



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 339**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04785758 .6**  
96 Fecha de presentación : **28.01.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1590477**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Procedimientos para amplificar y secuenciar ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **29.01.2003 US 443471 P**  
**23.04.2003 US 465071 P**  
**06.06.2003 US 476602 P**  
**06.06.2003 US 476504 P**  
**06.06.2003 US 476313 P**  
**06.06.2003 US 476592 P**  
**25.08.2003 US 497985 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.12.2009**

73 Titular/es: **454 Life Sciences Corporation**  
**20 Commercial Street**  
**Branford, Connecticut 06405, US**

72 Inventor/es: **Leamon, John, H.;**  
**Lohman, Kenton;**  
**Rothberg, Jonathan, M. y**  
**Weiner, Michael, P.**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 330 339 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para amplificar y secuenciar ácidos nucleicos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar las secuencias de bases de ADN. Más particularmente, la presente invención se refiere a procedimientos con los que las secuencias de bases de un genoma pueden amplificarse y determinarse automática o semiautomáticamente.

10 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos rápidos y sensibles que utilizan secuencias de ADN automatizadas ha revolucionado la biología molecular moderna. Ahora resulta posible analizar genomas completos de plantas, hongos, animales, bacterias y virus, con un esfuerzo concertado de una serie de máquinas y un equipo de técnicos. Sin embargo, no se ha alcanzado el objetivo de secuenciar automática o semiautomática de manera rápida un genoma en un tiempo corto. Siguen existiendo problemas técnicos para llevar a cabo una preparación exacta, la amplificación y la secuenciación de las muestras.

Un problema técnico que dificulta el análisis de secuencias de los genomas ha sido la incapacidad del investigador de preparar rápidamente numerosas muestras de ácidos nucleicos que abarquen el genoma completo en un periodo corto de tiempo.

Otro problema técnico es la incapacidad para amplificar representativamente un genoma hasta un nivel que resulte compatible con la sensibilidad de los procedimientos de secuenciación actuales. Las máquinas de secuenciación modernas económicamente viables, aunque sensibles, todavía requieren más de un millón de copias de un fragmento de ADN para la secuenciación. Los procedimientos actuales para proporcionar un número elevado de copias para la secuenciación del ADN implica variaciones de clonación o amplificación *in vitro* que no puede amplificar el número de clones individuales (600.000 ó más, y decenas de millones para un genoma humano) necesario para la secuenciación económica de un genoma completo.

Todavía otro problema técnico es que los procedimientos actuales de secuenciación pueden llevar a cabo, como máximo, una reacción de secuenciación por hibridación de cebador oligonucleótido. La hibridación de cebadores de secuenciación con frecuencia es la etapa limitante de la velocidad, que restringe el rendimiento de secuenciadores de ADN.

En la mayoría de casos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki, R.K. *et al.*, Science 230:1350-1354, 1985; Mullis K. *et al.*, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51(parte 1):263-273, 1986) desempeña un papel integral en la obtención de la información de secuencias de ADN, amplificando cantidades minúsculas de ADN específico para obtener concentraciones suficientes para la secuenciación. Sin embargo, el escalado de la tecnología de PCR actual para satisfacer las demandas crecientes de la genética moderna no es ni rentable ni eficiente, especialmente en el caso de que se consideren los requisitos de la secuenciación de genomas completos.

Los esfuerzos por maximizar las eficiencias de tiempos y costes típicamente se han centrado en dos áreas: reducir el volumen de reacción necesario para las amplificaciones, e incrementar el número de amplificaciones simultáneas llevadas a cabo. La miniaturización proporciona la ventaja de reducir la cantidad de muestra y reactivos utilizados, tiempos de amplificación reducidos y escalabilidad incrementada del rendimiento.

Aunque los termocicladores convencionales requieren tiempos de ciclado prolongados, debido a restricciones térmicas de la masa (Woolley A.T. *et al.*, Anal. Chem. 68:4081-4086, 1996), pueden ciclarse más rápidamente volúmenes de reacción más reducidos. Se han utilizado dispositivos de PCR de flujo continuo con microcanales grabados conjuntamente con zonas de temperatura fija para reducir los volúmenes de reacción a niveles submicrolitro de muestra (Lagally E.T. *et al.*, Analytical Chemistry 73:565-570, 2001; Schneegas I. *et al.*, Lab. on a Chip - The Royal Society of Chemistry 1:42-49, 2001).

Los microcapilares de vidrio, calentados con aire (Kalinina O. *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:1999-2004, 1997) o luz infrarroja (Oda R.P. *et al.*, Anal. Chem. 70:4361-4368, 1998; Huhmer, A.F. y Landers J.P., Anal. Chem. 72:5507-5512, 2000) también han resultado de utilidad como recipientes eficientes para reacciones a escala de nanolitros. Se han conseguido volúmenes de reacción similares con termocicladores de silicio microfabricados (Burns M.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5556-5561, 1996).

En muchos casos, dichas miniaturizaciones han reducido los tiempos totales de reacción de PCR a menos de 30 minutos en cicladores de resistencias eléctricas modificadas (Kopp M.U. *et al.*, Science 280:1046-1048, 1998; Chiou J., Matsudaira P., Sonin A. y Ehrlich D., Anal. Chem. 73:2018-2021, 2001) y de aire caliente (Kalinina O. *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:1999-2004, 1997) y a 240 segundos para algunas reacciones controladas por infrarrojos (Giordano B.C. *et al.*, Anal. Biochem. 291:124-132, 2001).

Determinadas tecnologías utilizan un rendimiento incrementado y la miniaturización simultáneamente, tal como en el diseño del sistema de 1.536 pocillos de Sasaki *et al.* (Sasaki N. *et al.*, DNA Res. 4:387-391, 1997), que mantiene los volúmenes de reacción por debajo de 1  $\mu$ L. A título de ejemplo adicional, Nagai *et al.* (Nagai H. *et al.*, Biosens. Bioelectron. 16:1015-1019, 2001; Nagai H. *et al.*, Anal. Chem. 73:1043-1047, 2001) informaron de la amplificación de un único fragmento de ensayo en diez mil pocillos de reacción de 86 pL grabados en una única oblea de silicio. Por desgracia, la recuperación y utilización del amplicón de estos procedimientos ha demostrado ser problemática, requiriendo la evaporación a través de membranas selectivamente permeables.

A pesar de dichas notables mejoras de los volúmenes de reacción y tiempos de ciclado, ninguna de las estrategias anteriores ha proporciona la amplificación masivamente paralela necesaria para incrementar drásticamente el rendimiento a niveles necesarios para el análisis del genoma humano completo. Los secuenciadores de ADN continúan siendo más lentos y más caros de lo deseable. En el contexto de la investigación pura quizá resulta aceptable que un secuenciador sea lento y caro. Sin embargo, en el caso de que se desee utilizar secuenciadores de ADN en un contexto diagnóstico clínico, dichos procedimientos ineficientes de secuenciación resultan prohibitivos, incluso para una institución bien financiada. La secuenciación en paralelo a gran escala de miles de dianas amplificadas clonalmente facilitaría mucho el análisis a gran escala de genomas completos sin el laborioso procedimiento de preparación de muestras, y los caros y proclives a errores procedimientos de clonación. Para numerosas aplicaciones puede utilizarse la exitosa amplificación de ADN clonal en fase sólida de alta capacidad. Por consiguiente, resulta evidente que existe una necesidad de preparar un genoma o un molde grande de ácidos nucleicos para la secuenciación, para la amplificación del molde de ácidos nucleicos, y para la secuenciación del molde amplificado de ácidos nucleicos sin la restricción de una única reacción de secuenciación por cada hibridación. Además, existe la necesidad de un sistema para conectar estas diversas tecnologías en una máquina de secuenciación automática o semiautomática viable.

La patente WO 00/40712 se refiere a un procedimiento óptico de separación y da a conocer procedimientos para la selección de ácidos nucleicos codificantes de productos génicos en los que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado se asocian por compartimentalización.

La patente WO 02/22869 describe un procedimiento para la selección de enzimas procesadores de ácidos nucleicos mediante la selección de ácidos nucleicos codificantes de productos génicos, en los que el ácido nucleico y la actividad del producto génico codificado se asocian por compartimentalización.

La patente WO 99/02671 da a conocer un procedimiento para el aislamiento de uno o más elementos genéticos codificantes de un producto génico que presenta una actividad deseada en la que los elementos genéticos y la actividad de los mismos se asocian por compartimentalización.

La patente US 2005/009022 se refiere a procedimientos y aparatos para llevar a cabo reacciones químicas independientes densamente empaquetadas en paralelo en un panel sustancialmente bidimensional. Se describen los usos de este panel para aplicaciones tales como la secuenciación de ADN, más preferentemente la pirosecuenciación y la amplificación de ADN.

La patente US 2003/068629 da a conocer procedimientos y aparatos para la secuenciación de un ácido nucleico. Se reivindica que los procedimientos permiten ordenar en paralelo un gran número de reacciones independientes de secuenciación, permitiendo la secuenciación simultánea de un número muy elevado de oligonucleótidos diferentes.

La patente US 2003/108867 se refiere a la secuenciación de ácidos nucleicos utilizando paneles de microesferas.

La patente US 6.284.465 se refiere a un aparato, sistemas y procedimientos para localizar ácidos nucleicos unidos a superficies.

La patente US 98/13523 se refiere a un procedimiento para la secuenciación de ADN basado en la detección de la incorporación de bases a partir de la liberación de PPI. En particular, la exposición se afirma que se refiere a un procedimiento de secuenciación "en tiempo real".

La patente US 6.023.540 se refiere a un sensor de fibra óptica con microesferas codificadas.

## Breve resumen de la invención y de la exposición

La invención proporciona un procedimiento para la secuenciación de ácidos nucleicos según la reivindicación 1.

La exposición de la presente solicitud describe un sistema integrado, que comprende nuevos procedimientos y nuevos aparatos para: (1) la preparación de muestras de ácidos nucleicos, (2) la amplificación de ácidos nucleicos, y (3) la secuenciación del ADN.

La exposición proporciona un nuevo procedimiento para preparar una biblioteca de múltiples secuencias de ADN, particularmente derivadas de un gran molde de ADN o ADN genómico completo (o parcial). Se preparan secuencias de ADN monocatenario a partir de una muestra de molde grande de ADN o genomas completos (o parciales) de ADN mediante fragmentación, pulido, ligación de adaptadores, reparación de muescas y aislamiento de ADN monocatenario. El procedimiento permite generar una biblioteca de ADNmc ligada a soportes sólidos, que comprende: (a) generar

una biblioteca de moldes de ADNmc, (b) unir los moldes de ADNmc a soportes sólidos, y (c) aislar los soportes sólidos sobre los que se une un molde de ADNmc.

Asimismo, la exposición proporciona un procedimiento para la amplificación de cada elemento individual de una biblioteca de ADN en una única probeta, mediante, por ejemplo, la encapsulación de una pluralidad de muestras de ADN individualmente en una microcápsula de una emulsión, la realización de la amplificación de la pluralidad de muestras encapsuladas de ácidos nucleicos simultáneamente, y la liberación de dicha pluralidad amplificada de ADN de las microcápsulas para las reacciones posteriores. En una realización, se hibridan copias únicas de las especies molde de ácidos nucleicos con perlas de captura de ADN, se suspenden en solución de amplificación completa y se emulsionan en microrreactores (típicamente de 100 a 200 micrómetros de diámetro), realización seguidamente la amplificación (por ejemplo la PCR) para incrementar clonalmente el número de copia de la especie molde inicial hasta más de 1.000.000 de copias de una única secuencia de ácidos nucleicos, preferentemente hasta 2 a 20 millones de copias de un único ácido nucleico. La reacción de amplificación, por ejemplo, puede llevarse a cabo simultáneamente con por lo menos 3.000 microrreactores por microlitro de mezcla de reacción, y puede llevarse a cabo con más de 300.000 microrreactores en una única probeta de volumen 100  $\mu$ l (por ejemplo un tubo de reacción de PCR). La presente exposición también proporciona un procedimiento para el enriquecimiento en dichas perlas que contienen un suceso exitoso de amplificación de ADN (es decir, mediante la eliminación de las perlas en las que no hay ADN unido a las mismas).

La exposición también proporciona un procedimiento para la secuenciación de un ácido nucleico a partir de múltiples cebadores en una única etapa de hibridación de cebadores. Se hibridan dos o más cebadores de secuenciación al ADN molde que debe secuenciarse. A continuación, se protege la totalidad de los cebadores de secuenciación excepto uno. Se lleva a cabo la secuenciación (por ejemplo la secuenciación pirofosfato) nuevamente mediante elongación del cebador no protegido. Se deja que la elongación prosiga hasta completarse (con polimerasa adicional y dNTPs en caso necesario) o se termina (con polimerasa y ddNTPs). Se eliminan los reactivos de completado y/o terminación de cadena. A continuación, se desprotege uno de los cebadores protegidos y se lleva a cabo la secuenciación mediante elongación del cebador recién desprotegido. Este procedimiento se continúa hasta la desprotección y secuenciación de la totalidad de los cebadores de secuenciación. En una realización preferente, se utilizan dos cebadores (uno protegido y uno desprotegido) para secuenciar ambos extremos de un ácido nucleico bicatenario.

La exposición también proporciona un aparato y procedimiento para la secuenciación de ácidos nucleicos utilizando un enfoque de secuenciación basado en pirofosfato. El aparato está dotado de una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD), cámara de microfluidos, soporte de cartucho para muestras, bomba y válvulas de flujo. El aparato usa la quimioluminiscencia como el procedimiento de detección, que, para la secuenciación de pirofosfato, presenta un fondo inherentemente bajo. En una realización preferente, el cartucho para muestras para la secuenciación se denomina "placa PicoTiter" y está formado de una placa frontal de fibra óptica comercial, grabada al ácido para proporcionar cientos de miles de pocillos muy pequeños, cada pocillo con un volumen de 75 pL. El aparato incluye una nueva cubeta de administración de reactivo adaptada para la utilización con los panales indicados en la presente memoria, para enviar los reactivos fluidos a la placa PicoTiter, y un medio de envío de reactivos en comunicación con la cubeta de envío de reactivos. Los fotones procedentes de cada pocillo en la placa PicoTiter se canalizan a píxeles específicos en la cámara CCD con el fin de detectar reacciones de secuenciación.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1 proporciona una representación esquemática del procedimiento completo de preparación de biblioteca, incluyendo las etapas de fragmentación del ADN de molde (figura 1A), el pulido de extremos (figura 1B), la ligación de adaptadores (figura 1C), la reparación de muescas, la extensión de cadena y el aislamiento del gel (figura 1D). La figura 1E ilustra una representación esquemática de las etapas de amplificación y secuenciación del ADN de molde (figura 1E). La figura 1F ilustra un gel de agarosa representativo que contiene una preparación de muestras de una biblioteca de ADN adenovírico de 180 a 350 pares de bases obtenida según los procedimientos de la presente invención. La figura 1G proporciona una representación esquemática detallada de la preparación, amplificación y secuenciación de bibliotecas.

Figura 2A proporciona una representación esquemática del diseño universal de adaptadores según la presente invención. Cada adaptador universal se genera a partir de dos oligonucleótidos complementarios de ADNmc que están diseñados para contener una secuencia de nucleótidos de 20 pb para el cebado de PCR, una secuencia de nucleótidos de 20 pb para el cebado de secuencias y una secuencia discriminadora de 4 pb que comprende una secuencia de nucleótidos no repetida (por ejemplo, ACGT, CAGT, etc.). La figura 2B ilustra una pareja representativa de secuencias de adaptador universal para la utilización con la invención. Cadena sentido del adaptador A: SEC ID NO:1; cadena antisentido del adaptador A: SEC ID NO:2; cadena sentido del adaptador B: SEC ID NO:3; cadena antisentido del adaptador B: SEC ID NO:4. La figura 2C ilustra una representación esquemática del diseño de adaptador universal para la utilización con la invención.

Figura 3 representa el desplazamiento y extensión de cadena de fragmentos de ADN bicatenario con muescas, según la presente invención. Tras la ligación de adaptadores universales generados a partir de oligonucleótidos sintéticos, se generan fragmentos de ADN bicatenario que contienen dos regiones con muesca tras el tratamiento con ADN ligasa de T4 (figura 3A). La adición de un enzima de desplazamiento de cadena (por ejemplo la ADN polimerasa I *Bst*) se unirá a muescas (figura 3B), desplazará la cadena con muesca y completará la extensión de nucleótidos de la cadena (figura 3C), produciendo fragmentos de ADN bicatenario sin muescas (figura 3D).

## ES 2 330 339 T3

Figura 4 representa el aislamiento de ADN monocatenario direccionalmente ligado, según la presente invención utilizando perlas recubiertas de estreptavidina. Tras la ligación con los adaptadores universales A y B (los dos adaptadores diferentes en ocasiones se denominan “primer” y “segundo” adaptador universal), el ADN bicatenario contendrá adaptadores en cuatro combinaciones posibles : AA, BB, AB y BA. En el caso de que el adaptador universal B contenga una 5'-biotina, se utilizan soportes sólidos magnéticos recubiertos de estreptavidina para capturar y aislar las poblaciones de AB, BA y BB (la población AA resulta eliminada por el lavado). La población BB queda retenida en las perlas debido a que cada extremo del ADN bicatenario se encuentra unido a una perla y no se libera. Sin embargo, tras el lavado en presencia de un tampón de baja concentración salina, únicamente las poblaciones AB y BA liberarán un fragmento de ADN monocatenario que es complementario a la cadena unida. Los fragmentos de ADN monocatenario se aíslan a partir del sobrenadante y se utilizan como molde para la amplificación y secuenciación posteriores. Este procedimiento se describe posteriormente en más detalle.

Figura 5 representa un esquema de la estructura de una perla de captura de ADN.

Figura 6 representa un esquema de una realización de un procedimiento de amplificación en una emulsión de perlas.

Figura 7 representa un esquema de un procedimiento de enriquecimiento para eliminar las perlas que no presentan ADN unido a las mismas.

Figura 8A-B proporciona una representación esquemática de la reacción de secuenciación de doble extremo según la presente invención.

Figura 9 representa una demostración de secuenciación desde dos extremos en un aparato de pirosecuenciación según la invención.

Figura 10A-F representa un procedimiento ejemplar de secuenciación desde dos extremos.

Figura 11A-D representa ilustraciones esquemáticas de la amplificación basada en un círculo rodante utilizando un cebador de anclaje.

Figura 12 representa un dibujo de un aparato de secuenciación según la presente invención.

Figura 13 representa un dibujo de un cámara de administración/perfusión de reactivo según la presente invención.

Figura 14 representa una micrografía de un haz de fibras ópticas con cavidades, denominado PicoTiter Plate™, de la invención.

Figura 15 representa una micrografía de una placa picotiter recubierta de perlas que presentan ADN molde, y sulfúrilasa y luciferasa inmovilizados sobre la misma.

Figura 16 representa una ilustración esquemática de la cámara de flujo de reactivos y de FORA (placa PicoTiter Plate™).

Figura 17 representa un diagrama del instrumento analítico de la presente invención.

Figura 18 representa una ilustración esquemática de reacciones de secuenciación en paralelo microscópicas en una placa PicoTiter Plate™.

Figura 19 representa una micrografía de reacciones en pocillos únicos.

Figura 20 representa un cartucho de carga PicoTiterPlate™. “A” se refiere a una PicoTiterPlate™ con micropocillos encarados hacia el interior del cartucho; la distancia entre las caras abiertas de los pocillos de la PicoTiterPlate™ y la pared del cartucho de carga es 0,3 mm; “B” se refiere a una junta de sellado de silicona; “C” se refiere a una abertura de entrada; “D” se refiere a un tubo de carga de entrada; “E” se refiere a una abertura de salida y “F” se refiere a un tubo de salida. La placa PicoTiterPlate™ se sostiene en el cartucho con garras de plástico. El líquido se introduce mediante el tubo de carga de entrada D y entra en el espacio entre las caras abiertas de los pocillos de la PicoTiterPlate™ y la pared del cartucho de carga a través de la abertura de entrada C. El área definida por la junta de sellado de silicona B se llena y el exceso de líquido abandona el cartucho a través de la abertura de salida E y el tubo de salida F.

Figura 21 representa una cámara de amplificación PicoTiterPlate™ en vista de despiece. “A” se refiere a una tapa de cámara de amplificación con seis tornillos de retención; “B” se refiere a una lámina de aislamiento de espuma de celdas cerradas; “C” se refiere a un portaobjetos de microscopía de vidrio estándar de 25 x 75 mm; “D” se refiere a una hoja de silicio de 0,25 mm de grosor; “E” se refiere a una placa PicoTiterPlate™; “F” se refiere a una base de cámara de amplificación; “G” se refiere a una segunda hoja de silicio de 0,25 mm de grosor.

Figura 22 representa un diagrama esquemático de PCR en fase sólida de PicoTiterPlate™. Las estructuras cilíndricas simbolizan pocillos individuales de PicoTiterPlate™. Las esferas grises simbolizan perlas con cebadores

inmovilizados. Se muestran cebadores directos “F” (rojo) e inversos “R” (azul) en dirección 5’ a 3’ tal como indican las flechas. La complementariedad de la secuencia sintetizada respecto a los cebadores directos e inversos se muestra como columnas rojo oscuro (complemento de F) y azul oscuro (complemento de R). El ADN molde monocatenario se muestra como una línea gris continua y las cadenas de ADN recién sintetizadas, como líneas grises discontinuas. Las sondas de hibridación marcadas fluorescentemente se muestran como barras verdes.

Figura 23A-C representa la hibridación de sondas fluorescentes a fragmentos de ADN de ensayo inmovilizados sobre perlas. Las figuras 23A (parte superior izquierda) y 23B (parte superior derecha) ilustran la especificidad de una población mixta de sondas hibridada al fragmento A y al fragmento B inmovilizados sobre perlas de control, respectivamente. Las perlas con fragmento B mostraban señal Alexa Fluor 647 (roja) y las perlas con fragmento A mostraban la señal Alexa Fluor 488 (verde). La figura 23B (panel inferior) ilustra la fluorescencia de sonda procedente de perlas de captura de ADN tras la PT-PCR. Las perlas mostraban señales homogéneas de fragmento A y fragmento B, así como mezclas de moldes, que se observan como grados variables de amarillo.

Figura 24 ilustra los resultados representativos de BioAnalyzer del análisis de una única biblioteca de ADN monocatenario.

Figura 25 representa una inserción flanqueada por cebadores de PCR y cebadores de secuenciación.

Figura 26 representa un producto truncado producido por el desapareamiento de un cebador de PCR en la región de hibridación cruzada (CHR).

Figura 27 representa el cálculo de candidatos a cebador basado en la temperatura de fusión.

Figura 28A-D representa el ensamblaje del nebulizador utilizado para los procedimientos de la invención. Se aplicó una tapa de tubo sobre la parte superior del nebulizador (figura 7A) y la tapa se fijó con un conjunto de abrazadera del nebulizador (figura 7B). El fondo del nebulizador se ligó al suministro de nitrógeno (figura 7C) y el dispositivo completo se envolvió en parafilm (figura 7D).

Figura 29A ilustra resultados representativos para el análisis LabChip de una biblioteca de ADN monocatenario tras la nebulización y recorte de extremos.

Figura 29B ilustra los resultados representativos de distribución de tamaños para una biblioteca de ADN monocatenario ligada a adaptadores, tras la nebulización, recorte de extremos y purificación en gel.

Figura 30 ilustración del dispositivo utilizado para sostener los tubos sobre la placa de agitación debajo de la bomba vertical de jeringa. El dispositivo se modificó para sostener tres conjuntos de mezclas de reacción de amplificación en emulsión de perlas. La jeringa se cargó con la mezcla de reacción PCR y perlas.

Figura 31 ilustración de la situación óptima de las jeringas en la bomba vertical de jeringas y orientación de los tubos de emulsión bajo las salidas de las jeringas.

Figura 32 ilustración de la situación óptima del bloque de empujadores de bomba de jeringa contra los émbolos de jeringa, y situación óptima del dispositivo sobre la placa de agitación. Mediante la utilización de esta disposición, se expulsó el contenido de las jeringas en el aceite de emulsión agitado.

Figura 33 ilustración de perlas (ver las flechas) suspendidas en microrreactores individuales según los procedimientos de la invención.

Figura 34 ilustración de los resultados de secuenciación desde dos extremos que muestran que se ha determinado la secuencia de ambos extremos de un ADN molde. SEC ID NO:44: atgcacatggttgacacagtgg; SEC ID NO:45: atgcacatggttgacacagtgg; SEC ID NO:46: atgccaccgacctgtctcaaaact.

Figura 35 ilustra la encapsulación de una perla que comprende dos secuencias de oligonucleótidos para la secuenciación de doble cadena.

Figura 36 ilustra el procedimiento de PCR en fase solución y de direccionamiento a las perlas - una etapa en una realización preferente de secuenciación desde dos extremos.

Figura 37 ilustra la rotura de la emulsión y la recuperación del ADN molde amplificado sobre una perla - una etapa en una realización preferente de secuenciación de doble cadena.

Figura 38 ilustra una representación esquemática de un procedimiento preferente de secuenciación de doble cadena.

Figura 39 ilustra los resultados de secuenciación de un genoma de *Staphylococcus aureus*.

