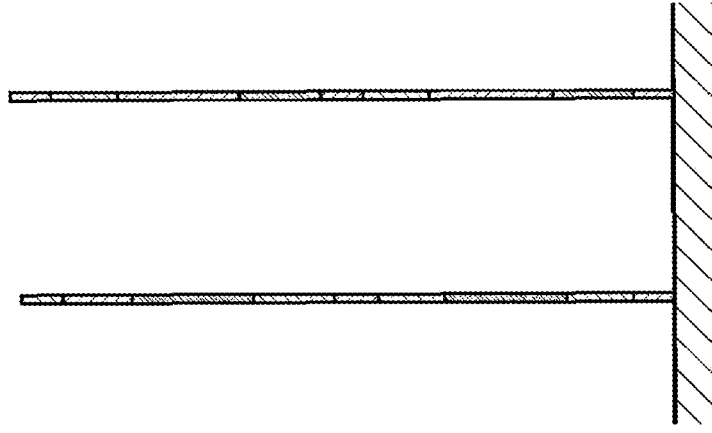
Después de la siguiente extensión:



Después del siguiente ciclo:



Después del siguiente ciclo:



Ciclos posteriores podrían añadir 2 (o más) insertos por cadena

Figura 3

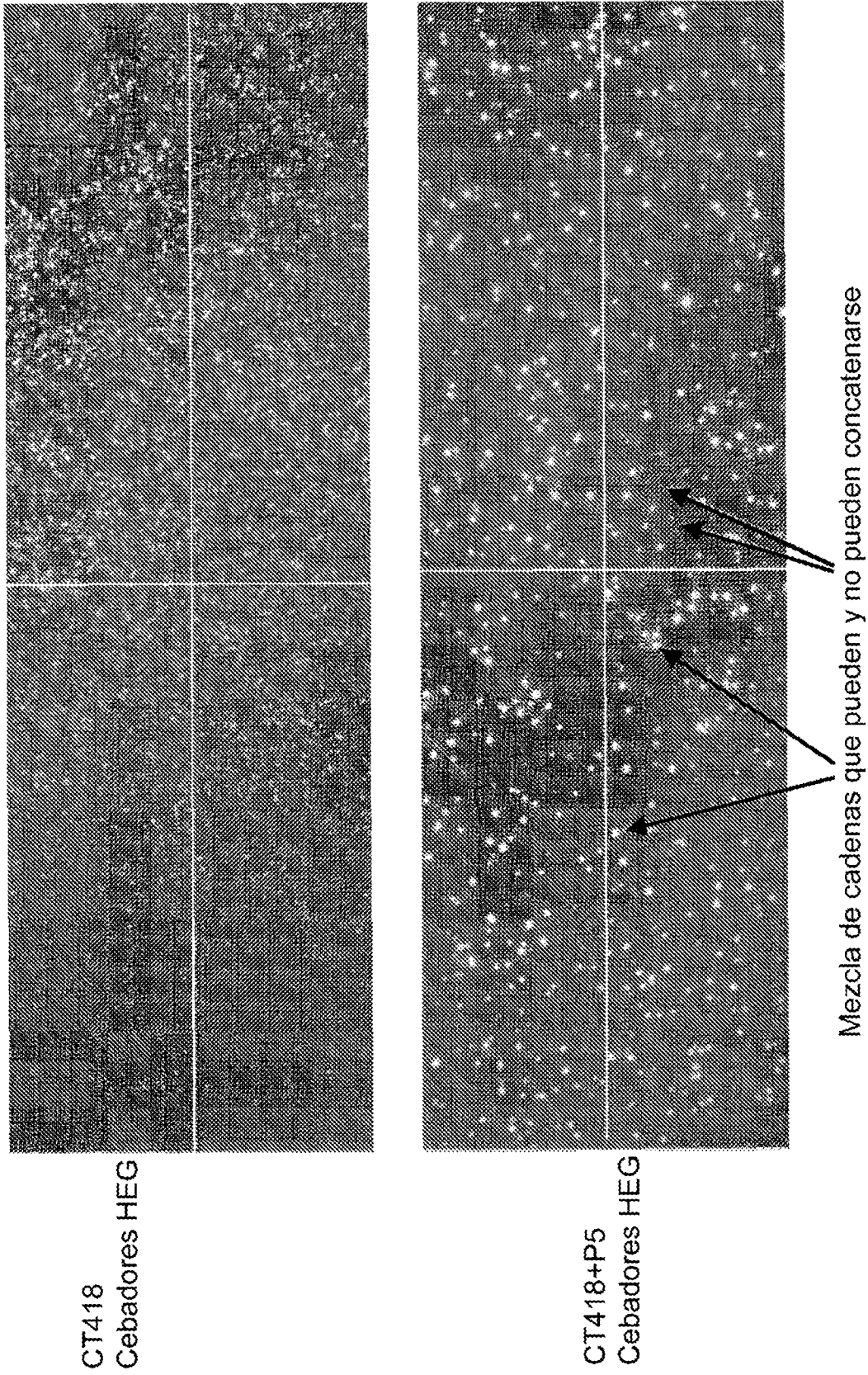


Figura 4A

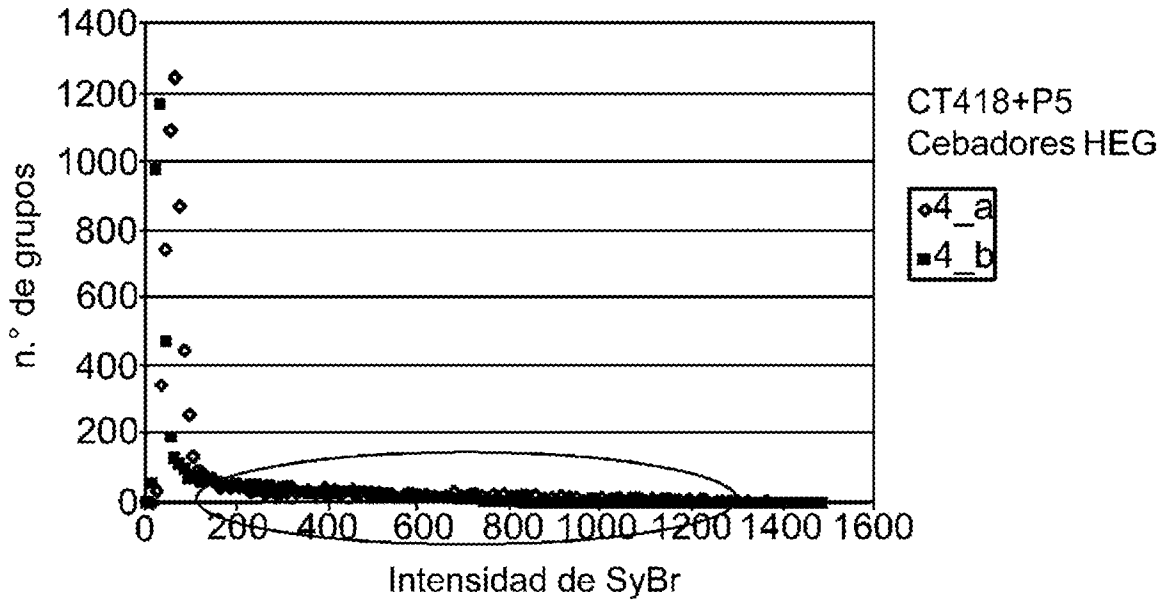
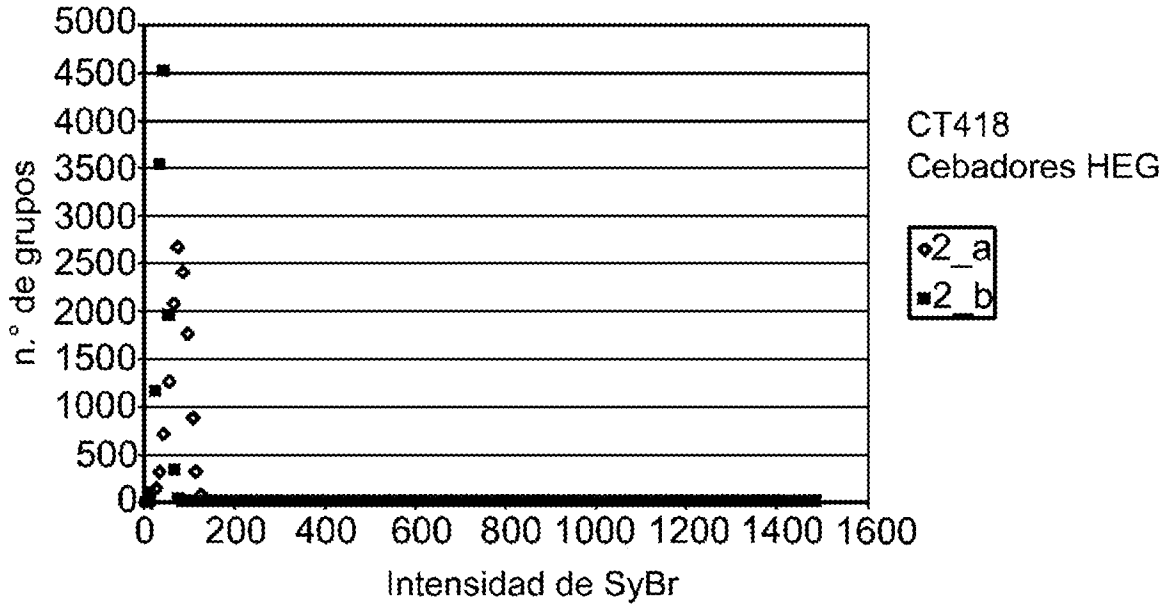