Figura 40 ilustra las longitudes de lectura medias en un experimento que implicaba la secuenciación desde dos extremos.

Figura 41 ilustra el número de pocillos para cada tramo de genoma en un experimento de secuenciación desde dos extremos.

Figura 42 ilustra un resultado y serie de alineación típicos de un procedimiento de secuenciación desde dos extremos. Las secuencias mostradas en orden, de parte superior a inferior, son: SEC ID NO:47 a SEC ID NO:60.

### Descripción detallada de la invención y exposición

En la presente memoria se describe una nueva plataforma que permite la amplificación simultánea de trescientas mil reacciones discretas de PCR (PCR-PT) en volúmenes de tan sólo 39,5 picolitros. Los productos de la PCR-PT agrupados de la reacción completa pueden recuperarse mediante una etapa de lavado y someterse a ensayo mediante PCR en tiempo real para la presencia y abundancia de moldes específicos. Resulta de mayor interés el hecho de que en la presente invención se demuestra que dichos productos de PCR-PT pueden transportarse a soportes sólidos y detectarse mediante hibridación con sondas fluorescentes de dos colores, permitiendo la amplificación de alta capacidad de ADN clonal en fase sólida y la secuenciación en paralelo a gran escala.

La presente exposición se refiere a un método y aparato para llevar a cabo secuenciación genómica, que satisface los objetivos siguientes: (1) preparar un ácido nucleico (por ejemplo un genoma) de una manera rápida y eficiente para la secuenciación, (2) amplificar el ácido nucleico de una manera representativa, y (3) llevar a cabo múltiples reacciones de secuenciación con un único cebador de hibridación. La presente invención resulta particularmente adecuada para el genotipado, detección y diagnóstico a partir de una muestra pequeña de ácidos nucleicos con eficiencia de costes. Se indica cada uno de dichos objetivos posteriormente.

### Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos en la presente memoria presentan el mismo significado que el entendido por un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención o exposición. Pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos indicados en la presente memoria en la práctica de la presente invención o exposición, y se describen posteriormente métodos y materiales adecuados ejemplificados. Por ejemplo, pueden describirse métodos que comprenden más de dos etapas. En estos métodos, pueden no resultar necesarias todas las etapas para conseguir una meta definida y se contempla la utilización de etapas aisladas para conseguir estas metas discretas. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “adaptador universal” se refiere a dos oligonucleótidos complementarios e hibridados que están diseñados para contener una secuencia de nucleótidos para el cebado de PCR y una secuencia de nucleótidos para el cebado de secuencias. Opcionalmente el adaptador universal puede incluir además una secuencia clave discriminadora única que comprende una secuencia de nucleótidos no repetida (es decir, ACGT, CAGT, etc.). Un conjunto de adaptadores universales comprende dos secuencias bicatenarias únicas y diferentes que pueden ligarse a los extremos de ADN bicatenario. Por lo tanto, el mismo adaptador universal o diferentes adaptadores universales pueden ligarse a cualquiera de los extremos de la molécula de ADN. En el caso de que se encuentre comprendido en una molécula de ADN más grande que sea monocatenaria o en el caso de encontrarse presente en forma de oligonucleótido, puede hacerse referencia al adaptador universal como adaptador universal monocatenario.

La expresión “ADN diana” se refiere a un ADN cuya secuencia debe determinarse mediante los métodos y aparatos de la invención o exposición.

La expresión “pareja de unión” se refiere a un par de moléculas que interactúan por medio de interacciones no covalentes específicas que dependen de las estructuras tridimensionales de las moléculas implicadas. Entre las parejas típicas de las parejas de unión específica se incluyen antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo, hormona-receptor, cadena de ácido nucleico-cadena de ácido nucleico complementaria, sustrato-enzima, análogo de sustrato-enzima, inhibidor-enzima, carbohidrato-lectina, biotina-avidina y virus-receptor celular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “secuencia clave discriminadora” se refiere a una secuencia que consiste de por lo menos uno de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (es decir, A, C, G, T). Puede utilizarse la misma secuencia discriminadora para una biblioteca entera de fragmentos de ADN. Alternativamente, pueden utilizarse diferentes secuencias clave discriminadoras para rastrear bibliotecas de fragmentos de ADN derivadas de diferentes organismos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “pluralidad de moléculas” se refiere a ADN aislado a partir de la misma fuente, a partir de la que pueden prepararse diferentes organismos separadamente mediante el mismo método. En una realización, la pluralidad de muestras de ADN se deriva de segmentos grandes de ADN, ADN de genoma completo, ADNc, ADN vírico o de transcritos inversos de ADN vírico. Este ADN puede derivarse a partir de cualquier fuente, incluyendo mamíferos (es decir seres humanos, primates no humanos, roedores o caninos), plantas, aves, reptiles, peces, hongos, bacterias o virus.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “biblioteca” se refiere a un subconjunto de especies de ADN de menor tamaño generadas a partir de un único ADN molde, segmentado o genómico completo.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “único”, tal como en “regiones de cebador de PCR únicas” se refiere a una secuencia que no existe o que existe a un nivel de copia extremadamente bajo dentro de las moléculas de ADN que deben amplificarse o secuenciarse.

5 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “compatible” se refiere a un extremo del ADN bicatenario al que puede unirse una molécula adaptadora (es decir, a un extremo romo o a un extremo cohesivo).

10 Tal como se utiliza en la presente invención, el término “fragmentación” se refiere a un procedimiento por el que una molécula más grande de ADN se convierte en trozos más pequeños de ADN.

10 Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “ADN molde de gran tamaño” se refiere a ADN de más de 25 kb, preferentemente de más de 500 kb, más preferentemente de más de 1 MB, y todavía más preferentemente de 5 MB o más grande.

15 Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “condiciones restrictivas de hibridación” se refiere a aquellas condiciones bajo las que únicamente las secuencias complementarias se hibridarán entre sí.

20 La invención y exposición descritas en la presente memoria constituyen, de manera general, un sistema y métodos para el procesamiento de ácidos nucleicos. El sistema y métodos pueden utilizarse para procesar ácidos nucleicos de una multitud de maneras que utilizan la secuenciación de ácidos nucleicos. Dicha secuenciación puede llevarse a cabo para determinar la identidad de una secuencia de ácido nucleico, o para la detección de polimorfismos de nucleótidos individuales en fragmentos de ácidos nucleicos, para el perfilado de expresión de ácidos nucleicos (en la comparación entre el perfil de expresión de ácidos nucleicos en dos o más estados, por ejemplo en la comparación entre tejido enfermo y normal, o entre tejido no tratado y tejido tratado con un fármaco, enzimas, radiación o un tratamiento químico), para el haplotipado (en la comparación entre genes o variantes de genes en cada uno de los dos alelos presentes en un sujeto humano), para el cariotipado (en la comparación diagnóstica de uno o más genes en un tejido de ensayo, típicamente procedente de un embrión/feto antes de la concepción para detectar defectos congénitos, con los mismos genes en sujetos cariotipados “normales”) y para el genotipado (en la comparación entre uno o más genes en un primer individuo de una especie con los mismos genes en otros individuos de la misma especie).

30 El sistema presenta varios componentes. Entre ellos se incluyen: (1) el ácido nucleico molde que debe procesarse, (2) una placa picotiter para contener el f ácido nucleico molde, (3) una cámara de flujo y un medio de administración de fluido que permite el flujo de reactivos de procesamiento de ácidos nucleicos sobre el ácido nucleico molde, en el que los reactivos de procesamiento generan luz a medida que se procesa el ácido nucleico, (4) un medio de captura de luz que detecte la luz emitida a medida que se procesan el ácido nucleico y que convierta la luz capturada en datos, y (5) un medio de procesamiento de datos que procese los datos, rindiendo información con significado acerca del ácido nucleico que ha sido procesado. Cada uno de dichos componentes del sistema se comenta en detalle a continuación.

## 40 1. Ácido nucleico de molde y preparación del mismo

### Ácido nucleico de molde

45 Los moldes de ácido nucleico que pueden secuenciarse según la invención o exposición, por ejemplo una biblioteca de ácidos nucleicos, en general pueden incluir moléculas de ácidos nucleico circulares abiertas o circulares cerradas. Un “círculo cerrado” es una molécula de ácido nucleico circular cerrada covalentemente, por ejemplo una molécula circular de ADN o ARN. Un “círculo abierto” es una molécula de ácido nucleico monocatenaria lineal que presenta un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3'.

50 En una realización, el ácido nucleico monocatenario contiene por lo menos 100 copias de una secuencia específica de ácido nucleico, encontrándose cada copia unida covalentemente extremo con extremo. En algunas realizaciones el círculo abierto se forma *in situ* a partir de una molécula de ácido nucleico bicatenaria lineal. Los extremos de una molécula dada de ácido nucleico circular abierto pueden ligarse con ADN ligasa. Las secuencias en los extremo 5' y 3' de la molécula circular abierta son complementarias a dos regiones de nucleótidos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico, por ejemplo una región adaptadora de un cebador de anclaje (en ocasiones denominado adaptador) o a dos regiones que son prácticamente contiguas en una segunda molécula de ADN. De esta manera, los extremos de la molécula circular abierta pueden ligarse utilizando ADN ligasa o extenderse con ADN polimerasa en una reacción de rellenado de hueco. Los círculos abiertos se describen en detalle en Lizardi, patente U.S. No. 5.854.033.

60 Un círculo abierto puede convertirse en un círculo cerrado en presencia de una ADN ligasa (para el ADN) o ARN ligasa después de, por ejemplo, la hibridación del círculo abierto con un cebador de anclaje.

65 Si se desea, pueden proporcionarse ácidos nucleicos de molde a modo de sondas candado. Las sondas “padlock” son oligonucleótidos lineales que incluyen secuencias complementarias a la diana situadas en cada extremo y que se encuentran separadas por una secuencia de linker. Los linkers pueden ligarse a los extremos de miembros de una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos que han sido, por ejemplo, cortadas físicamente o digeridas con endonucleasas de restricción. Tras la hibridación a una secuencia diana, las regiones 5' y 3' terminales de dichos oligonucleótidos



lineales se acercan hasta yuxtaponerse. Esta yuxtaposición permite que los dos segmentos sonda (en caso de encontrarse correctamente hibridados) se unan covalentemente mediante ligación enzimática (por ejemplo con ADN ligasa de T4), convirtiendo de esta manera las sondas en moléculas circularmente cerradas que se encadenan a las secuencias diana específicas (ver, por ejemplo, Nilsson *et al.*, Science 265:2085-2088, 1994). Las sondas resultantes resultan adecuadas para el análisis simultáneo de muchas secuencias génicas, debido tanto a su especificidad como selectividad para variantes de secuencia génica (ver, por ejemplo, Lizardi *et al.*, Nat. Genet. 19:225-232, 1998; Nilsson *et al.*, Nat. Genet. 16:252-255, 1997) y debido al hecho de que los productos de reacción resultantes permanecen localizados en las secuencias diana específicas. Además, la ligación intramolecular de muchas sondas diferentes se espera que resulte menos susceptible a reactividad cruzada no específica que las metodologías basadas en PCR multiplex, en las que pares de cebadores no cognados pueden dar lugar a productos de amplificación irrelevantes (ver, por ejemplo, Landergren y Nilsson, Ann. Med. 29:585-590, 1997).

Puede construirse una biblioteca de ácidos nucleicos molde de partida que comprenden moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios, con la condición de que la secuencia de ácidos nucleicos incluya una región que, en caso de hallarse presentes en la biblioteca, se encuentren disponibles para la hibridación, o pueden ponerse a disposición para la hibridación, con una secuencia de cebador de anclaje. Por ejemplo, al utilizarla como molde para la amplificación de círculo rodante, una región de un molde bicatenario es necesario que sea por lo menos transitoriamente monocatenaria para actuar como molde para la extensión del cebador de anclaje.

Entre los moldes de biblioteca pueden incluirse múltiples elementos, incluyendo, aunque sin imitarse a ellos, una o más regiones que son complementarias al cebador de anclaje. Por ejemplo, las bibliotecas de molde pueden incluir una región complementaria a un cebador de secuenciación, una región de nucleótidos de control y una secuencia de inserción que comprende el molde de secuenciación que debe caracterizarse posteriormente. Tal como se explica en más detalle posteriormente, la región de nucleótidos de control se utiliza para calibrar la relación entre la cantidad de producto secundario y el número de nucleótidos incorporado. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "complemento" se refiere a secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse con una secuencia de nucleótidos específica, formando un dúplex complementario.

En una realización, una biblioteca de moldes incluye: (i) dos regiones diferentes que son complementarias al cebador de anclaje, (ii) una región homóloga al cebador de secuenciación, (iii) una región opcional de nucleótidos de control, (iv) una secuencia de inserción de, por ejemplo, 30 a 500, 50 a 200 ó 60 a 100 nucleótidos, que deben secuenciarse. Evidentemente el molde puede incluir dos, tres o la totalidad de las cuatro características.

El ácido nucleico molde puede construirse a partir de cualquier fuente de ácidos nucleicos, por ejemplo cualquier célula, tejido u organismo, y puede generarse mediante cualquier procedimiento reconocido de la técnica. Entre los métodos adecuados se incluyen, por ejemplo, la sonicación de ADN genómico y la digestión con una o más endonucleasas de restricción (ER) para generar fragmentos de un rango de longitudes deseado a partir de una población inicial de moléculas de ácidos nucleicos. Preferentemente uno o más de los enzimas de restricción presentan secuencias de reconocimiento diferentes de cuatro bases. Entre los ejemplos de dichos enzimas se incluyen, por ejemplo Sau3A1, MspI y TaqI. Preferentemente los enzimas se utilizan conjuntamente con cebadores de anclaje que presentan regiones que contienen secuencias de reconocimiento para los enzimas de restricción correspondientes. En algunas realizaciones, una o ambas regiones adaptadoras de los cebadores de anclaje contienen secuencias adicionales contiguas a secuencias conocidas de reconocimiento de enzimas de restricción, permitiendo de esta manera la captura o hibridación con el cebador de anclaje de fragmentos de restricción específicos de interés con el cebador de anclaje. En otras realizaciones, el enzima de restricción se utiliza con un enzima de restricción de tipo IIS.

Alternativamente, pueden prepararse bibliotecas de molde mediante la generación de una biblioteca de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, por ejemplo ARN mensajero (ARNm). La biblioteca de ADNc puede, si se desea, procesarse adicionalmente con endonucleasas de restricción para obtener un extremo 3' característico de un ARN específico, fragmentos internos o fragmentos que incluyan el extremo 3' del ARN aislado. Las regiones adaptadoras en el cebador de anclaje pueden ser complementarias a una secuencia de interés que se cree se encuentra en la biblioteca de moldes, por ejemplo un polimorfismo de secuencia conocido o sospechado dentro de un fragmento generado mediante digestión de endonucleasa.

En una realización, puede unirse un oligonucleótido de indexación a miembros de una biblioteca de moldes para permitir la correlación posterior de un ácido nucleico molde a una población de ácidos nucleicos de la que se deriva el ácido nucleico molde. Por ejemplo, pueden fragmentarse separadamente una o más muestras de una población de ADN de partida utilizando cualquiera de los métodos dados a conocer anteriormente (por ejemplo la digestión con enzimas de restricción, la sonicación). Se une, por ejemplo se liga, una secuencia oligonucleotídica de indexación específica para cada muestra a los extremos de miembros de la población fragmentada. El oligonucleótido de indexación puede actuar como región para la circularización, amplificación y, opcionalmente, secuenciación, permitiendo que se utilice para indexar, o codificar, un ácido nucleico de manera que se identifique la muestra inicial de la que se deriva.

Pueden mezclarse entre sí para reacciones posteriores bibliotecas de molde diferentes con una pluralidad de cebadores de indexación distinguibles. La determinación de la secuencia del miembro de la biblioteca permite la identificación de una secuencia correspondiente al oligonucleótido de indexación. Basándose en esta información, puede inferirse el origen de cualquier fragmento dado.

La invención y exposición incluye un procedimiento de preparación de muestra que resulta en un panel de sustratos sólidos o sólidos móviles que contiene una pluralidad de cebadores de anclaje o de adaptadores unidos covalentemente a ácidos nucleicos molde.

En el caso de que el ácido nucleico molde sea circular, la formación del cebador de anclaje covalentemente unido y una o más copias del ácido nucleico diana preferentemente se produce mediante hibridación del cebador de anclaje a una región complementaria de un ácido nucleico circular y después extendiendo el cebador de anclaje hibridado con una polimerasa, resultando en la formación de un ácido nucleico que contiene una o más copias de una secuencia complementaria al ácido nucleico circular.

La unión del cebador de anclaje a un sustrato sólido o sólido móvil puede producirse antes, durante o después de la extensión del cebador de anclaje hibridado. De esta manera, en una realización, se unen uno o más cebadores de anclaje al sustrato sólido o sólido móvil, después de lo cual se hibrida el cebador de anclaje a un ácido nucleico diana y se extiende en presencia de una polimerasa. Alternativamente, en una segunda realización, en primer lugar se hibrida un cebador de anclaje a un ácido nucleico diana, y se extiende con una polimerasa un extremo 3'OH del cebador de anclaje hibridado. A continuación, el cebador de anclaje extendido se une al sustrato sólido o sólido móvil. Mediante la modificación de los cebadores de anclaje resulta posible amplificar específicamente diferentes ácidos nucleicos diana presentes en una población de ácidos nucleicos.

Posteriormente se describe de manera general una realización preferente de la preparación de ácidos nucleicos molde para reacciones de amplificación y secuenciación. La invención y exposición incluyen un método para la preparación de ADN de muestra, que comprende siete etapas generales: (a) fragmentar muestras de ADN molde de gran tamaño o de ADN genómico completo para generar una pluralidad de fragmentos digeridos de ADN, (b) crear extremos compatibles en la pluralidad de muestras de ADN digerido, (c) ligar un conjunto de secuencias adaptadoras universales a los extremos de moléculas de ADN fragmentado para preparar una pluralidad de moléculas de ADN ligadas con adaptadores, en las que cada secuencia adaptadora universal presenta una secuencia de bases conocida y única que comprende una secuencia común de cebador de PCR, una secuencia común de cebador de secuenciación y una secuencia clave de cuatro bases discriminadora y en la que un adaptador se encuentra unido a biotina, (d) separar y aislar la pluralidad de fragmentos de ADN ligados, (e) eliminar cualquier porción de la pluralidad de fragmentos de ADN ligados, (f) reparar muescas y extender las cadenas de la pluralidad de fragmentos de ADN ligados, (g) unir cada uno de los fragmentos de ADN ligados a un soporte sólido, y (h) aislar poblaciones que comprenden fragmentos de ADN monocatenario ligado a adaptadores para el que existe un adaptador único en cada extremo (es decir, que proporciona direccionalidad).

El comentario siguiente resume las etapas básicas implicadas en los métodos de la invención y de la exposición. Las etapas se indican en un orden específico; sin embargo, tal como resultaría conocido para el experto en la materia, el orden de las etapas puede modificarse, consiguiendo el mismo resultado. Estas modificaciones se encuentran contempladas en la invención. Además, pueden minimizarse algunas etapas, tal como también conocería el experto en la materia.

### *Fragmentación*

La fragmentación de la muestra de ADN puede ser realizada por cualquier medio conocido por los expertos ordinarios en la materia. Preferentemente la fragmentación se lleva a cabo por medios enzimáticos o mecánicos. Los medios mecánicos pueden ser la sonicación o el corte físico. Los medios enzimáticos pueden llevarse a cabo mediante digestión con nucleasas (por ejemplo desoxirribonucleasa I (ADNasa I)) o una o más endonucleasas de restricción. En una realización preferente, la fragmentación resulta en extremos para los que no se conoce la secuencia.

En una realización preferente, los medios enzimáticos son ADNasa I. La ADNasa I es un enzima versátil que corta no específicamente ADN bicatenario (ADNdc), liberando productos dinucleótidos, trinucleótidos y oligonucleótidos 5'-fosforilados. La ADNasa I presenta actividad óptima en tampones que contienen  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , pero ninguna otra sal. El objetivo de la etapa de digestión con ADNasa I es fragmentar un genoma de ADN de gran tamaño en especies más pequeñas, comprendiendo una biblioteca. Las características de corte de la ADNasa I resultarán en la digestión aleatoria del ADN molde (es decir, sin sesgo de secuencias) y en el predominio de fragmentos de ADNdc de extremos romos al utilizarla en presencia de tampones basados en el manganeso (Melgar, E. y D.A. Goldthwait, Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metal on the mechanism of action of deoxyribonuclease I, J. Biol. Chem. 243:4409, 1968). El abanico de productos de digestión generados tras el tratamiento de ADNasa I de los moldes genómicos depende de tres factores: i) la cantidad de enzima utilizado (unidades), ii) la temperatura de la digestión ( $^{\circ}C$ ), y iii) el tiempo de incubación (minutos). Las condiciones de digestión de la ADNasa I indicadas de manera general posteriormente se han optimizado para rendir bibliotecas genómicas con un abanico de tamaños comprendido entre 50 y 700 pares de bases (pb).

En una realización preferente, la ADNasa I digiere ADN molde de gran tamaño o ADN genómico completo durante 1 a 2 minutos, generando una población de polinucleótidos. En otra realización preferente, la digestión de ADNasa I se lleva a cabo a una temperatura de entre  $10^{\circ}C$  y  $37^{\circ}C$ . En todavía otra realización preferente, los fragmentos de ADN digeridos presentan una longitud comprendida entre 50 pb y 700 pb.

*Pulido*

- La digestión de moldes de ADN genómico (ADNg) con ADNasa I en presencia de  $Mn^{2+}$  rinde fragmentos de ADN que presentan extremos romos o que presentan extremos protuberantes de uno o dos nucleótidos de longitud.
- 5 En una realización preferente, se crea un número incrementado de extremos romos con ADN polimerasa *Pfu*. En otras realizaciones, pueden crearse extremos romos con ADN polimerasas menos eficientes, tales como ADN polimerasa de T4 o ADN polimerasa Klenow. Se utiliza el “pulido” con *Pfu* o la creación de extremos romos para incrementar la cantidad de especies de extremos romos generadas tras la digestión del molde genómico con ADNasa I. La utilización de ADN polimerasa *Pfu* para el completado de fragmentos resulta en el rellenado de los extremos 5' protuberantes.
- 10 Además, la ADN polimerasa *Pfu* no muestra actividad de ADN extendasa, pero presenta actividad 3' → 5' exonucleasa que resultará en la eliminación de extensiones de uno o dos nucleótidos, incrementando adicionalmente la cantidad de fragmentos de ADN de extremos romos disponibles para la ligación de adaptadores (Costa G.L. y M.P. Weiner, Protocols for cloning and analysis of blunt-ended PCR-generated DNA fragments. PCR Methods Appl. 3(5):595, 1994a; Costa G.L., A. Grafsky y M.P. Weiner, Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments. PCR Methods Appl. 3(6):338, 1994b; Costa G.L. y M.P. Weiner, Polishing with T4 or *Pfu* polymerase increases the efficiency of cloning of PCR products, Nucleic Acids Res. 22(12):2423, 1994c).

*Ligación de adaptadores*

- 20 Si las bibliotecas de ácidos nucleicos deben unirse al sustrato sólido, preferentemente los ácidos nucleicos molde se hibridan a secuencias de cebador de anclaje utilizando técnicas reconocidas (ver, por ejemplo, Hatch *et al.*, Genet. Anal. Biomol. Engineer. 15:35-40, 1999; Kool, patente US No. 5.714.302 y Lizardi, patente US No. 5.854.033). En general, cualquier procedimiento para hibridar los cebadores de anclaje a las secuencias de ácidos nucleicos de molde resulta adecuado con la condición de que resulte en la formación de complementariedad específica, es decir perfecta o prácticamente perfecta, entre la región o regiones adaptadoras en la secuencia de cebador de anclaje y una secuencia presente en la biblioteca de moldes.

- En una realización preferida, tras la fragmentación y formación de extremos romos de la biblioteca de ADN, se añaden secuencias de adaptadores universales a cada fragmento de ADN. Los adaptadores universales se diseñan para que incluyan un conjunto de regiones cebadoras de PCR únicas que presentan una longitud típica de 20 pb situadas contiguamente a un conjunto de regiones cebadoras de secuenciación únicas que presentan una longitud típica de 20 pb opcionalmente seguidas de una secuencia clave discriminadora única consistente de por lo menos uno de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (es decir, A, C, G, T). En una realización preferente, la secuencia clave discriminadora presenta una longitud de 4 bases. En otra realización, la secuencia clave discriminadora puede ser combinaciones de 1 a 4 bases. En todavía otra realización, cada adaptador universal único presenta una longitud de cuarenta y cuatro pb (44 pb). En una realización preferente, los adaptadores universales se ligan, utilizando ADN ligasa de T4, a cada extremo del fragmento de ADN, generando una adición total de nucleótidos de 88 pb a cada fragmento de ADN. Cada adaptador universal está diseñado específicamente para cada preparación de biblioteca de ADN y por lo tanto proporcionará un identificador único para cada organismo. El tamaño y secuencia de los adaptadores universales puede modificarse, tal como resultará evidente para un experto en la materia.

- Por ejemplo, para preparar dos adaptadores universales diferentes (es decir, “primero” y “segundo”), pueden encargarse oligonucleótidos monocatenarios de un proveedor comercial (por ejemplo Integrated DNA Technologies, IA u Operon Technologies, CA). En una realización, las secuencias oligonucleótidas de adaptador universal se modifican durante la síntesis con dos o tres enlaces fosforotioato en lugar de los enlaces fosfodiéster tanto en el extremo 5' como en el 3'. Los oligonucleótidos no modificados están sometidos a la rápida degradación por las nucleasas y por lo tanto resultan de utilidad limitada. Las nucleasas son enzimas que catalizan el corte hidrolítico de una cadena polinucleótida mediante el corte del enlace fosfodiéster entre bases nucleótidas. De esta manera, una reacción resistente a las nucleasas simple y ampliamente utilizada disponible para la utilización en aplicaciones de oligonucleótidos es la modificación fosforotioato. En los fosforotioatos, un átomo de azufre sustituye un oxígeno no de puente presente en el esqueleto oligonucleótido, provocando que resulte más resistente a todas las formas de digestión con nucleasa (es decir, resistente a la digestión tanto de endonucleasas como de exonucleasas). Cada oligonucleótido se purifica mediante HPLC para garantizar la ausencia de secuencias oligonucleótidas contaminantes o espurias en la preparación de oligonucleótidos sintéticos. Los adaptadores universales se diseñan para permitir la ligación direccional al ADN fragmentado de extremos romos. Cada conjunto de adaptadores universales bicatenarios se diseña con una región de cebador de PCR que contiene extremos 5' protuberantes no complementarios de cuatro bases que no pueden ligarse al fragmento de ADN de extremos romos, evitando además la ligación entre sí de estos extremos. De acuerdo con lo anterior, la unión únicamente puede ocurrir entre el extremo 3' del adaptador y el extremo 5' del fragmento de ADN, o entre el extremo 3' del fragmento de ADN y el extremo 5' del adaptador. Se generan secuencias de adaptador universal bicatenario mediante la utilización de oligonucleótidos monocatenarios que se diseñan con secuencias que permiten principalmente la hibridación de oligonucleótidos complementarios, y evitan la hibridación cruzada entre dos oligonucleótidos no complementarios. En una realización, el 95% de los adaptadores universales se forman a partir de la hibridación de oligonucleótidos complementarios. En una realización preferente, el 97% de los adaptadores universales se forman a partir de la hibridación de oligonucleótidos complementarios. En una realización más preferente, el 99% de los adaptadores universales se forma a partir de la hibridación de oligonucleótidos complementarios. En una realización todavía más preferente, el 100% de los adaptadores universales se forma a partir de la hibridación de oligonucleótidos complementarios.

## ES 2 330 339 T3

Uno de los dos adaptadores puede unirse a un grupo de unión de soporte. En una realización preferente, se añade una 5'-biotina al primer adaptador universal para permitir el aislamiento posterior del molde de ADNmc y el acoplamiento no covalente del adaptador universal con la superficie de un soporte sólido que se encuentra saturado con una proteína de unión a biotina (es decir, estreptavidina, neutravidina o avidina). Otros enlaces son conocidos de la técnica y pueden utilizarse en lugar de biotina-estreptavidina (por ejemplo anticuerpo/antígeno-epítipo, receptor/ligando y homología o complementariedad de oligonucleótidos). En una realización, el soporte sólido es una perla, preferentemente una perla de poliestireno. En una realización preferente, la perla presenta un diámetro de aproximadamente 2,8  $\mu\text{m}$ . Tal como se utiliza en la presente invención, se hace referencia a esta perla como "perla de preparación de muestra".

Cada adaptador universal puede prepararse mediante combinación e hibridación de dos oligonucleótidos de ADNdc, conteniendo uno la secuencia sentido y conteniendo la segunda la secuencia antisentido (complementaria). La representación esquemática del diseño de adaptador universal se presenta en esquema en la figura 2.

### *Aislamiento de productos de ligación*

La ligación del adaptador universal resulta en la formación de fragmentos de ADN con adaptadores en cada extremo, adaptadores individuales no unidos y dímeros de adaptadores. En una realización preferente, se utiliza la electroforesis en gel de agarosa como método para separar y aislar una población de la biblioteca de ADN adaptado de las poblaciones de adaptadores individuales no ligados y de dímeros de adaptadores. En otras realizaciones, los fragmentos pueden separarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño o la sedimentación en sacarosa. El procedimiento de digestión con ADNasa I del ADN típicamente rinde una población de la biblioteca que presenta tamaños comprendidos entre 50 y 700 pb. En una realización preferente, tras llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa en presencia de un marcador de ADN, la adición del conjunto de adaptadores universales de 88 pb desplazará la población de la biblioteca de ADN a un tamaño mayor y resultará en un perfil de migración comprendido en el intervalo de tamaños de entre aproximadamente 130 y 800 pb; los dímeros de adaptadores migrarán a 88 pb y los adaptadores no ligados migrarán a 44 pb. Por lo tanto, pueden aislarse físicamente numerosas bibliotecas de ADN bicatenario de tamaños comprendidos entre 200 y 800 pb del gel de agarosa y purificarse utilizando técnicas estándares de extracción del gel. En una realización, el aislamiento en gel de la biblioteca de ADN ligado y adaptado resulta en la recuperación de una población de la biblioteca que presenta tamaños comprendidos entre 200 y 400 pb. Otros métodos para distinguir los fragmentos ligados a adaptadores son conocidos para el experto en la materia.

### *Reparación de muescas*

Debido a que los oligonucleótidos de ADN utilizados para los adaptadores universales no se encuentran 5' fosforilados, se encuentran huecos en las uniones 3' de los fragmentos de ADN tras el tratamiento de ligasa (ver la figura 3A). Estos dos "huecos" o "muescas" pueden rellenarse mediante la utilización de una enzima ADN polimerasa que pueda unirse, desplazar cadenas y extender los fragmentos de ADN con muesca. Las ADN polimerasas que carezcan de actividad exonucleasa 3'→5' pero muestren actividad exonucleasa 5'→3' son capaces de reconocer muescas, de desplazar cadenas con muesca y de extender la cadena de manera que resulte la reparación de las muescas y la formación de ADN bicatenario sin muesca (ver las figuras 3B y 3C) (Hamilton S.C., J.W. Farchaus y M.C. Davis, DNA polymerases as engines for biotechnology, BioTechniques 31:370, 2001).

Se utilizan varios enzimas modificadores para la etapa de reparación de muesca, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, polimerasa, ligasa y quinasas. Entre las ADN polimerasas que pueden utilizarse para dicha aplicación se incluyen, por ejemplo, la ADN pol I de *E. coli*, la pol I de *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* y phi29 de bacteriófago. En una realización preferente, el enzima desplazador de cadena llamado pol I de *Bacillus stearothermophilus* (ADN polimerasa I *Bst*) se utiliza para reparar el ADNdc con muesca y resulta en ADNdc sin muesca (ver la figura 3D). En otra realización preferente la ligasa es de T4 y la quinasas es una polinucleótido quinasas.

### *Aislamiento de ADN monocatenario*

Tras la generación de ADNdc sin muesca, los ADNmc que comprenden tanto la primera como la segunda moléculas de adaptador deben aislarse (las poblaciones deseadas se designan a continuación con asteriscos; "A" y "B" corresponden al primer y segundo adaptador). Las bibliotecas de ADN bicatenario presentan adaptadores unidos en las configuraciones siguientes:

Adaptador universal A - fragmento de ADN - adaptador universal A

Adaptador universal B - fragmento de ADN - adaptador universal A\*

Adaptador universal A - fragmento de ADN - adaptador universal B\*

Adaptador universal B - fragmento de ADN - adaptador universal B

Se diseñan los adaptadores universales de manera que únicamente un adaptador universal presente un grupo 5' biotina. Por ejemplo, si el adaptador universal B presenta un grupo 5' biotina, pueden utilizarse perlas de preparación de muestras recubiertas de estreptavidina para unirse a todas las especies de la biblioteca de ADN bicatenario con adaptador universal B. Las poblaciones de la biblioteca genómica que contengan dos especies de adaptador universal A no contendrán un grupo 5' biotina y no se unirán a las perlas de preparación de muestra que contienen estreptavidina y de esta manera podrán eliminarse mediante lavado. Las únicas especies que permanecerán unidas a las perlas son aquellas con adaptadores universales A y B y aquellas con dos secuencias de adaptador universal B. Las especies de ADN con dos secuencias de adaptador universal B (es decir, con grupos de biotina en cada extremo 5') se encontrarán unidas a perlas de preparación de muestra recubiertas de estreptavidina en cada extremo, debido a que cada cadena comprendida en la doble cadena se encontrará ligada. Las especies de ADN bicatenario con un adaptador universal A y un adaptador universal B contendrán un único grupo de 5' biotina y de esta manera se encontrarán unidas a las perlas recubiertas de estreptavidina en únicamente un extremo. Las perlas de preparación de muestras son magnéticas, por lo tanto permanecerán unidas a un soporte sólido mientras se encuentren magnetizadas. De acuerdo con lo anterior, en presencia de una solución de baja concentración salina ("de fusión" o desnaturalizante), únicamente aquellos fragmentos de ADN que contengan una única secuencia de adaptador universal A y una única secuencia de adaptador universal B liberarán la cadena no unida complementaria. Esta población de ADN monocatenario puede recogerse y cuantificarse mediante, por ejemplo, secuenciación con pirofosfato, PCR cuantitativa en tiempo real, electroforesis en gel de agarosa o electroforesis capilar en gel.

#### *Unión de molde a perlas*

En una realización, las bibliotecas de ADNmc que se crean se cuantifican para calcular el número de moléculas por unidad de volumen. Estas moléculas se hibridan a un soporte sólido (perla) que contiene cebadores de captura de oligonucleótido que son complementarios a las regiones de cebador de PCR de los extremos del adaptador universal de las especies de ADNmc. A continuación, las perlas se transfieren a un protocolo de amplificación. Seguidamente pueden secuenciarse las poblaciones clonales de especies individuales capturadas sobre las perlas de ADN. En una realización, el soporte sólido es una perla, preferentemente una perla de sefarosa. Tal como se utiliza en la presente invención, se hace referencia a dicha perla como "perla de captura de ADN".

Las perlas utilizadas en la presente invención pueden ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse de cualquier número de los materiales conocidos. Entre los ejemplos de estos materiales se incluyen: compuestos inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Entre los ejemplos específicos de estos materiales se incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio; geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similar (ver Merrifield, *Biochemistry* 3:1385-1390, 1964), poliacrilamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicona, plásticos, nitrocelulosa, celulosas, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio, plástico metálico, celulosa, dextranos reticulados (por ejemplo Sephadex™) y gel de agarosa (Sephacrose™) y soportes de fase sólida conocidos por los expertos en la materia. En una realización, el diámetro de la perla de captura de ADN se encuentra comprendido en el intervalo de 20 a 70 µm. En una realización preferente, el diámetro de la perla de captura de ADN se encuentra comprendido en el intervalo de 20 a 50 µm. En una realización más preferente, el diámetro de la perla de captura de ADN es aproximadamente 30 µm.

En un aspecto, se proporciona un método para generar un biblioteca de soportes sólidos, que comprende: (a) preparar una población de moldes de ADNmc según los métodos dados a conocer en la presente invención, (b) unir cada molde de ADN a un soporte sólido de manera que haya una molécula de ADN en cada soporte sólido, (c) amplificar la población de moldes monocatenarios de manera que la amplificación genere una población clonal de cada fragmento de ADN sobre cada soporte sólido, (d) secuenciar las poblaciones clonales de perlas.

En una realización, el soporte sólido es una perla de captura de ADN. En otra realización, el ADN es ADN genómico, ADNc o transcritos inversos de ARN vírico. El ADN puede unirse al soporte sólido, por ejemplo mediante un enlace biotina-estreptavidina, un enlace covalente o mediante hibridación de oligonucleótido complementario. En una realización, cada molde de ADN se liga a un conjunto de adaptadores universales. En otra realización, el par de adaptadores universales comprende una secuencia común de cebador de PCR, una secuencia común de extremos únicos; a continuación las moléculas monocatenarias se unen a un soporte sólido y se exponen a técnicas de amplificación para la expansión clonal de poblaciones. El ADN puede amplificarse mediante PCR.

En otro aspecto, la exposición proporciona una biblioteca de soportes sólidos preparada mediante los métodos descritos en la presente invención.

El molde de ácidos nucleicos (por ejemplo el molde de ADN) preparado mediante dicho método puede utilizarse para muchos procedimientos biológicos moleculares, tales como la extensión lineal, la amplificación de círculo rodante, la PCR y la secuenciación. Este método puede llevarse a cabo en una reacción de ligamiento, por ejemplo mediante la utilización de una proporción molar elevada de perlas a ADN. La captura de moléculas de ADN monocatenario seguirá una distribución de Poisson y resultará en un subconjunto de perlas sin ADN unido y un subconjunto de perlas con dos moléculas de ADN unidas. En una realización preferente, habría una perla por cada molécula de ADN. Además, resulta posible incluir componentes adicionales en los adaptadores que podrían resultar útiles para manipulaciones adicionales de la biblioteca aislada.

## 2. Amplificación de ácido nucleico molde

Con el fin de secuenciar el ácido nucleico molde según los métodos de la presente invención y exposición, debe amplificarse el número de copia para generar un número suficiente de copias del molde para producir una señal detectable por el medio de detección de luz. Puede utilizarse cualquier medio de amplificación adecuado de ácidos nucleicos.

Se han descrito varias técnicas de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos. Estas metodologías de amplificación pueden clasificarse en aquellos métodos que: (i) requieren ciclado térmico: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver, por ejemplo, Saiki *et al.*, Science 230:1350-1354, 1995), reacción en cadena de la ligasa (ver, por ejemplo, Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193, 1991; Barringer *et al.*, Gene 89:117-122, 1990) y amplificación basada en la transcripción (ver, por ejemplo, Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989) e (ii) sistemas de amplificación isotérmica: replicación autosostenida de secuencias (ver, por ejemplo, Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990), el sistema de replicasa  $Q_{\beta}$  (ver, por ejemplo, Lizardi *et al.*, BioTechnology 6:1197-1202, 1988), la amplificación por desplazamiento de cadena (Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6, 11 de abril de 1992; y los métodos descritos en PNAS 89(1):392-6, 1 de enero de 1992; y NASBA, J. Virol. Methods. 35(3):273-86, diciembre de 1991).

En una realización, se utiliza la amplificación isotérmica. La amplificación isotérmica también incluye la amplificación basada en un círculo rodante (RCA). La RCA se comenta en, por ejemplo, Kool, patente US No. 5.714.320 y en Lizardi, patente US No. 5.854.033; Hatch *et al.*, Genet. Anal. Biomol. Engineer. 15:35-40, 1999. El resultado de la RCA es una única cadena de ADN extendida desde el extremo 3' del cebador de anclaje (y que de esta manera se encuentra unido a la matriz sólida de soporte) y que incluye un concatámero que contiene múltiples copias del molde circular hibridado a una secuencia de cebador. Típicamente, con la RCA pueden obtenerse 1.000 a 10.000 o más copias de moldes circulares, presentando cada uno tamaños de, por ejemplo, aproximadamente 30 a 500, 50 a 200 ó 60 a 100 nucleótidos.

El producto de la amplificación por RCA tras la hibridación de una molécula circular de ácido nucleico con un cebador de anclaje se muestra esquemáticamente en la figura 11A. Se hibrida un ácido nucleico circular molde 102 a un cebador de anclaje 104, que se ha unido a una superficie 106 en el extremo 5' del mismo y que presenta un OH 3' libre disponible para la extensión. El ácido nucleico circular de molde 102 incluye dos regiones adaptadoras 108 y 110 que son complementarias a regiones de secuencia en el cebador de anclaje 104. También se encuentran incluidos en el ácido nucleico circular de molde 102 una inserción 112 y una región 114 homóloga a un cebador de secuenciación, que se utiliza en las reacciones de secuenciación indicadas posteriormente.

Tras la hibridación, el OH 3' libre en el cebador de anclaje 104 puede extenderse utilizando secuencias en el ácido nucleico de molde 102. El cebador de anclaje 102 puede extenderse a lo largo del molde múltiples veces, añadiendo cada iteración a la secuencia extendida desde el cebador de anclaje, una secuencia complementaria al ácido nucleico circular de molde. Se muestran cuatro iteraciones o cuatro rondas de replicación de círculo rodante en la figura 11A como producto de amplificación del cebador de anclaje extendido 114. La extensión del cebador de anclaje resulta en un producto de amplificación unido covalentemente, o de otra manera unido físicamente al sustrato 106. Pueden utilizarse varias técnicas *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos para extender la secuencia del cebador de anclaje. La amplificación típicamente se lleva a cabo en presencia de una polimerasa, por ejemplo una ADN polimerasa o una ADN polimerasa dirigida por ARN, y uno, dos, tres o cuatro tipos de nucleótido trifosfato, y opcionalmente, proteínas auxiliares de unión. En general, puede utilizarse cualquier polimerasa capaz de extender un grupo 3' OH cebador con la condición de que carece de actividad exonucleasa 3' a 5'. Entre las polimerasas adecuadas se incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas de *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis* y *Thermus thermophilus*, el bacteriófago T4 y T7, y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Entre las ADN polimerasas dirigidas por ARN adecuadas se incluyen, por ejemplo, la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar, la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney y la transcriptasa inversa del virus I de la inmunodeficiencia humana.

Se muestran en más detalle realizaciones adicionales de moldes circulares y cebadores de anclaje en las figuras 11B a 11D. La figura 11B ilustra un sustrato lineal de círculo abierto hibridado que puede servir, tras la ligación, como molde para la extensión de un cebador de anclaje. Se hibrida una molécula de molde que presenta la secuencia 5'-tcg tgt gag gtc tca gca tct tat gta tat tta ctt cta ttc tca gtt gcc taa gct gca gcc a-3' (SEC ID NO:5) a un cebador de anclaje que presenta un líker de biotina en el extremo 5' del mismo y la secuencia 5'-gac ctc aca cga tgg ctg cag ctt-3' (SEC ID NO:6). La hibridación del molde resulta en la yuxtaposición de los extremos 5' y 3' de la molécula de molde. El 3' OH del cebador de anclaje puede extenderse utilizando el molde circular.

La utilización de un molde circular y un cebador de anclaje para la identificación de polimorfismos de nucleótidos individuales se muestra en la figura 11C. En esta figura se muestra un cebador de anclaje genérico que presenta la secuencia 5'-gac ctc aca cga tgg ctg cag ctt-3' (SEC ID NO:7). El cebador de anclaje se hibrida con una sonda SNP que presenta la secuencia 5'-ttt ata tgt att cta cga ctc tgg agt gtg cta ccg acg tgc aat ccg ttg act ctt atc ttc a-3' (SEC ID NO:8). La sonda SNP a su vez se hibrida con una región de una región que contiene SNP de un gen que presenta la secuencia 5'-cta gct cgt cgt aca tat aaa tga aga taa gat cct g-3' (SEC ID NO:9). La hibridación de una secuencia de ácidos nucleicos que contiene el polimorfismo con el complejo de la sonda SNP permite la ligación y circulación posteriores de la sonda SNP. La sonda SNP está diseñada para que sus extremos 5' y 3' se hibriden con la región genómica de

manera que se encuentre contiguos en la región del sitio polimórfico, tal como se indica en la figura 11C. La sonda SNP circularizada posteriormente puede extenderse y secuenciarse utilizando los métodos descritos en la presente invención. Un ácido nucleico sin el polimorfismo no se hibrida para que resulte la yuxtaposición de los extremo 5' y 3' de la sonda SNP. En este caso, la sonda SNP no puede ligarse para formar un sustrato circular necesario para la extensión posterior.

La figura 11D ilustra la utilización de un oligonucleótido de hueco conjuntamente con una molécula circular de molde. Se une un cebador de anclaje que presenta la secuencia 5'-gac ctc aca cga gta gca tgg ctg cag ctt-3' (SEC ID NO:10) a una superficie mediante un líker de biotina. Se hibrida una molécula de molde que presenta la secuencia 5'-tcg tgt gag gtc tca gca tct tat gta tat tta ctt cta ttc tca gtt gcc taa gct gca gcc a-3' (SEC ID NO:11) con el cebador de anclaje, resultando en una región parcialmente monocatenaria, o región con hueco, en el cebador de anclaje flanqueada por una región bicatenaria. Una molécula de hueco que presenta la secuencia 5'-tgc tac-3' seguidamente se hibrida al cebador de anclaje. La ligación de ambos extremos del oligonucleótido de hueco a la molécula de molde resulta en la formación de una molécula circular de ácido nucleico que puede actuar como molde para la amplificación por círculo rodante.

La RCA puede producirse al iniciarse en el origen la replicación de la molécula dúplex. Después, una muesca abre una de las cadenas y el grupo hidroxilo 3' terminal libre generado por la muesca es extendido por la acción de la ADN polimerasa. La cadena recién sintetizada eventualmente desplaza la cadena de ADN parental original. Este tipo de replicación anteriormente mencionado se conoce como replicación de círculo rodante (RCR) debido a que puede concebirse como el "rodaje" de la cadena molde circular y, en teoría, podría continuar de esta manera indefinidamente. Además, debido a que la cadena de ADN recién sintetizada se encuentra unida covalentemente al molde original, la cadena desplazada presenta la secuencia genómica original (por ejemplo un gen u otra secuencia de interés) en el extremo 5' terminal de la misma. En la RCR, tras la secuencia genómica original se encuentran una o más "unidades de replicación" complementarias a la secuencia molde original, en la que cada unidad de replicación se sintetiza continuando las revoluciones de dicha secuencia molde original. Por lo tanto, cada revolución posterior desplaza el ADN que se ha sintetizado en el ciclo de replicación anterior.

Mediante la utilización de la reacción RCA, puede generarse una cadena que representa muchas copias en tándem del complemento de la molécula circularizada. Por ejemplo, recientemente se ha utilizado la RCA para obtener una reacción de amplificación isotérmica en cascada de sondas padlock circularizadas *in vitro* con el fin de detectar genes de una única copia en muestras de ADN genómico humano (ver Lizardi *et al.*, Nat. Genet. 19:225-232, 1998). Además, también se ha utilizado la RCA para detectar moléculas individuales de ADN en un ensayo basado en una fase sólida, aunque surgieron dificultades al aplicar esta técnica a la hibridación *in situ* (ver Lizardi *et al.*, Nat. Genet. 19:225-232, 1998).

Si se desea, la RCA puede llevarse a cabo a temperaturas elevadas, por ejemplo a temperaturas superiores a 37°C, 42°C, 45°C, 50°C, 60°C o 70°C. Además, la RCA puede llevarse a cabo inicialmente a una temperatura inferior, por ejemplo a temperatura ambiente, y después trasladarse a una temperatura elevada. La RCA a temperatura elevada preferentemente se lleva a cabo con polimerasas termoestables de ácidos nucleicos y con cebadores que pueden hibridarse establemente y con especificidad a temperaturas elevadas.

También puede llevarse a cabo la RCA con oligonucleótidos no naturales, por ejemplo ácidos nucleicos de péptidos. Además, la RCA puede llevarse a cabo en presencia de proteínas auxiliares, tales como proteínas de unión monocatenarias.

El desarrollo de un método para la amplificación de moléculas cortas de ADN que han sido inmovilizadas en un soporte sólido, denominado RCA, ha sido descrito recientemente en la literatura (ver, por ejemplo, Hatch *et al.*, Genet. Anal. Biomol. Engineer. 15:35-40, 1999; Zhang *et al.*, Gene 211:277-85, 1998; Baner *et al.*, Nucl. Acids Res. 26:5073-5078, 1998; Liu *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 118:1587-1594, 1995; Fire y Xu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4641-4645, 1995; Nilsson *et al.*, Science 265:2085-2088, 1994). La RCA utiliza secuencias específicas de ADN mediante hibridación y una reacción de ADN ligasa. El producto circular seguidamente se utiliza como molde en una reacción de replicación de círculo rodante.

Entre otros ejemplos de sistemas de amplificación isotérmica se incluyen, por ejemplo, (i) la replicación autosostenida de secuencias (ver, por ejemplo, Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990), (ii) el sistema de replicasa  $Q_{\beta}$  (ver, por ejemplo, Lizardi *et al.*, BioTechnology 6:1197-1202, 1988) e (iii) la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA<sup>TM</sup>; ver Kievits *et al.*, J. Virol. Methods 35:273-286, 1991).

#### Amplificación por PCR de ácidos nucleicos molde

En una realización preferente, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") para generar copias adicionales de los ácidos nucleicos molde. La etapa de amplificación por PCR puede llevarse a cabo antes o después de la distribución de los ácidos nucleicos molde en la placa picotiter.

*Amplificación por PCR en emulsión de perlas*

En una realización preferente, se lleva a cabo una etapa de amplificación por PCR antes de la distribución de los ácidos nucleicos molde en la placa picotiter.

En una realización particularmente preferente, se lleva a cabo un nuevo sistema de amplificación, denominado en la presente invención “amplificación en emulsión de perlas” mediante la unión de un ácido nucleico molde (por ejemplo ADN) que debe amplificarse a un soporte sólido, preferentemente en forma de una perla generalmente esférica. Una biblioteca de ADN molde monocatenaria preparada según los métodos de preparación de muestras de la presente invención y exposición es un ejemplo de una fuente adecuada de la biblioteca de partida de ácidos nucleicos molde que deben unirse a una perla para la utilización en este método de amplificación.