Figura 4B

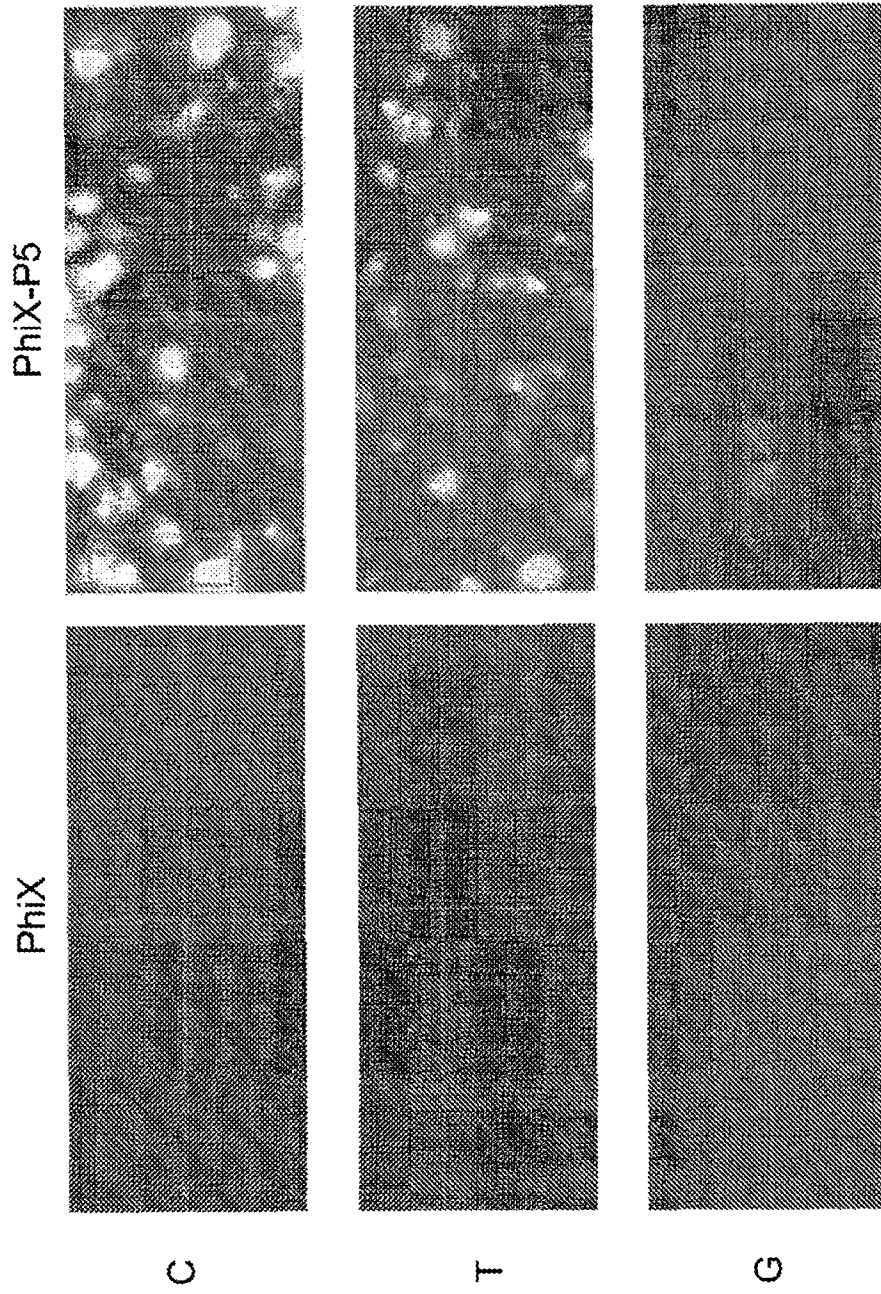


Figura 5