La perla se une a un gran número de una única especie de cebador (es decir, cebador B en la figura 6) que es complementario a una región del ADN molde. El ADN molde se hibrida al cebador unido a la perla. Las perlas se suspenden en mezcla de reacción acuosa y después se encapsulan en una emulsión de agua en aceite. La emulsión está compuesta de microgotas discretas en la fase acuosa, de diámetro aproximado entre 60 y 200  $\mu\text{m}$ , incluidas en una fase aceite termoestable. Cada microgota contiene, preferentemente, solución de reacción de amplificación (es decir, los reactivos necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos). Un ejemplo de una amplificación sería una mezcla de reacción de PCR (polimerasa, sales, dNTPs) y un par de cebadores de PCR (cebador A y cebador B). Ver la figura 6A. Un subconjunto de la población de microgotas también contiene la perla de ADN que comprende el molde de ADN. Este subconjunto de microgotas es la base para la amplificación. Las microcápsulas que no se encuentran dentro de este subconjunto no presentan ADN de molde y no participarán en la amplificación. En una realización, la técnica de amplificación es la PCR y los cebadores de PCR se encuentran presentes en una proporción de 8:1 ó de 16:1 (es decir, 8 ó 16 de un cebador respecto a 1 del segundo cebador) para llevar a cabo una PCR asimétrica.

En la presente descripción general, el ADN se hibrida con un oligonucleótido (cebador B) que se encuentra inmovilizado en una perla. Durante el termociclado (figura 6B), el enlace entre el molde de ADN monocatenario y el cebador B inmovilizado en la perla se rompe, liberando el molde a la solución microencapsulada circundante. La solución de amplificación, en este caso la solución de PCR, contiene además cebadores A y B en fase solución. Los cebadores B en fase solución se unen fácilmente a la región b' complementaria del molde debido a que la cinética de la unión es más rápida para los cebadores en fase solución que para los cebadores inmovilizados. En la PCR temprana, tanto la cadena A como la cadena B se amplifican igualmente bien (figura 6C).

Alcanzada la fase intermedia de la PCR (es decir, entre los ciclos 10 y 30), se han agotado los cebadores B, deteniendo la amplificación exponencial. A continuación, la reacción entra en amplificación asimétrica y la población de amplicones empieza a estar dominada por cadenas A (figura 6D). En la PCR de fase tardía (figura 6E), tras 30 a 40 ciclos, la amplificación asimétrica incrementa la concentración de cadenas A en solución. El exceso de cadenas A inicia la hibridación con los cebadores B inmovilizados sobre perlas. Seguidamente las polimerasas termoestables utilizan la cadena A como molde para sintetizar una cadena B unida a una perla, inmovilizada, del amplicón.

En la PCR de fase final (figura 6F), la continuación del ciclado térmico fuerza la hibridación adicional con cebadores unidos a perlas. La amplificación en fase solución puede ser mínima alcanzada esta etapa, pero la concentración de cadenas B inmovilizadas se incrementa. A continuación, se rompe la emulsión y el producto inmovilizado se convierte en monocatenario por desnaturalización (debido a calor, al pH, etc.) que elimina la cadena A complementaria. Los cebadores A se hibridan con la región A' de la cadena inmovilizada y la cadena inmovilizada se carga con enzimas de secuenciación y cualquier proteína accesoria necesaria. Seguidamente se secuencian las perlas utilizando técnicas de pirofosfato reconocidas (descritas, por ejemplo, en las patentes US 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

*Diseño del molde*

En una realización preferida, el ADN molde que debe amplificarse mediante amplificación en emulsión de perlas puede ser una población de ADN tal como, por ejemplo, una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADNc. Resulta preferente que cada miembro de la población presente una secuencia de ácidos nucleicos común en el primer extremo y una secuencia de ácidos nucleicos común en un segundo extremo. Lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, mediante ligación de una primera secuencia de ADN adaptador a un extremo y una segunda secuencia de ADN adaptador a un segundo extremo de la población de ADN. Muchas bibliotecas de ADN y de ADNc, en virtud de la naturaleza del vector de clonación (por ejemplo Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA) encajan en dicha descripción, en la que presentan una secuencia común en un primer extremo y una segunda secuencia común en un segundo extremo de cada ADN miembro. El ADN molde puede presentar cualquier tamaño que pueda someterse a amplificación *in vitro* (incluyendo las técnicas de amplificación preferentes de la PCR y la PCR asimétrica). En una realización preferente, el ADN molde presenta un tamaño comprendido entre 150 y 750 pb, tal como, por ejemplo aproximadamente 250 pb.



*Unión de ácido nucleico de molde a perlas de captura*

En una primera etapa, se une un ácido nucleico monocatenario de molde a una perla de captura. El ácido nucleico molde puede unirse al soporte sólido de la perla de captura de cualquier manera conocida de la técnica. Existen numerosos métodos de la técnica para unir ADN a un soporte sólido, tal como la perla microscópica preferente.

La unión química covalente del ADN a la perla puede conseguirse mediante la utilización de agentes de acoplamiento estándares, tales como carbodiimida soluble en agua, para unir el fosfato 5' en el ADN a perlas de captura recubiertas de amina mediante un enlace fosfoamidato. Otra alternativa es acoplar en primer lugar linkers oligonucleótidos específicos a la perla utilizando una reacción similar, y después utilizar ADN ligasa para unir el ADN al linker sobre la perla. Entre otras reacciones de enlace para unir el oligonucleótido a las perlas se incluyen la utilización de N-hidroxisuccinamida (NHS) y derivados de la misma. En este tipo de métodos, un extremo del oligonucleótido puede contener un grupo reactivo (tal como un grupo amida) que forma un enlace covalente con el soporte sólido, mientras que el otro extremo del linker contiene un segundo grupo reactivo que puede unirse con el oligonucleótido que debe inmovilizarse. En una realización preferente, el oligonucleótido se une a la perla de captura de ADN mediante enlace covalente. Sin embargo, los enlaces no covalentes, tales como la quelación o los complejos de antígeno-anticuerpo, también pueden utilizarse para unir el oligonucleótido a la perla.

Pueden utilizarse linkers oligonucleótidos que se hibridan específicamente a secuencias únicas en el extremo del fragmento de ADN, tal como el extremo solapante de un sitio de enzima de restricción o los "extremos pegajosos" de los vectores de clonación basados en el bacteriófago lambda, aunque también puede utilizarse favorablemente ligaciones de extremos romos. Estos métodos se describen en detalle en la patente US 5.674.743. Resulta preferido que cualquier método utilizado para inmovilizar perlas continúe uniendo el oligonucleótido inmovilizado durante las etapas en los métodos de la invención y de la exposición.

En una realización, cada perla de captura se diseña para que presente una pluralidad de ácidos nucleicos cebadores que reconozcan (es decir, que sean complementarios) a una porción del ácido nucleico de molde, y de esta manera el ácido nucleico molde se hibrida con la perla de captura. En los métodos descritos en la presente invención, se desea la amplificación clonal de la especie molde, de manera que resulta preferente que únicamente un ácido nucleico molde único se una a una perla de captura cualquiera.

Las perlas utilizadas en la presente invención puede ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de uno o más de entre los materiales conocidos. Entre los ejemplos de estos materiales se incluyen: compuestos inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Entre los ejemplos específicos de estos materiales se incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similar (tal como se describe, por ejemplo, en Merrifield, *Biochemistry* 3:1385-1390, 1964), poliacrilamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicona, plásticos, nitrocelulosa, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poro controlado, metales, dextranos reticulados (por ejemplo Sephadex<sup>TM</sup>), gel de agarosa (Sepharose<sup>TM</sup>) y soportes de fase sólida conocidos por el experto en la materia. En una realización preferente, las perlas de captura son perlas de sefarosa de diámetro aproximado comprendido entre 25 y 40  $\mu\text{m}$ .

*Emulsificación*

Las perlas de captura con ácido nucleico monocatenario de molde unido se emulsionan en forma de emulsión termoestable de agua en aceite. La emulsión puede formarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido de la técnica. Un método para crear la emulsión se describe posteriormente, aunque puede utilizarse cualquier método para preparar una emulsión. Estos métodos son conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen métodos con adyuvantes, métodos en contraflujo, métodos en corriente cruzada, métodos de tambores giratorios y métodos de membrana. Además, el tamaño de las microcápsulas puede ajustarse modificando el caudal y velocidad de los componentes. Por ejemplo, en la adición gota a gota, puede modificarse el tamaño de las gotas y el tiempo total de administración. Preferentemente la emulsión contiene una densidad de perlas "microrreactores" de aproximadamente 3.000 perlas por microlitro.

La emulsión preferiblemente se genera mediante suspensión de las perlas con molde unido en solución de amplificación. Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "solución de amplificación" se refiere a una mezcla suficiente de reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ADN molde. Un ejemplo de una solución de amplificación, una solución de amplificación por PCR, se proporciona en los Ejemplos, posteriormente; se apreciará que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones de la solución de PCR.

En una realización, la mezcla de perlas/solución de amplificación se añade gota a gota en una mezcla para agitación de aceite biocompatible (por ejemplo aceite mineral ligero, Sigma) y se permite que se emulsione. El aceite utilizado puede suplementarse con uno o más estabilizadores de emulsión biocompatibles. Entre estos estabilizadores de emulsión se incluyen Atlox 4912, Span 80 y otros estabilizadores adecuados reconocidos y disponibles comercialmente. Preferiblemente las gotas formadas presentan un tamaño comprendido entre 5 micrómetros y 500 micrómetros, más preferentemente entre aproximadamente 50 y 300 micrómetros, y más preferentemente entre 100 y 150 micrómetros.

El tamaño de los microrreactores no se encuentra limitado. Los microrreactores deben ser suficientemente grandes para incluir suficientes reactivos de amplificación para el grado de amplificación requerido. Sin embargo, los microrreactores deben ser suficientemente pequeños de manera que pueda amplificarse una población de microrreactores, conteniendo cada uno un miembro de una biblioteca de ADN, con equipos de laboratorio convencionales (por ejemplo equipos de termociclado de PCR, probetas, incubadores y similares).

Con las limitaciones indicadas anteriormente, el diámetro óptimo de un microrreactor puede encontrarse comprendido entre 100 y 200 micrómetros. Los microrreactores de este tamaño permitirían la amplificación de una biblioteca de ADN que comprende aproximadamente 600.000 miembros en una suspensión de microrreactores de volumen inferior a 10 ml. Por ejemplo, si se seleccionase como método de amplificación la PCR, 10 ml podrían caber en 96 tubos de un termociclador regular con capacidad para 96 tubos. En una realización preferente, la suspensión de 600.000 microrreactores presentaría un volumen inferior a 1 ml. Una suspensión de menos de 1 ml podría amplificarse en aproximadamente 10 tubos de un termociclador convencional de PCR. En una realización más preferente, la suspensión de 600.000 microrreactores podría presentar un volumen inferior a 0,5 ml.

### Amplificación

Tras la encapsulación, el ácido nucleico molde puede amplificarse mediante cualquier método adecuado de amplificación de ADN, incluyendo los sistemas de amplificación basados en la transcripción (Kwoh D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:1173, 1989; Gingeras T.R. *et al.*, solicitud de patente PCT WO 88/10315; Davey C. *et al.*, solicitud de patente europea publicada No. 329.822; Miller H.I. *et al.*, solicitud de patente PCT WO 89/06700), la PCR “race” (Frohman M.A., en: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, NY, 1990) y la “PCR unilateral” (Ohara O. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:5673-5677, 1989). Pueden utilizarse otros métodos todavía menos comunes, tales como la amplificación de “dioligonucleótido”, la amplificación isotérmica (Walker G.T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:392-396, 1992) y la amplificación por círculo rodante (revisado en la patente US 5.714.320).

En una realización preferente, la amplificación del ADN se lleva a cabo mediante PCR. La PCR puede llevarse a cabo mediante encapsulación del ácido nucleico diana, unido a una perla, con una solución de PCR que comprende todos los reactivos necesarios para la PCR. A continuación, la PCR puede llevarse a cabo mediante exposición de la emulsión a cualquier régimen de termociclado conocido de la técnica. En una realización preferida, se llevan a cabo entre 30 y 50 ciclos, preferentemente aproximadamente 40 ciclos. Resulta deseable, aunque no necesario, que tras el procedimiento de amplificación se lleven a cabo uno o más ciclos de hibridación y extensión tras los ciclos de amplificación. En una realización preferente, se llevan a cabo entre 10 y 30 ciclos, preferentemente aproximadamente 25 ciclos de hibridación y extensión. Rutinariamente el ADN molde se amplifica hasta la inmovilización por perla de típicamente por lo menos dos millones a cincuenta millones de copias, preferentemente aproximadamente diez millones a treinta millones de copias del ADN molde.

### Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

Tras la amplificación del molde, la emulsión se “rompe” (también denominada “demulsificación” en la técnica). Existen muchos métodos para romper una emulsión (ver, por ejemplo, la patente US 5.989.892 y las referencias citadas en la misma) y un experto en la materia sería capaz de seleccionar el método apropiado. Un método preferente para romper la emulsión es añadir aceite adicional para provocar que la emulsión se separe en dos fases. A continuación, se separa la fase aceite y se añade un solvente orgánico adecuado (por ejemplo hexanos). Tras mezclar, se separa la fase aceite/solvente orgánico. Esta etapa puede repetirse varias veces. Finalmente, se separan las capas acuosas situadas en la parte superior de las perlas. Seguidamente se lavan las perlas con una mezcla de solvente orgánico/tampón de hibridación (por ejemplo se indica un tampón de hibridación adecuado en los ejemplos) y después se lava nuevamente en tampón de hibridación. Entre los solvente orgánicos adecuados se incluyen alcoholes tales como metanol, etanol y similares.

Las perlas que contienen molde amplificadas seguidamente pueden resuspenderse en solución acuosa para la utilización, por ejemplo, en una reacción de secuenciación según las tecnologías conocidas (ver Sanger F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5463-5467, 1977; Maxam A.M. & Gilbert W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560-564, 1977; Ronaghi M. *et al.*, Science 281:363-365, 1998; Lysov I. *et al.*, Dokl. Akad. Nauk. SSSR 303:1508-1511, 1988; Bains W. & Smith G.C., J. Theor. Biol. 135:303-307, 1988; Drnanac R. *et al.*, Genomics 4:114-128, 1989; Khrapko K.R. *et al.*, FEBS Lett. 256:118-122, 1989; Pevzner P.A., J. Biomol. Struct. Dyn. 7:63-73, 1989; Southern E.M. *et al.*, Genomics 13:1008-1017, 1992. En el caso de que deban utilizarse las perlas en una reacción de secuenciación basada en pirofosfato (descrita, por ejemplo, en las patentes US 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891), resultará necesario eliminar la segunda cadena del producto de PCR e hibridar un cebador de secuenciación con el molde monocatenario que se encuentra unido a la perla.

Brevemente, la segunda cadena se elimina mediante fusión utilizando cualquiera de entre varios métodos comúnmente conocidos, tales como NaOH, fuerza iónica baja (por ejemplo salina) o procesamiento térmico. Tras esta etapa de fusión, las perlas se peletizan y se descarta el sobrenadante. Las perlas se resuspenden en un tampón de hibridación, se añade el cebador de secuenciación y se hibrida con el molde monocatenario unido a una perla, utilizando un ciclo de hibridación estándar.

### Purificación de las perlas

En este punto, el ADN amplificado sobre la perla puede secuenciarse directamente sobre la perla o en un recipiente de reacción diferente. En una realización, el ADN se secuencia directamente sobre la perla mediante transferencia de la misma a un recipiente de reacción y sometiendo el ADN a una reacción de secuenciación (por ejemplo la secuenciación con pirofosfato o la secuenciación Sanger). Alternativamente, las perlas pueden aislarse y el ADN puede separarse de cada perla y secuenciarse. En cualquier caso, las etapas de secuenciación pueden llevarse a cabo en cada perla individual. Sin embargo, este método, aunque comercialmente viable y técnicamente factible, podría no resultar el más eficaz debido a que muchas perlas serán perlas negativas (perlas sin ADN amplificado unido a ellas). De acuerdo con lo anterior, puede utilizarse el procedimiento opcional siguiente para separar las perlas que no contienen ácido nucleico de molde antes de la distribución sobre la placa picotiter.

Un porcentaje elevado de las perlas puede ser “negativo” (es decir, no presentar ácido nucleico de molde amplificado unido a las mismas) si el objetivo de la unión inicial del ADN es minimizar el número de perlas con dos copias diferentes de ADN. Para una secuenciación con pirofosfato útil, cada perla debería contener múltiples copias de una única especie de ADN. Este requisito se cumple más estrechamente maximizando el número total de perlas con un único fragmento de ADN unido (antes de la amplificación). Este objetivo puede conseguirse mediante la observación de un modelo matemático.

Para el caso general de un número “N” de ADNs distribuidos aleatoriamente entre un número M de perlas, la población de perlas relativa que contiene cualquier número dado de ADNs depende de la proporción N/M. La fracción de perlas que contiene N ADNs, R(N), puede calcularse utilizando la distribución de Poisson:

$$R(N) = \exp(-N/M) \times (N/M)^N / N! \quad (\text{en donde } X \text{ es el símbolo de multiplicación})$$

La tabla a continuación muestra algunos valores calculados para diversas proporciones N/M (la proporción media de fragmento de ADN a perla) y N (el número de fragmentos realmente unidos a una perla):

N/M	0,1	0,5	1	2
R(0)	0,9	0,61	0,37	0,13
R(1)	0,09	0,3	0,37	0,27
R(N>1)	0,005	0,09	0,26	0,59

En la tabla, la fila superior indica las diversas proporciones de N/M. R(0) indica la fracción de perlas sin ADN, R(1) indica la fracción de perlas con un ADN unido (antes de la amplificación) y R(N>1) indica la fracción de ADN con más de un ADN unido (antes de la amplificación).

La tabla indica que la fracción máxima de perlas que contiene un único fragmento de ADN es 0,37 (37%) y se observa a una proporción de fragmento a perlas de uno. En esta mezcla, aproximadamente 63% de las perlas resulta inútil para la secuenciación debido a que no presentan ADN o presentan más de una especie de ADN. Además, el control de la proporción de fragmento a perla requiere cálculos complejos y la variabilidad podría producir lotes de perlas con una fracción significativamente menor de perlas utilizables.

Dicha ineficiencia podría reducirse significativamente si las perlas que contienen amplicón (originadas en la unión de por lo menos un fragmento) pudiesen separarse de aquellas sin amplicón (originadas en perlas sin fragmentos unidos). Se define amplicón como cualquier molécula de ácido nucleico producida mediante una técnica *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos. La unión se realizaría a proporciones medias de fragmento a perla bajas (N/M<1), minimizando la proporción de perlas con más de un ADN unido. Una etapa de separación eliminaría la mayoría o la totalidad de las perlas sin ADN, dejando una población de perlas enriquecida en perlas con una especie de ADN amplificado. Estas perlas pueden utilizarse con cualquier método de amplificación, tal como, por ejemplo, la secuenciación con pirofosfato. Debido a que la fracción de perlas con un amplicón (N=1) se ha enriquecido, cualquier método de secuenciación resultaría más eficiente.

A título de ejemplo, con una proporción media de fragmento a perla de 0,1, el 90% de las perlas no contendrán amplicón, el 9% de las perlas resultaría útil, con un amplicón y el 0,5% de las perlas presentaría más de un amplicón. Un procedimiento de enriquecimiento de la invención o de la exposición eliminaría el 90% de las perlas con cero amplicones, dejando una población de perlas en la que la fracción secuenciable (N=1) sería:

$$1 - (0,005/0,09) = 94\%$$

La dilución de la mezcla de fragmentos en perlas, conjuntamente con la separación de las perlas que contienen amplicón, puede rendir un enriquecimiento de 2,5 veces respecto al método no enriquecido óptimo (94%/37% (ver la tabla, anteriormente, N/M=1)=2,5. Un beneficio adicional del procedimiento de enriquecimiento es que la fracción

final de perlas secuenciables es relativamente insensible a la variabilidad de N/M. De esta manera, los complejos cálculos para derivar la proporción N/M óptima resultan innecesarios o pueden llevarse a cabo con un nivel de precisión menor. Lo anterior finalmente provocará que el procedimiento resulte más adecuado para ser realizado por personal de menor cualificación o para la automatización. Un beneficio adicional del procedimiento es que las perlas con  
 5 cero amplicones pueden reciclarse y reutilizarse. Aunque el reciclado no resulta necesario, puede reducir el coste o el volumen total de reactivos, permitiendo que el método resulte más adecuado para algunos fines, tales como, por ejemplo, el muestreo portátil, el muestreo robotizado teledirigido y similares. Además, todas las ventajas del procedimiento (es decir, personal menos cualificado, automatización, reciclado de los reactivos) reducirá el coste del procedimiento. El procedimiento se describe en más detalle posteriormente.

10 El procedimiento de enriquecimiento puede utilizarse para tratar perlas que han sido amplificadas en el método de emulsión de perlas, anteriormente. La amplificación se diseña de manera que cada molécula amplificada contenga la misma secuencia de ADN en el extremo 3' de la misma. La secuencia de nucleótidos puede ser 20-mero, aunque puede ser cualquier secuencia de 15 ó más bases, tal como 25 bases, 30 bases, 35 bases o 40 bases, o más larga.  
 15 Naturalmente, aunque los extremos de oligonucleótidos más largos resultan funcionales, no resultan necesarios. Un experto en la materia puede introducir esta secuencia de ADN en el extremo de un ADN amplificado. Por ejemplo, si se utiliza PCR para la amplificación del ADN, la secuencia puede ser parte de un miembro de la pareja de cebadores de PCR.

20 Un esquema del procedimiento de enriquecimiento se ilustra en la figura 7. En ésta, la perla unida a amplicón mezclada con 4 perlas vacías representa la mezcla de perlas para amplificación con dilución de fragmentos. En la etapa 1, se hibrida con el amplicón un cebador biotinilado complementario al extremo 3' del amplicón. En la etapa 2, se añaden ADN polimerasa y los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) naturales a la mezcla de perlas y se extiende el cebador biotinilado. Esta extensión se realiza para incrementar la unión entre el cebador biotinilado y el  
 25 ADN unido a perla. Esta etapa puede omitirse si el enlace cebador biotinilado-ADN es fuerte (por ejemplo en un ambiente de fuerza iónica elevada). En la etapa 3, las perlas recubiertas de estreptavidina susceptibles de atracción por un campo magnético (denominado en la presente invención "perlas con estreptavidina magnéticas") se introducen en la mezcla de perlas. Las perlas magnéticas se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo de Dynal (M290). Los grupos de captura de la estreptavidina se unen a biotinas hibridadas a los amplicones, que después fijan específicamente  
 30 las perlas unidas a amplicones a las perlas con estreptavidina magnéticas.

En la etapa 5, se aplica un campo magnético (representado por un imán) próximo a la mezcla de reacción, que causa que la totalidad de los "complejos de perlas con estreptavidina magnéticas/amplicones unidos" se sitúen a lo largo del lado de la probeta más próximo al campo magnético. También se espera que las perlas magnéticas sin amplicón unido  
 35 se sitúen a lo largo del mismo lado. Las perlas sin amplicón permanecen en solución. La mezcla de perlas se lava y las perlas no inmovilizadas por el imán (es decir, las perlas vacías) se separan y se descartan. En la etapa 6, la cadena de cebador biotinilado extendido se separa de la cadena del amplicón mediante "fusión", una etapa que puede llevarse a cabo, por ejemplo, con calor o una modificación del pH. El tratamiento térmico puede ser de 60°C bajo condiciones de baja concentración salina (por ejemplo en un ambiente de baja fuerza iónica, tal como 0,1X SSC). La modificación  
 40 del pH puede llevarse a cabo mediante la adición de NaOH. A continuación, la mezcla se lava y el sobrenadante, que contiene las perlas con amplicón unido, se recuperan, mientras que las perlas magnéticas no unidas resultan retenidas por un campo magnético. Las perlas enriquecidas resultantes pueden utilizarse para la secuenciación del ADN. Se indica que el cebador sobre la perla de captura de ADN puede ser igual al cebador de la etapa 2, anteriormente. En este caso, la hibridación de las cadenas complementarias de amplicón-cebador (con o sin extensión) es la fuente de la  
 45 afinidad de perla de captura y diana.

La pareja biotina-estreptavidina podría sustituirse por una diversidad de parejas de perla de captura-diana. Son dos categorías las parejas cuya unión puede cortarse posteriormente y aquéllas que se unen irreversiblemente, bajo condiciones que son realizables de manera práctica. Entre las parejas cortables se incluyen tiol-tiol, digoxigenina/anti-digoxigenina, -Captavidin<sup>TM</sup> en caso de que se desee el corte del complejo de diana-perla de captura.  
 50

Tal como se ha descrito anteriormente, la etapa 2 es opcional. En caso de omitirse la etapa 2, puede no resultar necesaria la separación de las perlas magnéticas de las perlas con amplicón unido. Las perlas con amplicón unido, con las perlas magnéticas enlazada, pueden utilizarse directamente para la secuenciación. Si la secuenciación debe llevarse  
 55 a cabo en un micropocillo, la separación no resultaría necesaria en el caso de que el complejo de perla con amplicón unido-perla magnética cabe en el interior del micropocillo.

Aunque la utilización de las perlas de captura magnética resulta conveniente, los grupos de captura pueden unirse a otras superficies. Por ejemplo, la estreptavidina podría unirse químicamente a una superficie, tal como la superficie interior de un tubo. En este caso, puede hacerse fluir la mezcla de perlas amplificada. Las perlas con amplicón unido tenderán a resultar retenidas hasta la "fusión", mientras que las perlas vacías fluirán a través del tubo hasta salir. Esta disposición puede resultar particularmente ventajosa para automatizar el procedimiento de preparación de perlas.

Aunque las realizaciones descritas anteriormente resultan particularmente útiles, pueden contemplarse otros métodos para separar las perlas. Por ejemplo, las perlas de captura pueden marcarse con un grupo fluorescente que convierta el complejo de diana-perla de captura en fluorescente. El complejo de diana-perla de captura puede separarse mediante citometría de flujo o separación celular por fluorescencia. La utilización de perlas de captura grandes permitiría la separación mediante filtración u otras técnicas de separación por tamaño de partícula. Debido a que las perlas tanto  
 65

de captura como diana son capaces de formar complejos con varias otras perlas, resulta posible aglutinar una masa de perlas de captura-diana reticuladas. El gran tamaño de la masa aglutinada haría posible la separación mediante simple lavado de las perlas vacías no aglutinadas. Los métodos descritos se describen en más detalle, por ejemplo, en Bauer J., J. Chromatography B 722:55-69, 1999, y en Brody *et al.*, Applied Physics Lett. 74:144-146, 1999.

Las perlas de captura del ADN, conteniendo cada una múltiples copias de una única especie de ácido nucleico molde, preparadas de acuerdo con el método anterior, resultan adecuadas para la distribución sobre la placa picotiter.

#### Amplificación de ácidos nucleicos en la placa picotiter

En una realización alternativa, el ácido nucleico molde se distribuye sobre la placa picotiter antes de la amplificación y después se amplifica *in situ* sobre la placa picotiter. Este método se describe en detalle en los Ejemplos.

#### 3. Secuenciación del ácido nucleico molde

La secuenciación con pirofosfato se utiliza de acuerdo con los métodos de la presente invención y exposición para secuencia el ácido nucleico molde. Esta técnica se basa en la detección del pirofosfato liberado (Ppi) durante la síntesis del ADN (ver, por ejemplo, Hyman, A new method of sequencing DNA, Anal. Biochem. 174:423-36, 1988; Ronaghi, Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing, Genome Res. 11:3-11, 2001).

En una cascada de reacciones enzimáticas, se genera luz visible en magnitud proporcional al número de nucleótidos incorporados. La cascada se inicia con una reacción de polimerización de ácidos nucleicos en la que se libera Ppi con la incorporación de nucleótidos por la polimerasa. La ATP sulfurilasa convierte el Ppi liberado en ATP, que proporciona energía a la luciferasa para oxidar la luciferina y generar luz. Debido a que se conoce cuál es el nucleótido añadido, puede determinarse la secuencia del molde. La secuenciación con pirofosfato en fase sólida utiliza ADN inmovilizado en un sistema de tres enzimas (ver las figuras). Para incrementar la relación señal a ruido, se sustituye el dATP natural por dATP $\alpha$ S. Típicamente dATP $\alpha$ S es una mezcla de dos isómeros (Sp y Rp); la utilización de isómero 2'-desoxiadenosina-5'-O-(1-tiotrifosfato)Sp puro en la secuenciación con pirofosfato permite lecturas sustancialmente más largas, incluso doblando la longitud de lectura.

#### 4. Aparato para la secuenciación de ácidos nucleicos

La presente exposición proporciona un aparato para la secuenciación de ácidos nucleicos, que comprende generalmente una o más cámaras de reacción para llevar a cabo una reacción de secuenciación, un medio para administrar la entrada y salida de reactivos a la cámara o cámaras de reacción, y un medio para detectar un suceso de reacción de secuenciación. En otra realización, el aparato incluye una cubeta de administración de reactivo, que contiene una pluralidad de cavidades sobre una superficie plana. En una realización preferente, el aparato se encuentra conectado a por lo menos un ordenador para controlar los componentes individuales del aparato y para almacenar y/o analizar la información obtenida a partir de la detección del suceso de reacción de secuenciación.

La exposición también proporciona una o más cámaras de reacción dispuestas sobre un material de sustrato inerte, también denominado en la presente invención "soporte sólido", que permite la localización discreta del ácido nucleico molde y de los reactivos en una reacción de secuenciación en un espacio definido, así como la detección del suceso de reacción de secuenciación. De esta manera, tal como se utiliza en la presente invención, las expresiones "cámara de reacción" o "cámara de reacción de analito" se refiere a un área localizada sobre el material de sustrato que facilita la interacción de los reactivos, por ejemplo en una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos. Tal como se comenta más completamente después, las reacciones de secuenciación contempladas por la invención y exposición preferentemente se producen en numerosas muestras individuales de ácidos nucleicos en tándem, en particular en numerosas muestras de ácidos nucleicos en secuenciación simultánea derivadas de moldes de ácidos nucleicos (por ejemplo ADN) genómicos y cromosómicos.

Por lo tanto, el aparato de la exposición preferentemente comprende un número suficiente de cámaras de reacción para llevar a cabo numerosas reacciones individuales de secuenciación. En una realización, existen por lo menos 10.000 cámaras de reacción, preferentemente por lo menos 50.000 cámaras de reacción, más preferentemente más de 100.000 cámaras de reacción, todavía más preferentemente más de 200.000 cámaras de reacción.

Debido a que el número de reacciones de secuenciación simultáneas se encuentra limitado por el número de cámaras de reacción, puede incrementarse la producción mediante la fabricación de placas que contengan densidades incrementadas de pocillos. La tabla a continuación muestra esta progresión para áreas activas de 14x43 mm y 30x60 mm, derivadas de paneles de 25x75 mm y 40x75 mm, respectivamente.

TABLA

*Desarrollo de paneles de número de pocillos más elevado*

Espaciado	Pocillo	n° de pocillos	n° de pocillos
( $\mu\text{m}$ )	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	(14 x 43 mm)	(30 x 60 mm)
50	44	275 K	800 K
43	38	375 K	1,2 M
35	31	575 K	1,6 M
25	22	1,1 M	3,2 M

Las cámaras de reacción en el panel típicamente adoptan la forma de una cavidad o pocillo en el material de sustrato, que presenta una anchura y profundidad, en la que pueden depositarse reactivos. Típicamente el ácido nucleico molde se distribuye en la cámara de reacción sobre uno o más soportes sólidos o perlas; los reactivos se encuentran en un medio que facilita la reacción y que fluye a través de la cámara de reacción. Al formarse como cavidades o pocillos, las cámaras preferentemente presentan dimensiones y orden suficientes para permitir: (i) la introducción de los reactivos necesarios en las cámaras, (ii) que tengan lugar reacciones dentro de la cámara, e (iii) la inhibición de la mezcla de reactivos entre cámaras. La forma del pocillo o cavidad preferentemente es circular o cilíndrica, aunque puede presentar múltiples caras, de manera que presente una forma aproximadamente circular o cilíndrica. En una realización preferente, la forma del pocillo o cavidad es sustancialmente hexagonal. La cavidad puede presentar una superficie lisa de las paredes. En una realización adicional, la cavidad puede presentar por lo menos una superficie de pared irregular. Las cavidades pueden presentar un fondo plano o un fondo cóncavo.

Las cámaras de reacción pueden espaciarse por distancias de entre  $5\ \mu\text{m}$  y  $200\ \mu\text{m}$ . El espaciado se determina midiendo la distancia centro a centro entre dos cámaras de reacción contiguas. Típicamente las cámaras de reacción pueden espaciarse por distancias de entre  $10\ \mu\text{m}$  y  $150\ \mu\text{m}$ , preferentemente de entre  $20\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$ , más preferentemente de entre  $40\ \mu\text{m}$  y  $60\ \mu\text{m}$ . En una realización, las cámaras de reacción presentan una anchura (diámetro) en una dimensión de entre  $0,3\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$ , preferentemente de entre  $20\ \mu\text{m}$  y  $70\ \mu\text{m}$ , y todavía más preferentemente de entre aproximadamente  $30\ \mu\text{m}$  y  $50\ \mu\text{m}$ . La profundidad de las cámaras de reacción preferentemente es de entre  $10\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$ , preferentemente de entre  $20\ \mu\text{m}$  y  $60\ \mu\text{m}$ . Alternativamente, las cámaras de reacción pueden presentar una profundidad entre 0,25 y 5 veces la anchura en una dimensión de la cámara de reacción o, en otra realización, entre 0,3 y 1 vez la anchura en una dimensión de la cámara de reacción.

En una realización preferida, el panel se fabrica a partir de un haz cortado de fibras ópticas (es decir, un haz de cables de fibra óptica fusionados) y las cámaras de reacción se forman mediante grabado de una superficie del panel reactor de fibra óptica. Las cavidades también pueden formarse en el sustrato mediante grabado, moldeo o micromecanización.

Cada cavidad o cámara de reacción típicamente presenta una profundidad de entre  $10\ \mu\text{m}$  y  $100\ \mu\text{m}$ ; alternativamente, la profundidad es de entre 0,25 y 5 veces la anchura de la cavidad, preferentemente de entre 0,3 y 1 vez la anchura de la cavidad.

En una realización, los paneles descritos en la presente invención típicamente incluyen una superficie superior plana y una superficie del fondo plana, que es ópticamente conductora, de manera que las señales ópticas procedentes de las cámaras de reacción puedan detectarse a través de la superficie del fondo plana. En estos paneles, típicamente la distancia entre la superficie superior y la superficie del fondo no es superior a 10 cm, preferentemente no superior a 2 cm, y habitualmente de entre 0,5 mm y 5 mm, más preferentemente de aproximadamente 2 mm.

En una realización particularmente preferida, el soporte sólido se denomina placa picotiter, con cámaras de reacción que presentan un espacio centro a centro de entre aproximadamente  $43\ \mu\text{m}$  y  $50\ \mu\text{m}$ , un diámetro de pocillo de entre  $38\ \mu\text{m}$  y  $44\ \mu\text{m}$ , y un volumen de pocillo de entre 10 y 150 pL, preferentemente de entre 20 y 90 pL, más preferentemente de entre 40 y 85 pL, y todavía más preferentemente de aproximadamente 75 pL.

En una realización, cada cavidad o cámara de reacción del panel contiene reactivos para analizar un ácido nucleico o proteína. Típicamente aquellas cámaras de reacción que contengan un ácido nucleico (no resulta necesario que todas las cámaras de reacción en el panel contengan uno) contengan únicamente una sola especie de ácido nucleico (es decir, una especie individual que resulta de interés). Puede encontrarse una única copia de esta especie de ácido nucleico en cualquier cámara de reacción particular, o pueden encontrarse múltiples copias. Generalmente resulta preferente que una cámara de reacción contenga por lo menos 100.000 copias de la secuencia molde de ácidos nucleicos, preferentemente por lo menos 1.000.000 copias, y más preferentemente entre 2.000.000 y 20.000.000 copias, y todavía más preferentemente entre 5.000.000 y 15.000.000 copias del ácido nucleico. El experto ordinario en la materia apreciará que las modificaciones del número de copias de una especie de ácido nucleico en cualquiera de las cámaras de reacción afectará al número de fotones generados en una reacción de pirosecuenciación, y puede ajustarse rutinariamente para proporcionar una señal de más o menos fotones según resulte necesario. En una realización, la especie de ácido

nucleico se amplifica para proporcionar el número deseado de copias utilizando la PCR, la RCA, la reacción en cadena de la ligasa, otra amplificación isotérmica u otro medio convencional de amplificación de ácidos nucleicos. En una realización el ácido nucleico es monocatenario.

5

### *Material de soporte sólido*

Puede utilizarse cualquier material como el material de soporte sólido, con la condición de que la superficie permita la unión estable de los cebadores y la detección de las secuencias de ácidos nucleicos. El material de soporte sólido puede ser plano o pueden haberse formado cavidades, por ejemplo en un extremo cavitado de una fibra óptica o en un micropocillo grabado, moldeado u de otra manera micromecanizado en la superficie plana, por ejemplo utilizando técnicas de uso común en la construcción de sistemas microelectromecánicos (ver, por ejemplo, Rai-Choudhury, Handbook of microlithography, micromachining and microfabrication, volume I: Microlithography, volumen PM39, SPIE Press, 1997; Madou, CRC Press, Aoki, Biotech. Histochem. 67:98-9, 1992; Kane *et al.*, Biomaterials 20:2363-76, 1999; Deng *et al.*, Anal. Chem. 72:3176-80, 2000; Zhu *et al.*, Nat. Genet. 26:283-9, 2000. En algunas realizaciones, el soporte sólido es ópticamente transparente, por ejemplo vidrio.

Puede construirse un panel de sitios de unión en un soporte sólido ópticamente transparente utilizando técnicas litográficas utilizadas comúnmente en la construcción de circuitos electrónicos integrados, tal como se describe en, por ejemplo, las técnicas de unión descritas en las patentes US Nos. 5.143.854, 5.445.934, 5.744.305 y 5.800.992; Chee *et al.*, Science 274:610-614, 1996; Fodor *et al.*, Nature 364:555-556, 1993; Fodor *et al.*, Science 251:767-773, 1991; Gushin *et al.*, Anal. Biochem. 250:203-211, 1997; Kinoshita *et al.*, Cell 93:21-24, 1998; Kato-Yamada *et al.*, J. Biol. Chem. 273:19375-19377, 1998, y Yasuda *et al.*, Cell 93:1117-1124, 1998. La fotolitografía y litografía de chorro electrónico sensibilizan el soporte sólido o sustrato con un grupo de enlace que permite la unión de una biomolécula modificada (por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos) (ver, por ejemplo, Service, Science 283:27-28, 1999; Rai-Choudhury, Handbook of microlithography, micromachining and microfabrication, volume I: Microlithography, volumen PM39, SPIE Press, 1997. Alternativamente, puede generarse un panel de sitios sensibilizados utilizando tecnología de película fina, tal como se describe en Zasadzinski *et al.*, Science 263:1726-1733, 1994.

El material de sustrato preferentemente está realizado en un material que facilita la detección del suceso de reacción. Por ejemplo, en una reacción de secuenciación típica, la unión de un dNTP a una muestra de ácidos nucleicos que debe secuenciarse puede seguirse mediante la detección de los fotones generados por acción enzimática sobre el fosfato liberado en la reacción de secuenciación. De esta manera, que el material de sustrato esté realizado de un material transparente o conductor de la luz facilita la detección de los fotones.

35

En algunas realizaciones, el soporte sólido puede acoplarse a un haz de fibras ópticas que se utilizan para detectar y transmitir la luz del producto. El número total de fibras ópticas en el haz puede modificarse de manera que se corresponda con el número de cámaras de reacción individuales en el panel utilizado en la reacción de secuenciación. El número de fibras ópticas incorporado en el haz se diseña para que se corresponda con la resolución de un dispositivo de detección de manera que permita la formación de imágenes 1:1. Los tamaños totales de los haces se seleccionan para optimizar el área utilizable del dispositivo de detección manteniendo las características (de flujo) de reactivo deseables en la cámara de reacción. De esta manera, para un panel CCD (dispositivo de carga acoplada) de 4.096 x 4.096 píxeles con píxeles de 15  $\mu\text{m}$ , el haz de fibras se selecciona para que sea de aproximadamente 60 mm x 60 mm o para que presente un diámetro de aproximadamente 90 mm. El número deseado de fibras ópticas inicialmente se fusiona en un haz o panel de fibra óptica, el extremo del cual puede cortarse y pulirse de manera que forme una "oblea" del grosor requerido (por ejemplo 1,5 mm). Las obleas de fibra óptica resultantes presentan propiedades de manipulabilidad similares a las de una lámina de vidrio. Las fibras individuales puede presentar cualquier diámetro (por ejemplo 3  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ).

En algunas realizaciones se utilizan dos haces de fibra óptica: un primer haz se une directamente al dispositivo de detección (también denominado en la presente invención *haz de fibras* o *conector*) y un segundo haz se utiliza como el sustrato de la cámara de reacción (la *oblea* o *sustrato*). En este caso los dos se ponen en contacto directo, opcionalmente utilizando fluido de acoplamiento óptico con el fin de formar una imagen de los centros de reacción sobre el dispositivo de detección. Si se utiliza un CCD como dispositivo de detección, la oblea podría ser ligeramente más grande con el fin de maximizar la utilización del área del CCD, o ligeramente más pequeño con el fin de ajustarse al formato de un portaobjetos de microscopía típico, 25 mm x 75 mm. Los diámetros de las fibras individuales en los haces se seleccionan de manera que maximicen la probabilidad de que se forme la imagen de una reacción individual en un único píxel en el dispositivo de detección, dentro de las limitaciones del alcance de la técnica. Son diámetros ejemplares 6 a 8  $\mu\text{m}$  para el haz de fibras y 6 a 50  $\mu\text{m}$  para la oblea, aunque puede utilizarse cualquier diámetro comprendido en el intervalo de entre 3 y 100  $\mu\text{m}$ . Pueden obtenerse haces de fibra comercialmente de fabricantes de cámaras CCD. Por ejemplo, la oblea puede obtenerse de Incom, Inc. (Charlton, MA) y cortarse y pulirse a partir de una fusión grande fibras ópticas, típicamente de un grosor de 2 mm, aunque pueden presentar un grosor de 0,5 a 5 mm. La oblea presenta propiedades de manipulabilidad similares a las de una lámina de vidrio o de un portaobjetos de microscopía de vidrio.

65

Pueden formarse cámaras de reacción en el sustrato realizado en material de fibra óptica. La superficie de la fibra óptica se cavita mediante tratamiento de los extremos de un haz de fibras, por ejemplo con ácido, para formar una indentación en el material de fibra óptica. De esta manera, en una realización se forman cavidades en un haz de

5 fibras ópticas, preferentemente pueden formarse cavidades mediante grabado de un extremo del haz de fibras ópticas. Cada superficie con cavidad puede formar una cámara de reacción. Este tipo de paneles se denominan en la presente invención, paneles reactores de fibra óptica, o FORA. La indentación presenta una profundidad comprendida entre aproximadamente medio diámetro de una fibra óptica individual y dos a tres veces el diámetro de la fibra. Pueden  
10 introducirse cavidades en los extremos de las fibras introduciendo una cara de la oblea de fibras ópticas en un baño de ácido durante un periodo variable de tiempo. El periodo de tiempo puede variar dependiendo de la profundidad total de la cavidad de reacción deseada (ver, por ejemplo Walt *et al.*, Anal. Chem. 70:1888, 1996). Una cavidad de canal amplio puede presentar dimensiones de velocidad de flujo uniforme de aproximadamente 14 mm x 43 mm. De esta manera, con esta dimensión aproximada y a una densidad de aproximadamente  $4,82 \times 10^{-4}$  cavidades/ $\mu\text{m}^2$ , el aparato puede  
15 presentar aproximadamente 290.000 cavidades fluidamente accesibles. Son conocidos de la técnica varios métodos para unir moléculas (y detectar las moléculas unidas) en las cavidades grabadas en los extremos de los haces de fibras ópticas (ver, por ejemplo, Michael *et al.*, Anal. Chem. 70:1242-1248, 1998; Ferguson *et al.*, Nature Biotechnology 14:1681-1684, 1996; Healey y Walt, Anal. Chem. 69:2213-2216, 1997). También puede crearse un patrón de sitios reactivos en el micropocillo utilizando técnicas fotolitográficas similares a las utilizadas en la generación de un patrón de almohadillas de reacción sobre un soporte plano (ver Healey *et al.*, Science 269:1078-1080, 1995; Munkholm y Walt, Anal. Chem. 58:1427-1430, 1986, y Bronk *et al.*, Anal. Chem. 67:2750-2757, 1995).

La cara opuesta de la oblea de fibra óptica (es decir, la cara no grabada) típicamente se pule intensamente para permitir el acoplamiento óptico (por ejemplo con aceite de inmersión u otros líquidos de acoplamiento óptico) a un  
20 segundo haz de fibras ópticas. Este segundo haz de fibras ópticas se corresponde exactamente con el diámetro de la oblea óptica que contiene las cámaras de reacción y sirve de conducto para la transmisión de la luz producida al dispositivo de detección acoplado, tal como un sistema de formación de imágenes CCD o una cámara.

En una realización preferente, la oblea de fibras ópticas se limpia intensivamente, por ejemplo mediante lavados en serie en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 15%/NH<sub>4</sub>OH al 15% volumen:volumen en solución acuosa, y después seis enjuagues con agua desionizada, después EDTA 0,5 M, después seis de agua desionizada, después  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 15%/NH<sub>4</sub>OH al 15%, después  
25 agua desionizada (incubaciones de media hora en cada lavado).

La superficie de la oblea de fibras ópticas preferentemente se recubre para facilitar su utilización en las reacciones de secuenciación. Una superficie recubierta preferentemente es ópticamente transparente, permite la fácil unión de  
30 proteínas y ácidos nucleicos y no afecta negativamente a la actividad de las proteínas inmovilizadas. Además, la superficie preferentemente minimiza la absorción no específica de macromoléculas e incrementa la estabilidad de las macromoléculas unidas (por ejemplo ácidos nucleicos y proteínas unidas).

Entre los materiales adecuados para el recubrimiento del panel se incluyen, por ejemplo, plástico (por ejemplo poliestireno). El plástico preferentemente puede recubrirse por rotación o por bombardeo (grosor: 0,1  $\mu\text{m}$ ). Entre  
35 otros materiales para recubrir el panel se incluyen capas de oro, por ejemplo oro de 24 quilates, de 0,1  $\mu\text{m}$  de grosor, con monocapas autoensamblantes adsorbidas de alcanotioles de cadena larga. A continuación, la biotina se acopla covalentemente a la superficie y se satura con una proteína ligante de biotina (por ejemplo estreptavidina o avidina).

Entre los materiales de recubrimiento además pueden incluirse aquellos sistemas utilizados para unir un cebador de anclaje a un sustrato. También pueden utilizarse reactivos organosilano, que permiten el acoplamiento covalente  
40 directo de proteínas mediante grupos amino, sulfhidrilo o carboxilo, para recubrir el panel. Entre las sustancias de recubrimiento adicionales se incluyen linkers fotorreactivos, por ejemplo la fotobiotina (Amos *et al.*, "Biomaterial Surface Modification Using Photochemical Coupling Technology", en: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, parte A: Materials, Wise *et al.* (editores), New York, Marcel Dekker, páginas 895-926, 1995).

Entre los materiales de recubrimiento adicionales se incluyen los geles de polímero hidrofílico (poliacrilamida, polisacáridos), que preferentemente se polimerizan directamente sobre la superficie, o cadenas de polímero unidas  
50 covalentemente tras la polimerización (Hjerten, J. Chromatogr. 347:191, 1985; Novotny, Anal. Chem. 62:2478, 1990), así como los polímeros plurónicos (copolímeros tribloque, por ejemplo PPO-PEO-PPO, también conocidos como F-108), adsorbidos específicamente a superficies de poliestireno o de vidrio silanizado (Ho *et al.*, Langmuir 14:3889-94, 1998), así como capas pasivamente adsorbidas de proteínas ligantes de biotina. La superficie también puede recubrirse con un epóxido que permita el acoplamiento de reactivos mediante un enlace amina.

Además, cualquiera de los materiales anteriormente indicados puede derivatizarse con uno o más grupos funcionales comúnmente conocidos de la técnica para la inmovilización de enzimas y nucleótidos, por ejemplo grupos  
55 quelantes de metales (por ejemplo nitrilo de ácido triacético, ácido iminodiacético, quelante pentadentado), que se unen a proteínas etiquetadas con 6xHis y con ácidos nucleicos.

Pueden utilizarse recubrimientos superficiales que incrementan el número de sitios de unión disponibles para  
60 tratamientos posteriores, por ejemplo la unión de enzimas (comentada posteriormente), más allá de la capacidad de unión teórica de una superficie 2D.

En una realización preferente, las fibras ópticas individuales utilizadas para generar el haz de fibras ópticas fusionadas/oblea presentan un diámetro mayor (es decir, 6  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ ) que las utilizadas en el sistema óptico de formación de imágenes (es decir, 3  $\mu\text{m}$ ). De esta manera, pueden utilizarse varias de las fibras ópticas de formación de imágenes  
65 para formar una imagen de un único sitio de reacción.



## ES 2 330 339 T3

En una realización particularmente preferida, el cartucho para muestras para la secuenciación de ácidos nucleicos de molde, denominado "placa PicoTiter" se forma a partir de una placa frontal comercial de fibra óptica, grabada al ácido para formar estructuras de pocillo. Cada núcleo de fibra óptica presenta un diámetro de aproximadamente 44 micrómetros, con un revestimiento de 2 a 3 micrómetros, formando cada pocillo mediante grabado al ácido para formar un volumen de pocillo de reacción de aproximadamente 65 a 85 pL, más preferentemente de aproximadamente 75 pL. La utilización de pocillos grabados sobre una placa frontal de fibra óptica presenta tres objetivos: i) la difusión retrasada de la luminiscencia procedente de la luz emitida en una región diferente del panel, ii) el aislamiento de las cámaras de reacción ("tubos de ensayo") que contienen las moléculas de molde amplificadas, e iii) acoplamiento óptico con el CCD muy eficiente de elevada apertura numérica. Finalmente, cuanto mayor es la cantidad de molde de secuenciación inmovilizado dentro de un pocillo, mayor es la señal óptica que puede conseguirse.