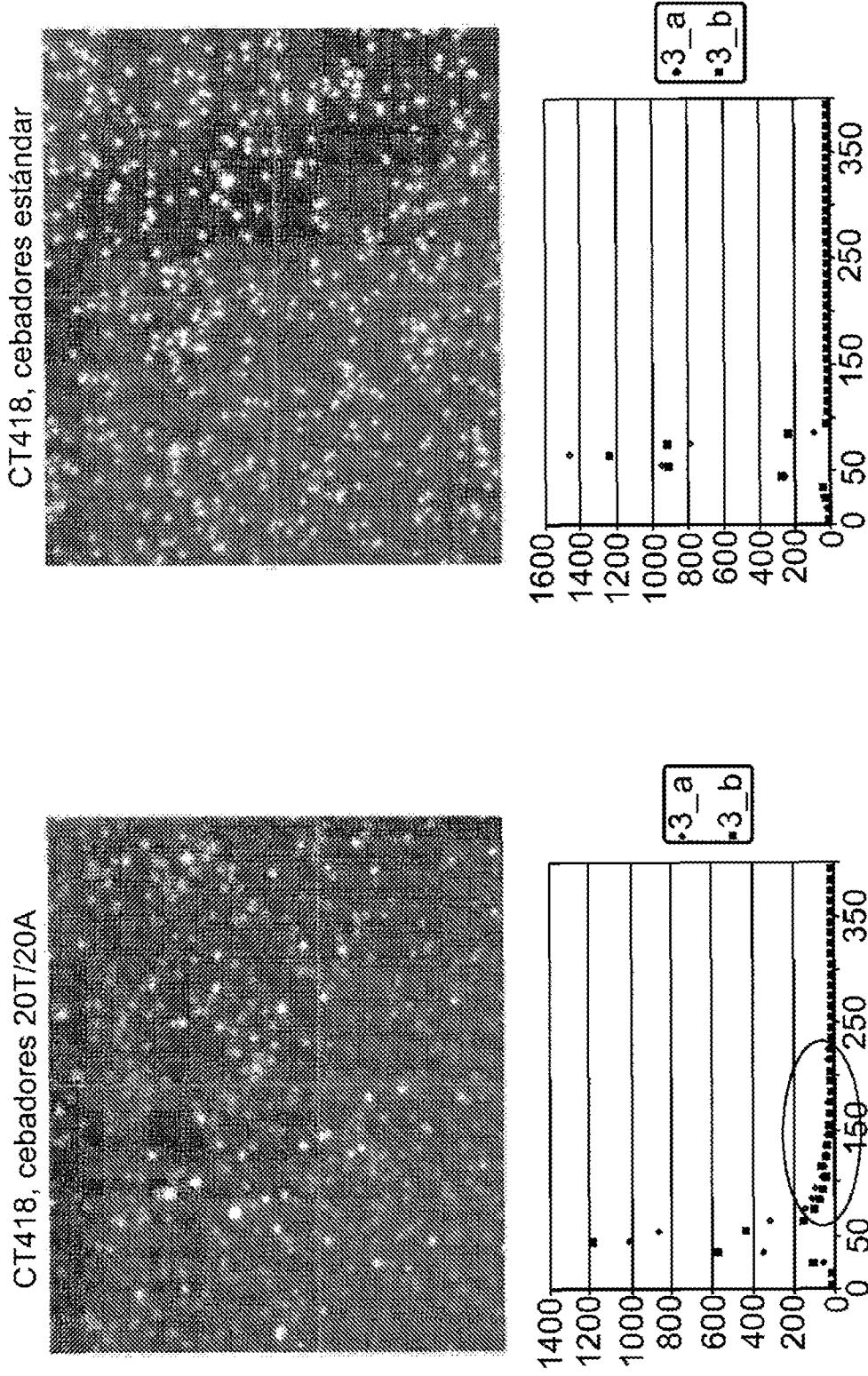


Figura 6

Estrategia 20A/20T amplificada a 50C