### *Medio de administración*

Un ejemplo de medio para administrar reactivos en la cámara de reacción es la cámara de perfusión ilustrada en la figura 13. La cámara de perfusión incluye un compartimiento sellado con caras superior e inferior transparentes. Esta diseñada para permitir el flujo de solución sobre la superficie del sustrato y para permitir el rápido intercambio de reactivos. De esta manera, resulta adecuado para llevar a cabo, por ejemplo, reacciones de secuenciación con pirofosfato. La forma y dimensiones de la cámara pueden ajustarse para optimizar el intercambio de reactivos para incluir el intercambio de flujo global, el intercambio difusivo o ambos en un régimen de flujo laminar o turbulento.

La cámara de perfusión preferentemente se desconecta del sistema de formación de imágenes durante su preparación y únicamente se conecta durante la realización del análisis de secuenciación. En una realización, el soporte sólido (es decir, un chip o portaobjetos de ADN) se sostiene en una carcasa de metal o plástico que puede montarse o desmontarse para permitir la sustitución de dicho soporte sólido. La cara inferior del soporte sólido de la cámara de perfusión porta el panel de cámaras de reacción y, con un sistema focal de base óptica tradicional, se utiliza una lente objetivo de elevada apertura numérica para enfocar la imagen del panel de centros de reacción en el sistema CCD de formación de imágenes.

De esta manera pueden analizarse muchas muestras en paralelo. Utilizando el método de la invención o exposición, pueden analizarse muchos ácidos nucleicos molde de esta manera, permitiendo que la solución que contiene los enzimas y un nucleótido fluya sobre la superficie, y después detectando la señal producida para cada muestra. A continuación, este procedimiento puede repetirse. Alternativamente, pueden distribuirse varios oligonucleótidos diferentes complementarios al molde sobre la superficie, seguido de la hibridación del molde. La incorporación de desoxinucleótidos o dideoxinucleótidos puede seguirse para cada oligonucleótido a partir de la señal producida utilizando los diversos oligonucleótidos como cebadores. Mediante la combinación de las señales de diferentes áreas de la superficie, pueden llevarse a cabo análisis basados en secuencias en cuatro ciclos de reacciones de polimerasa utilizando los diversos dideoxinucleótidos.

En el caso de que el soporte presenta la forma de un panel cavitado, por ejemplo en los extremos de una placa picotiter u otro panel de micropocillos, entre los medios de administración adecuados para los reactivos se incluyen el flujo y el lavado y también, por ejemplo, el flujo, la pulverización, la electropulverización, la administración por chorros, el estampado, la atomización ultrasónica (Sonotek Corp., Milton, NY) y el rodado. En el caso de que se utilice la pulverización, los reactivos pueden administrarse en la placa picotiter en una capa fina homogénea producida con boquillas de pulverización de tipo industrial (Spraying Systems, Co., Wheaton, IL) o atomizadores utilizados en la cromatografía en capa fina (TLC), tal como el pulverizador CAMG TLC (Camag Scientific Inc., Wilmington, NC). Estos pulverizadores atomizan los reactivos en partículas pulverizadas de aerosol con tamaños comprendidos entre 0,3 y 10  $\mu\text{m}$ .

Las etapas sucesivas de administración de reactivos preferentemente se encuentran separadas por etapas de lavado utilizando técnicas comúnmente conocidas de la técnica. Estos lavados pueden llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando los métodos anteriormente indicados, incluyendo pulverizadores de flujo elevado o mediante un flujo líquido sobre la placa picotiter u la superficie del panel de micropocillos. Los lavados pueden realizarse en cualquier periodo de tiempo tras hacer reaccionar el material de partida con el reactivo para formar un producto en cada cámara de reacción, aunque antes de que el reactivo administrado en cualquiera de las cámaras de reacción haya salido por difusión de la cámara de reacción hacia el interior de cualquier otra cámara de reacción. En una realización, cualquier cámara de reacción es independiente del producto formado en cualquier otra cámara de reacción, aunque se genera utilizando uno o más reactivos comunes.

Una realización de un aparato completo se ilustra en la figura 12. El aparato incluye un conducto de entrada 200 en comunicación con una cámara de perfusión desconectable 226. El conducto de entrada 200 permite la entrada de reactivos de secuenciación mediante una pluralidad de tubos 202-212, cada uno de los cuales se encuentra en comunicación con una pluralidad de recipientes de dispensación de reactivos de secuenciación 214-224.

Se introducen reactivos a través del conducto 200 hacia el interior de la cámara de perfusión 226 utilizando un sistema presurizado o bombas para producir un flujo positivo. Típicamente los caudales de reactivo se encuentran comprendidos entre 0,05 y 50 ml/minuto (por ejemplo entre 1 y 50 ml/minuto) con volúmenes de entre 0,100 ml y flujo continuo (para el lavado). Las válvulas se encuentran bajo control computerizado para permitir el ciclado de

nucleótidos y reactivos de lavado. Los reactivos de secuenciación, por ejemplo la polimerasa, pueden encontrarse premezclados con nucleótidos o añadirse en un flujo. Un distribuidor reúne la totalidad de los seis tubos 202-212 en un tubo para la alimentación de la cámara de perfusión. De esta manera, varias entradas de administración de reactivo permiten el acceso a la cámara de perfusión. Por ejemplo, una de las entradas puede utilizarse para permitir la introducción de los reactivos acuosos de secuenciación, mientras que otra entrada permite que estos reactivos (y cualquier producto de reacción) se extraiga de la cámara de perfusión.

En una realización preferida, se administran uno o más reactivos en un panel inmovilizado o unido a una población de soportes sólidos móviles, por ejemplo perlas o microesferas. La perla o microesfera no es necesario que sea esférica, pueden utilizarse perlas de forma irregular. Típicamente se construyen a partir de numerosas sustancias, por ejemplo plástico, vidrio o cerámica y con tamaños de perla comprendidos entre nanómetros y milímetros, dependiendo de la anchura de la cámara de reacción. Pueden utilizarse diversas composiciones de perlas, por ejemplo metilestireno, poliestireno, polímero acrílico, látex, paramagnéticas, óxido de torio en solución, carbono de grafito y dióxido de titanio. La construcción o química de la perla puede seleccionarse para facilitar la unión del reactivo deseado.

En otra realización, los agentes bioactivos se sintetizan en primer lugar, y después se unen covalentemente a las perlas. Tal como apreciará el experto en la materia, lo anterior se lleva a cabo dependiendo de la composición de los agentes bioactivos y de las perlas. La funcionalización de las superficies del soporte sólido, tales como determinados polímeros con grupos químicamente reactivos, tales como tioles, aminas, carboxilos, etc. es generalmente conocida de la técnica.

En una realización preferida, el ácido nucleico molde se administra en la placa picotiter sobre las perlas. Los enzimas luciferasa y sulfurilasa se administran de manera similar en cada pocillo sobre las perlas (ver la figura), al igual que la ADN polimerasa. Se indica que puede administrarse uno o más de entre el ácido nucleico molde, la luciferasa y la sulfurilasa, cada uno en perlas separadas, o conjuntamente sobre la misma perla. Para permitir la secuenciación del ADN a temperaturas elevadas, los presentes inventores clonaron y modificaron la sulfurilasa termoestable de *Bacillus steareothermophilus*. También clonaron y modificaron varios enzimas luciferasa para la actividad enzimática en fase sólida, incluyendo *P. pennsylvanica* y *P. pyralis*. La luciferasa de *P. pyralis* se utiliza en una realización preferente.

Pueden utilizarse perlas “de blanco” que presentan una química superficial que facilita la unión de la funcionalidad deseada por parte del usuario. Entre los ejemplos adicionales de estas químicas superficiales para las perlas de blanco se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, grupos amino, incluyendo las aminas alifáticas y aromáticas, ácidos carboxílicos, aldehídos, amidas, grupos clorometilo, hidrazina, grupos hidroxilo, sulfonatos y sulfatos.

Dichos grupos funcionales pueden utilizarse para añadir cualquier número de diferentes agentes candidatos a las perlas, generalmente utilizando químicas conocidas. Por ejemplo, pueden unirse agentes candidatos que contienen carbohidratos a un soporte funcionalizado con amina; el aldehído del carbohidrato se prepara utilizando técnicas estándares, y después el aldehído se hace reaccionar con un grupo amino sobre la superficie. En una realización alternativa puede utilizarse un líncr sulfhidrilo. Varios líncrs reactivos con sulfhidrilo son conocidos de la técnica, tales como SPDP, maleimidas,  $\alpha$ -haloacetilos y disulfuros de piridilo (ver, por ejemplo, el catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre agentes reticulantes, páginas 155 a 200) que pueden utilizarse para unir agentes proteicos que contienen cisteína al soporte. Alternativamente puede utilizarse un grupo amino en el agente candidato para la unión a un grupo amino sobre la superficie. Por ejemplo, son bien conocidos de la técnica un gran número de grupos bifuncionales estables, incluyendo líncrs homobifuncionales y heterobifuncionales (ver el catálogo y manual de Pierce, páginas 155 a 200). En una realización adicional, pueden derivatizarse grupos carboxilo (de la superficie o del agente candidato) utilizando líncrs bien conocidos (ver el catálogo de Pierce). Por ejemplo, las carbodimidas activan grupos carboxilo para el ataque por nucleófilos buenos, tales como aminas (ver Torchilin *et al.*, Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 7(4):275-308, 1991). También pueden unirse agentes candidatos proteicos utilizando otras técnicas conocidas de la técnica, por ejemplo para la unión de anticuerpos a polímeros; ver Slinkin *et al.*, Bioconj. Chem. 2:342-348, 1991; Torchilin *et al.*, *supra*; Trubetskoy *et al.*, Bioconj. Chem. 3:323-327, 1992; King *et al.*, Cancer Res. 54:6176-6185, 1994; y Wilbur *et al.*, Bioconjugate Chem. 5:220-235, 1994. Debe entenderse que los agentes candidatos pueden unirse de una diversidad de maneras, incluyendo aquéllas indicadas anteriormente. Preferentemente, el modo de unión no altera significativamente la funcionalidad del agente candidato, es decir, el agente candidato debe unirse de una manera suficientemente flexible para permitir la interacción del mismo con una diana.

Son conocidas de la técnica algunas técnicas específicas para inmovilizar enzimas sobre perlas. En un caso, se utilizan perlas de química superficial de  $\text{NH}_2$ . La activación superficial se consigue con glutaraldehído al 2,5% en solución salina tamponada con fosfato (10 mM), proporcionando un pH de 6,9 (NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM). Esta mezcla se agita en un agitador durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las perlas se enjuagan con agua ultrapura más Tween 20 (surfactante) al 0,01%-0,02% y se enjuagan nuevamente con PBS más Tween 20 al 0,01%, pH 7,7. Finalmente se añade el enzima a la solución preferentemente tras la prefiltración utilizando un filtro Micropure de Amicon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La población de soportes sólidos móviles se organiza en las cámaras de reacción. En algunas realizaciones 5% a 20% de las cámaras de reacción pueden presentar un soporte sólido móvil con por lo menos un reactivo inmovilizado sobre el mismo, 20% a 60% de las cámaras de reacción pueden presentar un soporte sólido móvil con por lo menos un reactivo inmovilizado sobre el mismo, o 50% a 100% de las cámaras de reacción puede presentar un soporte

sólido móvil con por lo menos un reactivo inmovilizado sobre el mismo. Preferentemente por lo menos una cámara de reacción presenta un soporte sólido móvil que presenta por lo menos un reactivo inmovilizado sobre el mismo y el reactivo resulta adecuado para la utilización en una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos.

5 En algunas realizaciones el reactivo inmovilizado en el soporte sólido móvil puede ser un polipéptido con actividad sulfurilasa, un polipéptido con actividad luciferasa o un polipéptido quimérico que presenta actividades tanto sulfurilasa como luciferasa. En una realización, puede ser una proteína de fusión de ATP sulfurilasa y luciferasa. Debido a que el producto de la reacción de la sulfurilasa resulta consumido por la luciferasa, puede conseguirse la proximidad entre estos dos enzimas uniendo covalentemente los dos enzimas en la forma de una proteína de fusión. Esto resultaría  
10 útil no sólo para la canalización de sustrato, sino también para la reducción de los costes de producción y doblando potencialmente el número de sitios de unión en las perlas recubiertas de estreptavidina.

En otra realización, la sulfurilasa es una ATP sulfurilasa termoestable. En una realización preferente, la sulfurilasa termoestable se encuentra activa a temperaturas superiores a la ambiente (hasta por lo menos 50°C). En una realización,  
15 la ATP sulfurilasa procede de un termófilo. En una realización adicional, el soporte sólido móvil puede presentar un primer reactivo y un segundo reactivo inmovilizados sobre el mismo, el primer reactivo es un polipéptido con actividad sulfurilasa y el segundo reactivo es un polipéptido con actividad luciferasa.

En otra realización, el reactivo inmovilizado en el soporte sólido móvil puede ser un ácido nucleico; preferentemente el ácido nucleico es un concatámero monocatenario. En una realización preferente, el ácido nucleico puede utilizarse para secuenciar un ácido nucleico, por ejemplo una reacción de pirosecuenciación.

También se proporciona un método para detectar o cuantificar la actividad de ATP utilizando un soporte sólido móvil; preferentemente el ATP puede detectarse o cuantificarse como parte de una reacción de secuenciación de  
25 ácidos nucleicos.

En la figura 15 se muestra una placa picotiter que ha sido “tapizada” con soportes sólidos móviles con ácidos nucleicos o enzimas reactivos unidos a dichos sólidos.

30

## 5. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos

A continuación, se lleva a cabo la secuenciación basada en pirofosfatos. La secuencia de ADN de muestra y el cebador de extensión seguidamente se someten a una reacción de polimerasa en presencia de un nucleótido trifosfato, en el que el nucleótido trifosfato únicamente resultará incorporado y liberará pirofosfato (PPi) en el caso de que sea  
35 complementario a la base en la posición diana, añadiendo el nucleótido trifosfato a alícuotas separadas de mezcla de muestra-cebador o sucesivamente a la misma mezcla de muestra-cebador. Seguidamente se detecta la liberación de PPi para indicar qué nucleótido se ha incorporado.

En una realización, se determina una región de la secuencia producto mediante hibridación de un cebador de secuenciación con una región del ácido nucleico molde, y después poniendo en contacto el cebador de secuenciación con una ADN polimerasa y un nucleótido trifosfato conocido, es decir dATP, dCTP, dGTP, dTTP o un análogo de uno de estos nucleótidos. La secuencia puede determinarse mediante la detección de un producto secundario de la reacción de secuenciación, tal como se describe posteriormente.

45

El cebador de secuenciación puede presentar cualquier longitud o composición de bases, con la condición de que resulte capaz de hibridarse específicamente a una región del ácido nucleico molde amplificado. No resulta necesaria ninguna estructura particular para el cebador de secuenciación con la condición de que resulte capaz de cebar específicamente una región del ácido nucleico molde amplificado. Preferentemente, el cebador de secuenciación es  
50 complementario a una región del molde que se encuentra entre la secuencia que debe caracterizarse y la secuencia hibridable con el cebador de anclaje. El cebador de secuenciación se extiende con la ADN polimerasa, formando una secuencia producto. La extensión se lleva a cabo en presencia de uno o más tipos de nucleótido trifosfato y, en caso que se desee, proteínas de unión auxiliares.

La incorporación del dNTP se determina preferentemente mediante ensayo para la presencia de un producto secundario de secuenciación. En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos del producto de secuenciación se determina mediante la medición del pirofosfato inorgánico (PPi) liberado de un nucleótido trifosfato (dNTP) a medida que el dNMP se incorpora en un cebador de secuenciación extendido. Este método de secuenciación, denominado tecnología Pyrosequencing™ (PyroSequencing AB, Estocolmo, Suecia), puede llevarse a cabo en solución (fase líquida) o en forma de técnica en fase sólida. Los métodos de secuenciación basados en PPi se describen de manera general en, por ejemplo, el documento WO 98/13523A1; Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 242:84-89, 1996; Ronaghi *et al.*, Science 281:363-365, 1998, y el documento USSN 2001/0024790.

Ver también, por ejemplo, las patentes US 6.210.891 y 6.258.568. El pirofosfato liberado bajo estas condiciones puede detectarse enzimáticamente (por ejemplo mediante la generación de luz en la reacción de luciferasa-luciferina). Este tipo de métodos permite identificar un nucleótido en una posición diana dada, y secuenciar el ADN de manera simple y rápida, evitando simultáneamente la necesidad de electroforesis y la utilización de marcajes radioactivos, potencialmente peligrosos.

65

El PPi puede detectarse mediante varias metodologías diferentes, y se han descrito con anterioridad diversos métodos enzimáticos (ver, por ejemplo, Reeves *et al.*, Anal. Biochem. 28:282-287, 1969; Guillory *et al.*, Anal. Biochem. 39:170-180, 1971; Johnson *et al.*, Anal. Biochem. 15:273, 1968; Cook *et al.*, Anal. Biochem. 91:557-565, 1978; y Drake *et al.*, Anal. Biochem. 94:117-120, 1979).

El PPi liberado como resultado de la incorporación de un dNTP por una polimerasa puede convertirse en ATP utilizando, por ejemplo, una ATP sulfúrilasa. Este enzima se ha identificado que se encuentra implicado en el metabolismo del azufre. El azufre, tanto en forma reducida como oxidada, es un nutriente mineral esencial para el crecimiento vegetal y animal (ver, por ejemplo, Schmidt y Jager, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:325-349, 1992). Tanto en plantas como en microorganismos, tras la incorporación activa de sulfato se produce la reducción a sulfuro. Debido a que el sulfato presenta un potencial de oxidación/reducción muy reducido comparado con los reductores celulares disponibles, la etapa primaria en la asimilación requiere su activación mediante una reacción dependiente de ATP (ver, por ejemplo, Leyh, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28:515-542, 1993). La ATP sulfúrilasa (ATP: sulfato adenililtransferasa; EC 2.7.7.4) cataliza la reacción inicial en el metabolismo del sulfato inorgánico ( $\text{SO}_4^{2-}$ ); ver, por ejemplo, Robbins y Lipmann, J. Biol. Chem. 233:686-690, 1958; Hawes y Nicholas, Biochem. J. 133:541-550, 1973). En esta reacción,  $\text{SO}_4^{2-}$  resulta activado a adenosín-5'-fosfosulfato (APS).

La ATP sulfúrilasa ha sido altamente purificada a partir de varias fuentes, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (ver, por ejemplo, Hawes y Nicholas, Biochem. J. 133:541-550, 1973), *Penicillium chrysogenum* (ver, por ejemplo, Renosto *et al.*, J. Biol. Chem. 265:10300-10308, 1990), hígado de rata (ver, por ejemplo, Yu *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 269:165-174, 1989) y plantas (ver, por ejemplo, Shaw y Anderson, Biochem. J. 127:237-247, 1972; Osslund *et al.*, Plant Physiol. 70:39-45, 1982). Además, los genes de la ATP sulfúrilasa han sido clonados a partir de procariontes (ver, por ejemplo, Leyh *et al.*, J. Biol. Chem. 267:10405-10410, 1992; Schwedock y Long, Mol. Plant Microbe Interaction 2:181-194, 1989; Laue y Nelson, J. Bacteriol. 176:3723-3729, 1994), eucariotas (ver, por ejemplo, Cherest *et al.*, Mol. Gen. Genet. 210:307-313, 1987; Mountain y Korch, Yeast 7:873-880, 1991; Foster *et al.*, J. Biol. Chem. 269:19777-19786, 1994), plantas (ver, por ejemplo, Leustek *et al.*, Plant Physiol. 105:897-90216, 1994) y animales (ver, por ejemplo, Li *et al.*, J. Biol. Chem. 270:29453-29459, 1995). El enzima es un homooligómero o heterodímero, dependiendo de la fuente específica (ver, por ejemplo, Leyh y Suo, J. Biol. Chem. 267:542-545, 1992).

En algunas realizaciones se utiliza una sulfúrilasa termoestable. Las sulfúrilasas termoestables pueden obtenerse a partir de, por ejemplo, *Archaeoglobus* o *Pyrococcus* spp. Las secuencias de las sulfúrilasas termoestables se encuentran disponibles de la base de datos No. de acceso 028606, No. de acceso Q9YCR4 y No. de acceso P56863.

La ATP sulfúrilasa ha sido utilizada para muchas aplicaciones diferentes, por ejemplo la detección bioluminométrica de ADP a concentraciones elevadas de ATP (ver, por ejemplo, Schultz, Anal. Biochem. 215:302-304, 1993), el seguimiento continuo de la actividad de la ADN polimerasa (ver, por ejemplo, Nyrbn, Anal. Biochem. 167:235-238, 1987) y la secuenciación del ADN (ver, por ejemplo, Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 242:84-89, 1996; Ronaghi *et al.*, Science 281:363-365, 1998; Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 267:65-71, 1998).

Se han desarrollado varios ensayos para la detección de la reacción directa de la ATP sulfúrilasa. El ensayo colorimétrico de molibdolisis se basa en la detección del fosfato (ver, por ejemplo, Wilson y Bandurski, J. Biol. Chem. 233:975-981, 1958), mientras que el ensayo espectrofotométrico continuo de la molibdolisis se basa en la detección de la oxidación del NADH (ver, por ejemplo, Seubert *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 225:679-691, 1983; Seubert *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 240:509-523, 1985). Este último ensayo requiere la presencia de varios enzimas de detección. Además, también se han descrito en la literatura varios ensayos radioactivos (ver, por ejemplo, Daley *et al.*, Anal. Biochem. 157:389-395, 1986). Por ejemplo, un ensayo se basa en la detección del  $^{32}\text{PPi}$  liberado a partir de ATP marcado con  $^{32}\text{P}$  (ver, por ejemplo, Seubert *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 240:509-523, 1985) y otro en la incorporación de  $^{35}\text{S}$  en APS marcado con  $^{35}\text{S}$  (este ensayo también requiere APS quinasa purificada como enzima de acoplamiento; ver, por ejemplo, Seubert *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 225:679-691, 1983) y una tercera reacción depende de la liberación de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  a partir de APS marcado con  $^{35}\text{S}$  (ver, por ejemplo, Daley *et al.*, Anal. Biochem. 157:385-395, 1986).

Para la detección de la reacción inversa de la ATP sulfúrilasa, se han descrito con anterioridad un ensayo espectrofotométrico continuo (ver, por ejemplo, Segel *et al.*, Methods Enzymol. 143:334-349, 1987), un ensayo bioluminométrico (ver, por ejemplo, Balharry y Nicholas, Anal. Biochem. 40:1-17, 1971), un ensayo de liberación de  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  (ver, por ejemplo, Seubert *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 240:509-523, 1985) y un ensayo de incorporación de  $^{32}\text{PPi}$  (ver, por ejemplo, Osslund *et al.*, Plant Physiol. 70:39-45, 1982).

El ATP producido por una ATP sulfúrilasa puede hidrolizarse utilizando reacciones enzimáticas para generar luz. Las reacciones químicas emisoras de luz (es decir, la quimioluminiscencia) y las reacciones biológicas (es decir, la bioluminiscencia) se utilizan ampliamente en la bioquímica analítica para mediciones sensibles de diversos metabolitos. En las reacciones bioluminiscentes, la reacción química que conduce a la emisión de luz está catalizada enzimáticamente. Por ejemplo, el sistema de luciferina-luciferasa permite el ensayo específico del ATP y puede utilizarse el sistema bacteriano de luciferasa-oxidoreductasa para realizar el seguimiento del NAD(P)H. Ambos sistemas se han extendido al análisis de numerosas sustancias por medio de reacciones acopladas que implican la producción o utilización de ATP o NAD(P)H (ver, por ejemplo, Kricka, Chemiluminiscent and bioluminiscent techniques, Clin. Chem. 37:1472-1281, 1991).

El desarrollo de nuevos reactivos ha permitido obtener una emisión estable de luz proporcional a la concentración de ATP (ver, por ejemplo, Lundin, Applications of firefly luciferase, en: Luminescent Assays (Raven Press, New York), 1982, o NAD(P)H (ver, por ejemplo, Lovgren *et al.*, Continuous monitoring of NADH-converting reactions by bacterial luminescence, J. Appl. Biochem. 4:103-111). Con dichos reactivos estables de emisión de luz, resulta posible realizar ensayos de valoración y calibrar cada ensayo individual mediante la adición de una cantidad conocida de ATP o NAD(P)H. Además, un sistema estable emisor de luz también permite el seguimiento continuo de los sistemas conversores de ATP o de NAD(P)H.

Entre los enzimas adecuados para convertir ATP en luz se incluyen luciferasas, por ejemplo luciferasas de insecto. Las luciferasas producen luz como producto final de la catálisis. El enzima emisor de luz mejor conocido es el de la luciérnaga, *Photinus pyralis* (Coleoptera). El gen correspondiente ha sido clonado y expresado en bacterias (ver, por ejemplo, De Wet *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7870-7873, 1985) y en plantas (ver, por ejemplo, Ow *et al.*, Science 234:856-859, 1986), así como en insectos (ver, por ejemplo, Jha *et al.*, FEBS Lett. 274:24-26, 1990) y en células de mamífero (ver, por ejemplo, de Wet *et al.*, Mol. Cell. Biol. 7:725-737, 1987; Keller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3264-3268, 1987). Además, recientemente se han clonado varios genes de luciferasa procedentes del escarabajo de tecto jamaicano, *Pyroplorus plagiophilhalamus* (oleoptera) y se han caracterizado parcialmente (ver, por ejemplo, Wood *et al.*, J. Biolumin. Chemilumin. 4:289-301, 1989; Wood *et al.*, Science 244:700-702, 1989). Diferentes luciferasas en ocasiones pueden producir luz de diferentes longitudes de onda, lo que podría permitir el seguimiento simultáneo de las emisiones de luz a diferentes longitudes de onda. De acuerdo con lo anterior, estas características anteriormente indicadas son únicas y añaden nuevas dimensiones a la utilización de los sistemas informadores actuales.

La luciferasa de luciérnaga cataliza la bioluminiscencia en presencia de luciferina, adenosín-5'-trifosfato (ATP), iones magnesio y oxígeno, resultando en un rendimiento cuántico de 0,88 (ver, por ejemplo, McElroy y Selinger, Arch. Biochem. Biophys. 88:136-145, 1960). La reacción bioluminiscente de la luciferasa de luciérnaga puede utilizarse como ensayo para la detección del ATP, con un límite de detección de aproximadamente  $1 \times 10^{-13}$  M (ver, por ejemplo, Leach, J. Appl. Biochem. 3:473-517, 1981). Además, el grado global de sensibilidad y conveniencia de los sistemas de detección mediados por luciferasa ha generado un interés considerable en el desarrollo de biosensores basados en luciferasa de luciérnaga (ver, por ejemplo, Green y Kricka, Talanta 31:173-176, 1984; Blum *et al.*, J. Biolumin. Chemilumin. 4:543-550, 1989).

Mediante la utilización de los enzimas anteriormente indicados, se expone el cebador de secuenciación a una polimerasa y a un dNTP conocido. Si el dNTP resulta incorporado en el extremo 3' de la secuencia del cebador, se corta el dNTP y se libera una molécula de PPi. A continuación, la ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP. Preferentemente la ATP sulfurilasa se encuentra presente a una concentración suficientemente elevada para que la conversión del PPi transcurra con una cinética de orden uno con respecto a PPi. En presencia de luciferasa, se hidroliza el ATP, generando un protón. La reacción preferentemente presenta una concentración suficiente de luciferasa dentro de la mezcla de reacción para que la reacción  $ATP \rightarrow ADP + PO_4^{3-} + \text{fotón (luz)}$  transcurra con una cinética de orden uno con respecto al ATP. El fotón puede medirse utilizando métodos y aparatos indicados posteriormente. En una realización, el PPi y una reacción acoplada de sulfurilasa/luciferasa se utilizan para generar luz para la detección. En algunas realizaciones, se inmovilizan la sulfurilasa, la luciferasa, o ambas, sobre uno o más soportes sólidos móviles situados en cada sitio de reacción.

La presente invención y exposición permite de esta manera detectar la liberación de PPi durante la reacción de polimerasa, proporcionando una señal en tiempo real. Las reacciones de secuenciación pueden seguirse continuamente en tiempo real. De esta manera se consigue un procedimiento para la rápida detección de la liberación de PPi. Se ha estimado que las reacciones tienen lugar en menos de 2 segundos (Nyren y Lundin, *supra*). La etapa limitante de la velocidad es la conversión de PPi en ATP por parte de la ATP sulfurilasa, mientras que la reacción de la luciferasa es rápida y se ha estimado que dura menos de 0,2 segundos. Se han estimado las tasas de incorporación de polimerasas mediante diversos métodos y se ha encontrado, por ejemplo en el caso de la polimerasa Klenow, que la incorporación completa de una base puede requerir menos de 0,5 segundos. De esta manera, el tiempo total estimado para la incorporación de una base y la detección mediante este ensayo enzimático es aproximadamente 3 segundos. Por lo tanto, se observa que resultan posibles tiempos de reacción muy cortos, permitiendo la detección en tiempo real. Los tiempos de reacción podrían reducirse adicionalmente mediante la utilización de una luciferasa más termoestable.

Para la mayoría de aplicaciones resulta deseable utilizar reactivos libres de contaminantes tales como el ATP y el PPi. Estos contaminantes pueden eliminarse haciendo fluir los reactivos a través de un precolumna que contenga apirasa y/o pirofosfatasa unida a resina. Alternativamente, la apirasa o la pirofosfatasa pueden unirse a perlas magnéticas y utilizarse para eliminar el ATP y PPi contaminantes presentes en los reactivos. Además, resulta deseable eliminar por lavado los reactivos de secuenciación difundibles, por ejemplo los dNTPs no incorporados, utilizando un tampón de lavado. Puede utilizarse cualquier tampón de lavado utilizado en la secuenciación con pirofosfato.

En algunas realizaciones, entre las concentraciones de reactivos en la reacción de secuenciación se incluyen 1 pmol de ADN, 3 pmoles de polimerasa, 40 pmoles de DNT en 0,2 ml de tampón (ver Ronaghi *et al.*, Anal. Biochem. 242:84-89, 1996).

La reacción de secuenciación puede llevarse a cabo con cada uno de los cuatro nucleótidos predeterminados, en caso de que se desee. Un ciclo "completo" generalmente incluye administrar secuencialmente reactivos de secuenciación para cada uno de los nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP (o dUTP), en un orden predeterminado. Los dNTPs

no incorporados se eliminan por lavado entre cada una de las adiciones de nucleótidos. Alternativamente, se degradan los dNTPs no incorporados con apirasa (ver posteriormente). El ciclo se repite según se desee hasta obtener la cantidad deseada de secuencia del producto de secuenciación. En algunas realizaciones se obtienen aproximadamente 10 a 1.000, 10 a 100, 10 a 75, 20 a 50 ó aproximadamente 30 nucleótidos de información de secuencia a partir de la extensión de un cebador de secuenciación hibridado.

En algunas realizaciones se modifica el nucleótido para que contenga un derivado disulfuro de un hapteno, tal como biotina. La adición del nucleótido modificado al cebador naciente hibridado al sustrato anclado se analiza mediante una etapa posterior a la polimerización, que incluye: i) unión secuencial de, en el ejemplo en el que la modificación es una biotina, un grupo conjugado con avidina o estreptavidina ligado a una molécula de enzima, ii) eliminar por lavado el exceso de enzima unido a avidina o estreptavidina, iii) el flujo de un sustrato enzimático adecuado bajo condiciones que permitan la actividad enzimática, e iv) la detección de producto o productos de reacción del sustrato enzimático. El hapteno se elimina en la presente realización mediante la adición de un agente reductor. Dichos métodos permiten identificar un nucleótido en una posición diana determinada, y secuenciar simple y rápidamente el ADN evitando la necesidad de electroforesis y la utilización de marcajes radioactivos, potencialmente peligrosos.

Un enzima preferente para la detección del hapteno es la peroxidasa de rábano picante. Si se desea, puede utilizarse un tampón de lavado entre la adición de los diversos reactivos de la presente invención. Puede utilizarse apirasa para eliminar el dNTP no reaccionado utilizado para extender el cebador de secuenciación. El tampón de lavado opcionalmente puede incluir apirasa.

Por ejemplo, se incorporan haptenos, por ejemplo biotina, digoxigenina, las moléculas de pigmento fluorescente cy3 y cy5, y fluoresceína, con diversas eficiencias en moléculas de ADN extendido. La unión del hapteno puede producirse a través de enlaces mediante el azúcar, la base y mediante el grupo fosfato del nucleótido. Entre los medios ejemplares para la amplificación de la señal se incluyen medios fluorescentes, electroquímicos y enzimáticos. En una realización preferente utilizando la amplificación enzimática, entre los enzimas, por ejemplo la fosfatasa alcalina (AP), la peroxidasa de rábano picante (HRP), la beta-galactosidasa y la luciferasa, pueden incluirse aquellos para los que se conocen sustratos generadores de luz, y entre los medios para la detección de estos sustratos generadores de luz (quimioluminiscentes) pueden incluirse una cámara CCD.

En un modo preferente, se añade la base modificada, se produce la detección, y se elimina o se inactiva el grupo conjugado con hapteno mediante la utilización de un agente de corte o inactivador. Por ejemplo, si el linker cortable es un disulfuro, el agente de corte puede ser un agente reductor, por ejemplo ditioneitol (DTT), beta-mercaptoetanol, etc. Entre otras realizaciones de inactivación se incluyen calor, frío, desnaturalizantes químicos, surfactantes, reactivos hidrofóbicos e inhibidores suicidas.

La luciferasa puede hidrolizar el dATP directamente con la liberación concomitante de un fotón. Lo anterior resulta en una señal positiva falsa debido a que la hidrólisis se produce con independencia de la incorporación del dATP en el cebador de secuenciación extendido. Para evitar este problema, puede utilizarse un análogo de dATP que se incorpora en el ADN, es decir, es un sustrato para una ADP polimerasa, pero no es un sustrato para la luciferasa. Uno de este tipo de análogos es el  $\alpha$ -tio-dATP. De esta manera, la utilización de  $\alpha$ -tio-dATP evita la generación espuria de fotones que puede producirse al hidrolizarse dATP sin la incorporación del mismo en una cadena de ácidos nucleicos en crecimiento.

Típicamente se calibra la detección basada en PPi mediante la medición de la luz liberada tras la adición de nucleótidos de control a la mezcla de reacción de secuenciación inmediatamente tras la adición del cebador de secuenciación. Lo anterior permite la normalización de las condiciones de reacción. La incorporación de dos o más nucleótidos idénticos en sucesión se pone de manifiesto por un incremento correspondiente de la cantidad de luz liberada. De esta manera, un incremento de dos veces de la luz liberada en comparación con los nucleótidos de control revela la incorporación de dos dNTPs sucesivos en el cebador extendido.

Si se desea, la apirasa puede “lavarse” o “hacerse fluir” sobre la superficie del soporte sólido de manera que se facilite la degradación de cualquier dNTP no incorporado remanente dentro de la mezcla de reacción de secuenciación. La apirasa también degrada el ATP generado y por lo tanto “apaga” la luz generada en la reacción. Tras el tratamiento con apirasa, se elimina por lavado cualquier reactivo remanente en preparación para las siguientes incubación de dNTP y etapas de detección de fotones. Alternativamente, la apirasa puede unirse al soporte sólido o sólido móvil.

#### *Secuenciación de doble extremo*

En una realización preferente, los presentes inventores proporcionan un método para la secuenciación de ambos extremos de un ácido nucleico molde. Tradicionalmente la secuenciación de dos extremos de una molécula de ADN bicatenario requeriría como mínimo la hibridación del cebador, la secuenciación de un extremo, la hibridación de un segundo cebador y la secuenciación del otro extremo. El método alternativo es separar las cadenas individuales del ácido nucleico bicatenario y secuenciar individualmente cada cadena. La presente invención proporciona una tercera alternativa, que es más rápida y menos laboriosa que los dos primeros métodos.

La presente invención y exposición proporcionan un método para la secuenciación de ácidos nucleicos a partir de múltiples cebadores. Las referencias a la secuenciación del ADN en la presente solicitud se refieren a la secuenciación utilizando una polimerasa, en la que la secuencia se determina a medida que los nucleótidos trifosfato (NTPs) se incorporan en la cadena en crecimiento de un cebador de secuenciación. Un ejemplo de este tipo de secuenciación es el método de pirosecuenciación basado en la detección del pirofosfato (ver, por ejemplo, las patentes US 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

En una realización, se proporciona un método para la secuenciación de los dos extremos de un ácido nucleico bicatenario de molde. El ADN bicatenario comprende dos ADNs monocatenarios, denominados en la presente invención primer ADN monocatenario y segundo ADN monocatenario. Se hibrida un primer cebador con el primer ADN monocatenario y se hibrida un segundo cebador con el segundo ADN monocatenario. El primer cebador se desprotege, mientras que se protege el segundo cebador. Los términos “protección” y “protegido” se definen en la presente exposición como la adición de un grupo químico a sitios reactivos en el cebador que impide la polimerización de un cebador por la ADN polimerasa. Además, la adición de dichos grupos protectores químicos debería ser reversible, de manera que tras las reversión, el cebador ahora desprotegido sea capaz nuevamente de servir como cebador de secuenciación. La secuencia de ácidos nucleicos se determina en una dirección (por ejemplo a partir de un extremo del molde) mediante elongación del primer cebador con ADN polimerasa utilizando métodos convencionales, tales como la secuenciación basada en el pirofosfato. A continuación, se desprotege el segundo cebador y se determina la secuencia mediante elongación del segundo cebador en la otra dirección (por ejemplo del otro extremo del molde) utilizando ADN polimerasa y métodos convencionales, tales como la secuenciación basada en el pirofosfato. Las secuencias del primer y segundo cebadores están diseñadas específicamente para hibridarse a los dos extremos del ADN bicatenario o en cualquier localización a lo largo del molde en el presente método.

En otra realización, se proporciona un método de secuenciación de un ácido nucleico a partir de múltiples cebadores. En este método se hibridan varios cebadores de secuenciación con el ácido nucleico molde que debe secuenciarse. Todos los cebadores de secuenciación se encuentran reversiblemente protegidos excepto uno. Un cebador protegido es un cebador oligonucleótido que no puede extenderse con polimerasa y dNTPs utilizados comúnmente en las reacciones de secuenciación de ADN. Un cebador reversiblemente protegido es un cebador protegido que puede desprotegerse. Todos los cebadores protegidos a los que se hace referencia en la presente invención se encuentran reversiblemente protegidos. Tras la desprotección, un cebador reversiblemente protegido funciona como un cebador de secuenciación normal y es capaz de participar en una reacción de secuenciación normal.

Se proporciona un método de secuenciación secuencial de un ácido nucleico a partir de múltiples cebadores. El método comprende las etapas siguientes: en primer lugar, se proporcionan uno o más ácidos nucleicos molde que deben secuenciarse. En segundo lugar, se hibrida una pluralidad de cebadores de secuenciación con el ácido o ácidos nucleicos de molde. El número de cebadores de secuenciación puede presentarse por el número  $n$ , en donde  $n$  puede ser cualquier número positivo superior a 1. Este número puede ser, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó superior. De los cebadores, un número  $n-1$  pueden encontrarse protegidos por un grupo protector. Por lo tanto, por ejemplo, si  $n$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10,  $n-1$  sería 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, respectivamente. El cebador restante (por ejemplo  $n$  cebadores -  $(n-1)$  cebadores protegidos = un cebador restante) se encuentra desprotegido. En tercer lugar, el cebador desprotegido se extiende y la secuencia de ADN molde se determina mediante métodos convencionales tales como, por ejemplo, la secuenciación a partir de pirofosfato. En cuarto lugar, tras la secuenciación del primer cebador, uno de los cebadores protegidos remanentes se desprotege. En quinto lugar, el cebador desprotegido se extiende y la secuencia de ADN molde se determina mediante métodos convencionales tales como, por ejemplo, la secuenciación a partir de pirofosfato. Opcionalmente puede repetirse el método hasta que la secuenciación se haya llevado a cabo con todos los cebadores protegidos.

En otro aspecto, se proporciona un método de secuenciación secuencial de ácidos nucleicos, que comprende las etapas siguientes: (a) hibridar 2 ó más cebadores de secuenciación con el ácido nucleico, en donde la totalidad de los cebadores excepto uno se encuentran reversiblemente protegidos, (b) determinar una secuencia de una cadena de ácidos nucleicos mediante elongación por la polimerasa desde el cebador desprotegido, (c) desproteger uno de los cebadores reversiblemente protegidos formando un cebador desprotegido, (d) repetir las etapas (b) y (c) hasta que la totalidad de los cebadores reversiblemente protegidos hayan sido desprotegidos y utilizados para determinar una secuencia. En una realización, el presente método comprende una etapa adicional entre las etapas (b) y (c), es decir, la etapa de terminación de la elongación del cebador desprotegido mediante la puesta en contacto del cebador desprotegido con ADN polimerasa y uno o más de entre nucleótidos trifosfato o dideoxinucleótido trifosfato. En todavía otra realización, el presente método comprende además una etapa adicional entre dicha etapa (b) y (c), es decir, terminar la elongación del cebador desprotegido mediante la puesta en contacto del cebador desprotegido con ADN polimerasa y un dideoxinucleótido trifosfato de entre ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, se proporciona un método de secuenciación de un ácido nucleico, que comprende: (a) hibridar un primer cebador desprotegido con una primera cadena del ácido nucleico, (b) hibridar un segundo cebador protegido con una segunda cadena, (c) exponer la primera y segunda cadenas a la polimerasa, de manera que el primer cebador desprotegido se extiende a lo largo de la primera cadena, (d) completar la extensión del primer cebador de secuenciación, (e) desproteger el segundo cebador de secuenciación, y (f) exponer la primera y segunda cadenas a la polimerasa de manera que el segundo cebador de secuenciación se extienda a lo largo de la segunda cadena. En una realización preferente, el completado comprende añadir una caperuza o terminar la elongación.

Otra realización proporciona un método para secuenciar dos extremos de un ácido nucleico bicatenario de molde que comprende un primer y un segundo ADN monocatenarios. En la presente realización, se hibrida un primer cebador con el primer ADN monocatenario y un segundo cebador se hibrida con el segundo ADN monocatenario en la misma etapa. Se desprotege el primer cebador, dejando protegido el segundo cebador.

Tras la hibridación, se determina la secuencia de ácidos nucleicos en una dirección (por ejemplo desde un extremo del molde) mediante elongación del primer cebador con ADN polimerasa utilizando métodos convencionales, tales como la secuenciación a partir de pirofosfato. En una realización preferente, la polimerasa carece de actividad exonucleasa 3' a 5'. A continuación, se desprotege el segundo cebador, y se determina la secuencia del mismo mediante elongación del segundo cebador en la otra dirección (por ejemplo desde el otro extremo del molde) con ADN polimerasa utilizando métodos convencionales, tales como la secuenciación a partir de pirofosfato. Tal como se ha descrito anteriormente, las secuencias del primer y segundo cebadores se diseñan para hibridarse con los dos extremos del ADN bicatenario o con cualquier localización a lo largo del molde. Esta técnica resulta especialmente útil para la secuenciación de muchos ADN de molde que contienen sitios de hibridación de cebadores de secuenciación en los dos extremos. Por ejemplo, muchos vectores de clonación proporcionan sitios de hibridación de cebador de secuenciación únicos flanqueando el sitio de inserción para facilitar la posterior secuenciación de cualquier secuencia clonada (por ejemplo Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA).

Una ventaja del presente método es que pueden hibridarse ambos cebadores en una sola etapa. Las ventajas de este método y otros métodos resultan especialmente útiles en los sistemas de secuenciación en paralelo, en los que las hibridaciones son más complejas de lo normal. Se dan a conocer ejemplos de sistemas de secuenciación en paralelo en la solicitud de patente US copendiente número de serie 10/104.280.

Los cebadores oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante tecnología convencional, por ejemplo con un sintetizador comercial de oligonucleótidos y/o mediante ligación entre sí de subfragmentos que han sido sintetizados de dicha manera.

En otra realización, puede determinarse la longitud del ácido nucleico bicatenario diana. Los métodos para determinar la longitud de un ácido nucleico bicatenario son conocidos de la técnica. La determinación de la longitud puede llevarse a cabo antes o después de la secuenciación del ácido nucleico. Entre los métodos conocidos de determinación de la longitud de la molécula de ácidos nucleicos se incluyen la electroforesis en gel, la electroforesis en gel en campo pulsado, la espectrometría de masas y similares. Debido a que un ácido nucleico bicatenario de extremos romos comprende dos cadenas individuales de longitud idéntica, la determinación de la longitud de una cadena de un ácido nucleico resulta suficiente para determinar la longitud de la doble cadena correspondiente.

La reacción de secuenciación también permite determinar la longitud del ácido nucleico de molde. En primer lugar, una secuencia completa desde un extremo del ácido nucleico hasta el otro extremo permitirá determinar la longitud. En segundo lugar, la determinación de la secuencia de los dos extremos puede solaparse en la parte intermedia, permitiendo la unión de las dos secuencias. La secuencia completa puede determinarse y obtenerse la longitud. Por ejemplo, si el molde presenta una longitud de 100 pb, la secuenciación desde un extremo podría determinar las bases 1 a 75; la secuenciación desde el otro extremo podría determinar las bases 25 a 100; de esta manera existe un solapamiento de 51 bases en la parte intermedia, entre la base 25 y la base 75, y a partir de esta información puede determinarse la secuencia completa desde la base 1 hasta la 100 y obtenerse la longitud, de 100 bases, a partir de la secuencia completa.

Otro método comprende las etapas siguientes. En primer lugar, se hibrida una pluralidad de cebadores de secuenciación, cada uno con una secuencia diferente, a un ADN que debe secuenciarse. El número de cebadores de secuenciación puede ser cualquier valor superior a uno, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó más. La totalidad de estos cebadores se encuentra reversiblemente protegido excepto uno. El único cebador desprotegido se alarga en una reacción de secuenciación y se determina su secuencia. Habitualmente, tras alargar completamente un cebador, no resulta posible su extensión y no afectará a la secuenciación posterior desde otro cebador. Si se desea, el cebador secuenciado puede terminarse utilizando exceso de polimerasa y dNTP o utilizando ddNTPs. Si se realiza una etapa de terminación, deben eliminarse los reactivos de terminación (dNTPs y ddNTPs) tras finalizar la etapa. A continuación, se desprotege uno de los cebadores reversiblemente protegidos y tiene lugar la secuenciación desde el segundo cebador. Las etapas de desprotección de un cebador, secuenciación desde el cebador desprotegido y, opcionalmente, la terminación de la secuenciación desde el cebador se repite hasta que la totalidad de los cebadores protegidos ha sido desprotegida y utilizada en la secuenciación.

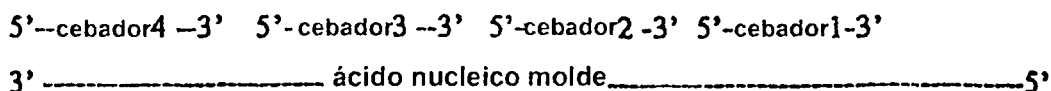
Los cebadores reversiblemente protegidos deben protegerse con diferentes grupos químicos. Mediante la selección el método de desprotección apropiado, puede desprotegerse un cebador sin afectar a los grupos protectores de los demás cebadores. En una realización preferente, el grupo protector es  $\text{PO}_4$ . Es decir, el segundo cebador se protege con  $\text{PO}_4$  y la desprotección se lleva a cabo con polinucleótido quinasa de T4 (utilizando la actividad 3'-fosfatasa de la misma). En otra realización preferente, el protector es un grupo tiol o un grupo fosforotiol.

El ácido nucleico molde puede ser un ADN, ARN o ácido nucleico péptido (PNA). Aunque el ADN es el molde preferente, puede convertirse ARN y PNA en ADN mediante técnicas conocidas, tales como la PCR con cebadores aleatorios, la transcripción inversa, la PCR-RT o una combinación de dichas técnicas. Además, los métodos resultan útiles para la secuenciación de ácidos nucleicos de secuencia conocida y desconocida. La secuenciación de ácidos



nucleicos de secuencia conocida resultaría útil, por ejemplo, para confirmar la secuencia de ADN sintetizado o para confirmar la identidad de un patógeno sospechado con una secuencia de ácidos nucleicos conocida. Los ácidos nucleicos pueden ser una mezcla de más de una población de ácidos nucleicos. Es conocido que un cebador de secuenciación con suficiente especificidad (por ejemplo 20 bases, 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40 bases, 45 bases o 50 bases) puede utilizarse para secuenciar un subconjunto de secuencias en un ácido nucleico largo o en una población de ácidos nucleicos no relacionados. De esta manera, por ejemplo, el molde puede ser una secuencia de 10 Kb o diez secuencias de 1 Kb cada una. En una realización preferente, el ADN molde presenta una longitud de entre 50 pb y 700 pb. El ADN puede ser monocatenario o bicatenario.

En el caso de que el ácido nucleico molde sea monocatenario, pueden hibridarse varios cebadores al ácido nucleico molde, tal como se muestra a continuación:



En dicho caso, resulta preferido que el cebador desprotegido inicial sea el cebador que se hibride en el extremo situado en dirección más 5' del molde (ver el cebador 1 en la ilustración anterior). En esta orientación, la elongación del cebador 1 no desplazaría (por desplazamiento de cadena) el cebador 2, 3 ó 4. Tras finalizar la secuenciación desde el cebador 1, puede desprotegerse el cebador 2 y puede iniciarse la secuenciación del ácido nucleico. La secuenciación desde el cebador 2 podría desplazar el cebador 1 o la versión alargada del cebador uno, pero no presentaría ningún efecto sobre los cebadores protegidos restantes (cebadores 3 y 4). Utilizando este orden, puede utilizarse cada cebador secuencialmente y una reacción de secuenciación desde un cebador no afecta a la secuenciación desde un cebador posterior.