 PhIX 1pM, 9pM, 18pM, 18pM y CT418 1pM

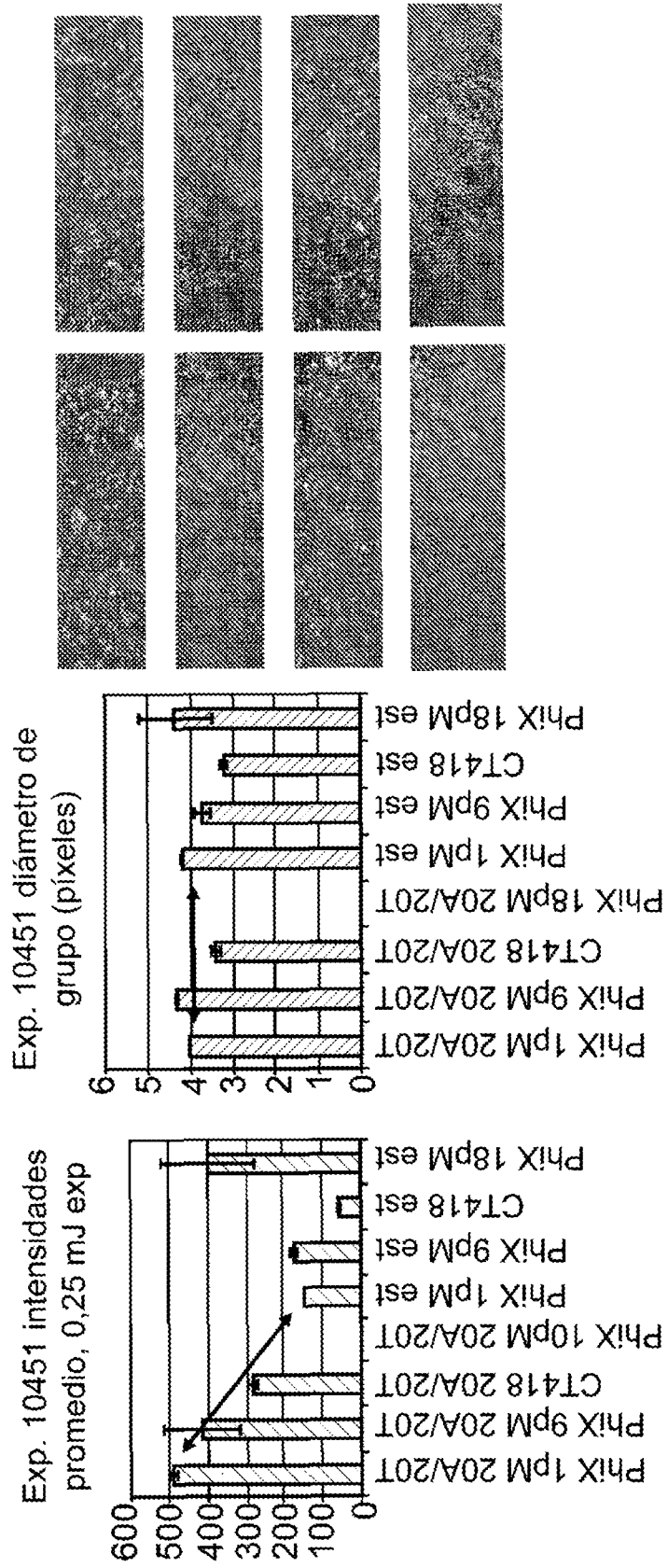


Figura 7

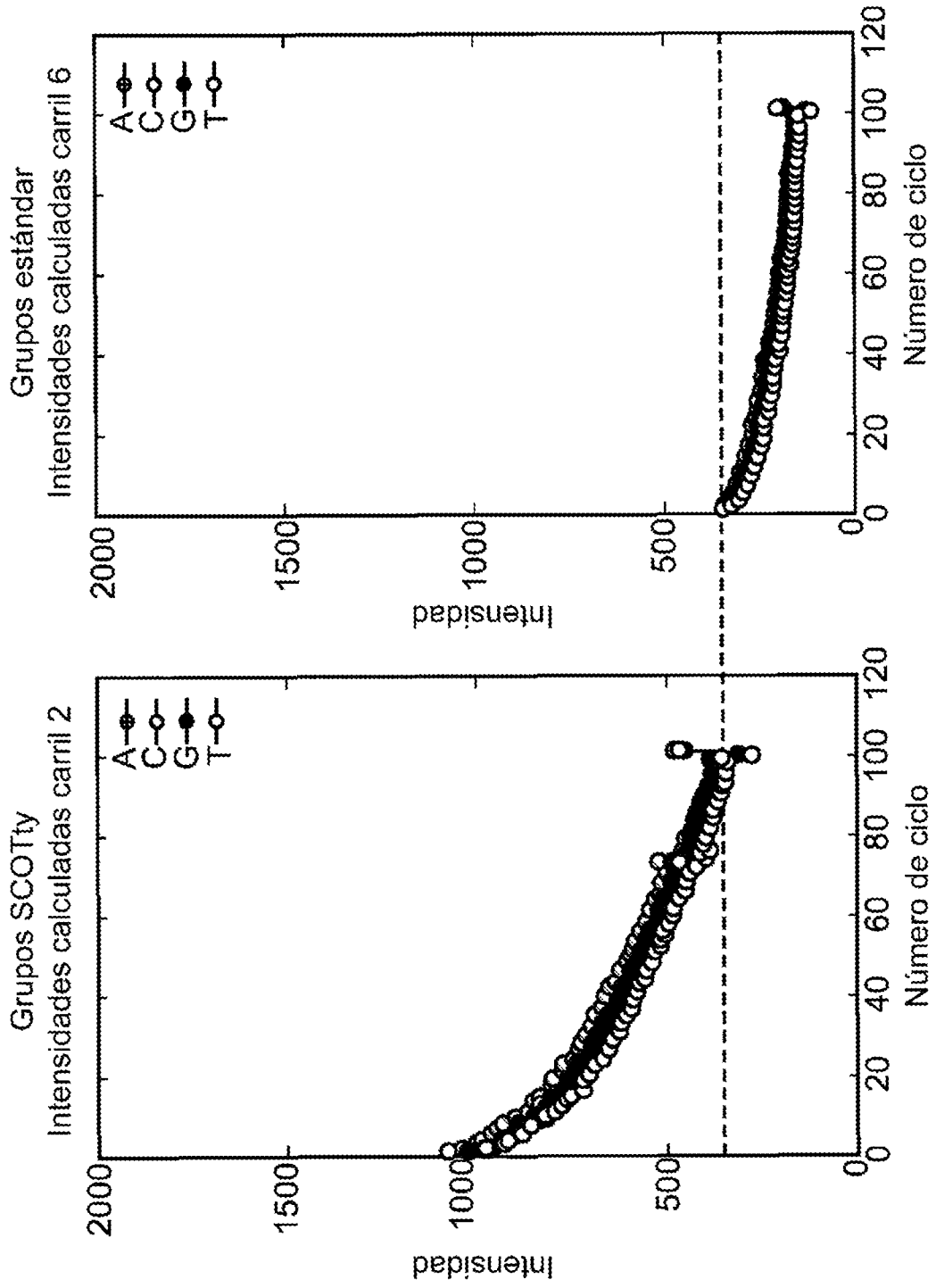


Figura 8