Una característica es la capacidad de utilizar múltiples cebadores de secuenciación en uno o más ácidos nucleicos y la capacidad de secuenciar desde múltiples cebadores en únicamente una etapa de hibridación. En la etapa de hibridación, puede hibridarse la totalidad de los cebadores de secuenciación (por ejemplo n cebadores de secuenciación con el ácido o ácidos nucleicos de molde simultáneamente. En la secuenciación convencional, habitualmente resulta necesaria una etapa de hibridación para la secuenciación desde un cebador. Una característica es que la secuenciación desde n cebadores (tal como se han definido anteriormente) puede llevarse a cabo mediante una sola etapa de hibridación. Lo anterior elimina efectivamente n-1 etapas de hibridación.

En una realización preferida, las secuencias de los n cebadores son suficientemente diferentes para que los cebadores no se hibriden cruzadamente ni se autohibriden. La hibridación cruzada se refiere a la hibridación de un cebador con otro cebador en virtud de la complementariedad de secuencias. Una forma de hibridación cruzada se denomina comúnmente "dímero cebador". En el caso de un dímero cebador, los extremo 3' de los dos cebadores son complementarios y forman una estructura que, al alargarse, es aproximadamente la suma de la longitud de los dos cebadores. La autohibridación se refiere a la situación en la que el extremo 5' de un cebador es complementario al extremo 3' del cebador. En este caso, el cebador presenta una tendencia a autohibridarse, formando una estructura similar a una horquilla.

Un cebador puede interaccionar o asociarse específicamente con la molécula molde. Los términos "interaccionar" o "asociarse" se refieren en la presente invención a que dos sustancias o compuestos (por ejemplo cebador y molde; grupo químico y nucleótido) se encuentran suficientemente unidos (por ejemplo enlazados, unidos, hibridados, juntos, unidos covalentemente o asociados de otra manera) para que pueda llevarse a cabo el ensayo pretendido. Los términos "específico" o "específicamente" se refieren en la presente invención a que dos componentes se unen selectivamente entre sí. Los parámetros necesarios para conseguir las interacciones específicas pueden determinarse rutinariamente, por ejemplo utilizando métodos convencionales de la técnica.

Para obtener una mayor sensibilidad o para ayudar en el análisis de mezclas complejas, los cebadores protegidos pueden modificarse (por ejemplo derivatizarse) con grupos químicos diseñados para proporcionar señales únicas claras. Por ejemplo, cada cebador protegido puede derivatizarse con un aminoácido natural o sintético diferente unido a través de un enlace amida con la cadena oligonucleotídica en una o más posiciones a lo largo de la parte hibridante de la cadena. La modificación química puede detectarse, evidentemente, tras extraerse del ácido nucleico diana, o mientras se encuentran asociados con el ácido nucleico diana. Al permitir la identificación de una manera distinguible de cada ácido nucleico diana protegido, resulta posible someter a ensayo (por ejemplo el cribado) de un gran número de diferentes ácidos nucleicos diana en un único ensayo. Pueden llevarse a cabo muchos ensayos de este tipo de manera rápida y fácil. Por lo tanto, este tipo de ensayo o conjunto de ensayos puede llevarse a cabo con elevada eficiencia de producción tal como se define en la presente invención.

En los métodos descritos en la presente invención, tras la elongación de un primer cebador y la determinación de la secuencia del ADN molde, se desprotege y se secuenciar un segundo cebador. No se produce interferencia entre la reacción de secuenciación del primer cebador y la reacción de secuenciación del segundo cebador, ahora desprotegido, debido a que el primer cebador se encuentra completamente elongado o terminado. Debido a que el primer cebador se ha elongado completamente, la secuenciación desde el segundo cebador utilizando métodos convencio-

nales, tales como la secuenciación a partir de pirofosfato, no resultará afectada por la presencia del primer cebador elongado. También se proporciona un método para reducir cualquier posible contaminación de la señal del primer cebador. La contaminación de la señal se refiere a las incidencias en las que el primer cebador no se ha elongado por completo. En este caso, el primer cebador continuará elongándose al desprotegerse y elongarse un cebador posterior.

5 La elongación de tanto el primer como el segundo cebador podría interferir con la determinación de la secuencia de ADN.

En una realización preferente, la reacción de secuenciación (por ejemplo la reacción de elongación de cadena) desde un cebador en primer lugar se termina o se completa antes de iniciarse una reacción de secuenciación en un segundo cebador. Puede terminarse una reacción de elongación de cadena de ADN poniendo en contacto el ADN molde con ADN polimerasa y dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), tales como ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP. Tras la terminación, pueden eliminarse los dideoxinucleótidos trifosfato mediante lavado de la reacción con una solución sin ddNTPs. Un segundo método para prevenir la elongación adicional de un cebador es añadir nucleótidos trifosfato (dNTPs, tales como dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y ADN polimerasa a una reacción con el fin de extender por completo cualquier cebador que no se hay extendido completamente. Tras la extensión completa, se eliminan los dNTPs y las polimerasas antes de desprotegerse el cebador siguiente. Mediante el completado o terminación de un cebador antes de desproteger otro cebador, puede mejorarse la relación de señal a ruido de la reacción de secuenciación (por ejemplo la secuenciación a partir de pirofosfato).

20 Las etapas (a) terminar o completar opcionalmente la secuenciación, (b) desproteger un nuevo cebador, y (c) secuenciar desde el cebador desprotegido, pueden repetirse hasta determinar una secuencia a partir de la elongación de cada cebador. En este método, la etapa de hibridación comprende "n" cebadores y un cebador desprotegido. El cebador desprotegido se secuenciar en primer lugar y las etapas (a), (b) y (c) anteriormente indicadas pueden repetirse.

25 En una realización preferente, se utiliza la secuenciación a partir de pirofosfato para toda la secuenciación llevada a cabo de acuerdo con el método de la presente invención.

En otra realización preferida, la secuenciación de doble extremo se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito de manera general en la figura 10. Este procedimiento puede dividirse en seis etapas: (1) creación de una perla de captura (figura 10A); (2) amplificación PCR dirigida a perlas (DTB) (figura 10B); (3) preparación del sistema de informador SL (figura 10C); (4) secuenciación de la primera cadena (figura 10D); (5) preparación de la segunda cadena (figuras 10E y 10F); y (6) análisis de cada cadena (figura 10G). Este procedimiento ejemplar se describe de manera general a continuación.

35 En la etapa 1, se acopla una perla de captura actividad con N-hidroxisuccinimida (NHS) (por ejemplo de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a tanto un cebador directo como a un cebador inverso. El acoplamiento con NHS forma un enlace amida químicamente estable con ligandos que contienen grupos amino primarios. La perla de captura también se acopla a biotina (figura 10A). Las perlas (es decir, los soportes sólidos de captura de ácidos nucleicos) utilizados en la presente invención puede ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de cualquiera de los materiales conocidos. Entre los ejemplos de estos materiales se incluyen: compuestos inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Entre los ejemplos específicos de estos materiales se incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similares (ver Merrifield, *Biochemistry* 3:1385-1390, 1964), poliácridamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicona, plásticos, nitrocelulosa, celulosas, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio, plástico metálico, celulosa, dextranos reticulados (por ejemplo Sephadex<sup>TM</sup>) y gel de agarosa (Sephacrose<sup>TM</sup>) y soportes de fase sólida conocidos por el experto en la materia. En una realización preferente, las perlas de captura son perlas de sefarosa de diámetro comprendido entre aproximadamente 25 y 40  $\mu\text{m}$ .

En la etapa 2, se añade ADN molde hibridado con los cebadores directo e inverso y el ADN se amplifica utilizando una estrategia de amplificación por PCR (figura 10B). En una realización, el ADN se amplifica mediante reacción en cadena de la polimerasa en emulsión, reacción en cadena de la polimerasa dirigida a perlas, amplificación por círculo rodante o amplificación isotérmica mediada por bucles. En la etapa 3, se añade estreptavidina seguido de la adición de sulfúrida y luciferasa, que se acoplan a la estreptavidina (figura 10C). La adición de enzimas auxiliares durante un método de secuenciación ha sido dado a conocer en las patentes US 2003-0068629 y 6.996.287. En una realización, el ADN molde presenta un ADN adaptador ligado a ambos extremos, 5' y 3'. En una realización preferente, el ADN se acopla a la perla de captura de ADN mediante hibridación de uno de los adaptadores de ADN con una secuencia complementaria en la perla de captura de ADN.

En la primera etapa, se une el ácido nucleico monocatenario de molde que debe amplificarse a una perla de captura. El ácido nucleico molde puede unirse a la perla de captura de cualquier manera conocida de la técnica. Existen numerosos métodos de la técnica para la unión de ADN a una perla microscópica. La unión química covalente del ADN a la perla puede conseguirse mediante la utilización de agentes de acoplamiento estándares, tales como carbodiimida soluble en agua, para unir el fosfato 5' en el ADN con las microesferas recubiertas de amina mediante un enlace fosfoamidato. Otra alternativa es acoplar en primer lugar linkers oligonucleótidos específicos a la perla utilizando enlaces similares y después utilizar la ADN ligasa para unir el ADN al linker en la perla. Entre otras químicas de enlace se incluyen la utilización de N-hidroxisuccinamida (NHS) y los derivados de la misma, para unir el oligonucleótido a las perlas. En este método, un extremo del oligonucleótido puede contener un grupo reactivo (tal como un grupo amida) que forma un enlace covalente con el soporte sólido, mientras que el otro extremo del linker contiene otro grupo reac-

tivo que puede unirse con el oligonucleótido que debe inmovilizarse. En una realización preferente, el oligonucleótido se une a la perla de captura de ADN mediante enlace covalente. Sin embargo, los enlaces no covalentes, tales como la quelación o los complejos de antígeno-anticuerpo, pueden utilizarse para unir el oligonucleótido a la perla.

- 5 Pueden utilizarse *linkers* oligonucleótidos que se hibridan específicamente a secuencias únicas en el extremo del fragmento de ADN, tales como el extremo solapante de un sitio de enzima de restricción o los “extremos cohesivos” de los vectores de clonación basados en el bacteriófago lambda, aunque también pueden utilizarse ventajosamente las ligaciones de extremos romos. Estos métodos se describen en detalle en la patente US 5.674.743. Resulta preferente que cualquier método utilizado para inmovilizar las perlas continúe ligando el oligonucleótido inmovilizado durante las etapas de los métodos descritos en la presente invención. En una realización preferente, el oligonucleótido se une a la perla de captura de ADN mediante un enlace covalente. Sin embargo, los enlaces no covalentes, tales como la quelación o los complejos de antígeno-anticuerpo, pueden utilizarse para unir el oligonucleótido a la perla.

- 15 En la etapa 4, se secuencian la primera cadena del ADN mediante deposición de las perlas de captura sobre una placa PicoTiter (PTP) y la secuenciación mediante un método conocido por el experto ordinario en la materia (por ejemplo la secuenciación a partir de pirofosfato) (figura 10D). Tras la secuenciación, se añade una mezcla de dNTPs y ddNTPs con el fin de “añadir una caperuza” o terminar el procedimiento de secuenciación (figura 10E). En la etapa 5, se prepara la segunda cadena del ácido nucleico mediante la adición de apirasa para eliminar los ddNTPs y la polinucleótido quinasa (PNK) para eliminar el grupo fosfato 3' de la cadena del cebador bloqueado (figura 10F). A continuación, se añade la polimerasa para cebar la segunda cadena, seguido de la secuenciación de la segunda cadena de acuerdo con un método estándar conocido por el experto ordinario en la materia (figura 10G). En la etapa 7, la secuencia de tanto la primera como la segunda cadenas se analiza de manera que se determina una secuencia contigua de ADN.

## 25 *Medios de detección*

- El soporte sólido se une ópticamente a un sistema de formación de imágenes 230, que incluye un sistema CCD asociado a óptica convencional o a un haz de fibras ópticas. En una realización, el sustrato de cámara de perfusión incluye una oblea-panel de fibra óptica, de manera que la luz generada en el área próxima a la interfaz acuosa se transmite directamente a través de las fibras ópticas hasta el extremo del sustrato o cámara. En el caso de que el sistema CCD incluya un conector de fibra óptica, puede formarse las imágenes poniendo en contacto directo el sustrato de la cámara de perfusión con el conector. Alternativamente, puede utilizarse óptica convencional para formar una imagen con la luz, por ejemplo mediante la utilización de un sistema de lentes de elevada apertura numérica de magnificación 1:1, desde el exterior del sustrato de fibra óptica directamente sobre el sensor CCD. En el caso de que el sustrato no permita el acoplamiento de fibras ópticas, también puede utilizarse un sistema de lentes tal como se ha indicado anteriormente, en cuyo caso el sustrato o la tapa de la cámara de perfusión es ópticamente transparente. Anteriormente se ha descrito un sistema CCD de formación de imágenes ejemplar.

- El sistema de formación de imágenes 230 se utiliza para recoger luz de los reactores en la superficie del sustrato. Puede formarse una imagen con la luz, por ejemplo en una CCD utilizando un aparato de bajo nivel de ruido y elevada sensibilidad conocido de la técnica. Para la formación de imágenes basada en fibras ópticas, resulta preferible incorporar las fibras ópticas directamente en el cubreobjetos o que en una FORA las fibras ópticas que forman los micropocillos también sean las fibras ópticas que transmitan luz hasta el detector.

- 45 El sistema de formación de imágenes se conecta a un sistema de control computerizado y de recogida de datos 240. En general, puede utilizarse cualquier hardware y paquete de software comúnmente disponibles. El sistema de control computerizado y recogida de datos también se encuentra conectado con el conducto 200 para el control de la administración de reactivos.

- 50 Los fotones generados por la reacción de secuenciación a partir de pirofosfato son capturados por la CCD únicamente si pasan a través de un dispositivo de enfoque (por ejemplo una lente óptica o una fibra óptica) y se enfocan en un elemento de la CCD. Sin embargo, los fotones emitidos escapan igualmente en todas las direcciones. Con el fin de maximizar la “captura” y cuantificación posteriores de los mismos al utilizar un panel plano (por ejemplo un chip de ADN), resulta preferible recoger los fotones en la posición más próxima posible a donde se generan, por ejemplo inmediatamente en el soporte sólido plano. Lo anterior se consigue: (i) utilizando aceite de inmersión óptica entre el cubreobjetos y una lente óptica tradicional o haz de fibras ópticas o, preferentemente, (ii) incorporando fibras ópticas directamente en el cubreobjetos mismo. De manera similar, en el caso de que se utilice una superficie plana delgada ópticamente transparente, el haz de fibras ópticas también puede situarse contra la superficie posterior de la misma, eliminando la necesidad de “formar una imagen” en toda la profundidad de la cámara de reacción/perfusión entera.

- 60 El suceso de reacción, por ejemplo fotones generados por la luciferasa, pueden detectarse y cuantificarse utilizando una diversidad de aparatos de detección, por ejemplo un tubo fotomultiplicador, una CCD, CMOS, fotómetro de absorbancia, un luminómetro, un dispositivo de inyección de carga (CID) u otro detector de estado sólido, así como los aparatos indicados en la presente invención. En una realización preferente, la cuantificación de los fotones emitidos se lleva a cabo mediante la utilización de una cámara CCD dotada de un haz de fibras ópticas fusionadas. En otra realización preferente, la cuantificación de los fotones emitidos se lleva a cabo mediante la utilización de una cámara CCD dotada de un intensificador de placa de microcanales. Puede utilizarse un CCD “back thinned” para incrementar la sensibilidad. Los detectores CCD se describen en, por ejemplo, Bronks *et al.*, Anal. Chem. 65:2750-2757, 1995.

Un sistema CCD ejemplar es una cámara de 4 canales de entrada serie 600 de Spectral Instruments, Inc. (Tucson, AZ) con un chip CCD Lockheed-Martin LM485 y un conector (haz) de fibra óptica 1-1 con diámetros de las fibras individuales de entre 6 y 8  $\mu\text{m}$ . Este sistema presenta 4.096 x 4.096, o más de 16 millones de píxeles, y presenta una eficiencia cuántica comprendida entre 10% y >40%. De esta manera, dependiendo de la longitud de onda, hasta 40% de los fotones que forman una imagen sobre el sensor CCD se convierten en electrones detectables.

En otras realizaciones, puede utilizarse un grupo fluorescente como marcaje y llevarse a cabo la detección de un suceso de reacción utilizando un microscopio de barrido confocal para el barrido de la superficie de un panel con un láser, o se encuentran disponibles otras técnicas, tales como la microscopía óptica de barrido de campo cercano (SNOM), que son capaces de una mayor resolución óptica, permitiendo de esta manera la utilización de paneles “más densos”. Por ejemplo, utilizando SNOM, pueden distinguirse polinucleótidos individuales en el caso de que se encuentren separados por una distancia inferior a 100 nm, por ejemplo 10 nm x 10 nm. Además, puede utilizarse microscopía de túnel de barrido (Binning *et al.*, Helvetica Physica Acta 55:726-735, 1982) y microscopía de fuerza atómica (Hanswa *et al.*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23:115-139, 1994).

#### Aplicación en haplotipos

Puede llevarse a cabo prácticamente cualquier aplicación de secuenciación utilizando los métodos y aparatos descritos en la presente invención. En una realización, los presentes inventores contemplan el mapado de haplotipos. La diversidad genética humana es un factor importante en la variabilidad de la respuesta del paciente a los compuestos farmacéuticos. La medición más precisa de esta diversidad es el haplotipo, que es la organización de la variación polimórfica tal como se observa en un cromosoma. Recientemente, importantes investigadores del genoma del gobierno y del mundo académico en los Estados Unidos, Canadá y Europa han acordado que los haplotipos son una herramienta potente que puede reducir la complejidad de la información genética a una forma práctica. Los haplotipos pueden utilizarse en el descubrimiento de fármacos para mejorar el resultado de los estudios de validación de dianas y de cribado de fármacos y en el desarrollo de fármacos para mejorar el diseño y la fiabilidad de los ensayos clínicos. Los marcadores haplotipo pueden utilizarse para predecir la eficacia y seguridad de los fármacos nuevos y de fármacos autorizados y servirán como los cimientos para un nuevo paradigma de medicina personalizada que asigne los pacientes al fármaco correcto a la dosis correcta siguiendo directrices de una base de datos de asociaciones de marcadores clínicos.

Numerosos estudios empíricos han demostrado que los alelos SNP próximos con frecuencia se encuentran en desequilibrio de ligamiento (DL) entre sí, de manera que el estado de un alelo SNP con frecuencia se encuentra altamente correlacionado con el alelo de otro SNP próximo. Estas correlaciones existen debido a la historia compartida de SNPs estrechamente ligados, que se cotransmiten de generación en generación. Los patrones de variación de las secuencias humanas (haplotipos) representan de esta manera segmentos de ADN ancestral. Las meiosis pasadas han disociado lentamente los alelos de alelos vecinos en cromosomas ancestrales, exceptuando las variantes estrechamente ligadas. El grado de desequilibrio de ligamiento en poblaciones pioneras con cuellos de botella recientes ha sido el objeto de numerosos estudios, particularmente en la clonación de trastornos mendelianos simples, tales como la fibrosis quística (16), la enfermedad de Huntington (11) y la displasia distrófica (DTD) (8). Mientras que estos estudios de clonación se han beneficiado de segmentos cromosómicos grandes que muestra DL que abarca grandes distancias (con frecuencia en el orden de las megabases), se ha dispuesto de muy pocos datos empíricos hasta recientemente respecto al DL a través del genoma humano en la población mundial.

Los presentes inventores se centran en tres ejemplos recientes de estudios a gran escala de DL (y haplotipos): (ver, por ejemplo, Reich D.E., Cargill M., Bolk S., Ireland J., Sabeti P.C., Richter D.J., Lavery T., Kouyoumjian R., Farhadian S.F., Ward R. y Lander, E.S., Linkage disequilibrium in the human genome, Nature 411:199-204, 2001). Los presentes inventores muestrearon 19 regiones cromosómicas para su contenido de SNP. En primer lugar los SNP de alta frecuencia en intervalos comprendidos entre 2 y 160 kb se genotiparon en una muestra caucasiana. A través de todas las regiones, el DL era detectable a distancias de aproximadamente 60 kb, con una diferencia significativa entre regiones, ya que el rango era de tan solo 6 kb en un locus y de hasta 155 kb en otro. No resultó inesperado que el DL estuviese significativamente correlacionado con las tasas de recombinación local estimadas. El análisis adicional de una muestra nigeriana proporcionó evidencia de un DL más corto en esta población, aunque las combinaciones alélicas en distancias cortas eran similares a las de la muestra caucasiana. En global este trabajo ha proporcionado evidencia de que son comunes los grandes bloques de DL en el genoma humano y que resulta factible el mapado del DL de genes de enfermedades en el genoma.

#### Kits

La exposición también comprende kits para la utilización en métodos de la invención que incluirían uno o más de los componentes siguientes: (a) un cebador específico de ensayo que se hibride con el ADN de muestra de manera que la posición diana sea directamente contigua al extremo 3' del cebador; (b) una polimerasa; (c) un medio de detección enzimática para identificar la liberación de PPi; (d) desoxinucleótidos, incluyendo, en lugar de dATP, un análogo de dATP que resulte capaz de actuar como sustrato para la polimerasa pero que resulte incapaz de actuar como sustrato para dicho enzima de detección de PPi; y (e) opcionalmente dideoxinucleótidos, opcionalmente sustituyendo ddATP por un análogo de ddATP que resulte capaz de actuar como sustrato para una polimerasa pero incapaz de actuar como

sustrato para dicho enzima de detección de PPI. Si el kit es para la utilización con la amplificación inicial por PCR, también podría incluir los componentes siguientes: (i) un par de cebadores para la PCR, presentando por lo menos uno de ellos un medio para permitir la inmovilización de dicho cebador; (ii) una polimerasa que preferentemente sea termoestable, por ejemplo la polimerasa Taq1; (iii) tampones para la reacción de PCR; y (iv) desoxinucleótidos. En el caso de que se utilice un marcaje enzimático para evaluar la PCR, el kit ventajosamente contendrá un sustrato para el enzima y otros componentes de un sistema de detección.

Una realización se refiere a un método para la secuenciación de ácidos nucleicos. El método implica fragmentar moléculas grandes de ácidos nucleicos de molde para generar una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados. A continuación, los ácidos nucleicos fragmentados se envían a microrreactores acuosos en una emulsión de agua en aceite, de manera que una pluralidad de microrreactores acuosos comprende una única copia de un ácido nucleico fragmentado, una única perla capaz de unirse al ácido nucleico fragmentado y solución de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos. En la etapa siguiente, los ácidos nucleicos fragmentados se amplifican en los microrreactores, formando copias amplificadas de los ácidos nucleicos y uniéndose las copias amplificadas a las perlas en los microrreactores. A continuación, las perlas se introducen en un panel de por lo menos 10.000 cámaras de reacción sobre una superficie plana, en la que una pluralidad de cámaras de reacción comprende no más de una única perla. Finalmente, se lleva a cabo una reacción de secuenciación simultáneamente en una pluralidad de las cámaras de reacción.

Otra realización se refiere a un panel que comprende una superficie plana con una pluralidad de cavidades en el mismo, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y cada cavidad presenta una anchura en por lo menos una dimensión de entre 20  $\mu\text{m}$  y 70  $\mu\text{m}$ . Además, existen por lo menos 10.000 cámaras de reacción en el panel. Cada cámara de reacción puede contener por lo menos 100.000 copias de una única especie de ácido nucleico monocatenario molde.

Otra realización se refiere a un panel que comprende una superficie plana superior y una superficie plana inferior, en donde la superficie plana superior presenta por lo menos 10.000 cavidades en la misma, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, la superficie plana inferior es ópticamente conductora, de manera que las señales ópticas procedentes de las cámaras de reacción pueden detectarse a través de la superficie plana inferior, en donde la distancia entre la superficie superior y la superficie inferior no es superior a 5 mm, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y cada cámara presenta una anchura en por lo menos una dimensión de entre 20  $\mu\text{m}$  y 70  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las superficies superior e inferior, en una realización, no es superior a 2 mm.

Otra realización se refiere a un panel para llevar a cabo reacciones comunes en paralelo separadamente en un ambiente acuoso. El panel puede comprender un sustrato que comprende por lo menos 10.000 cámaras de reacción discretas que contienen un material de partida que es capaz de reaccionar con un reactivo, estando dimensionada cada una de las cámaras de reacción de manera que, al administrar uno o más líquidos que contienen por lo menos un reactivo, en cada cámara de reacción el tiempo de fusión para que el reactivo salga por difusión del pocillo excede el tiempo necesario para que el material de partida reaccione con el reactivo para formar un producto.

Otra realización se refiere a un método para administrar un agente bioactivo en un panel. El método comprende dispersar sobre el panel una pluralidad de soportes sólidos móviles, presentando cada soporte sólido móvil por lo menos un reactivo inmovilizado sobre el mismo, en donde el reactivo resulta adecuado para la utilización en una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos, en donde el panel comprende una superficie plana con una pluralidad de cámaras de reacción dispuestas sobre la misma. Las cámaras de reacción pueden presentar un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , y cada cámara de reacción presenta una anchura en por lo menos una dimensión de entre 20  $\mu\text{m}$  y 70  $\mu\text{m}$ .

Otra realización se refiere a un aparato para la monitorización simultánea de un panel de cámaras de reacción para luz indicativa de que está teniendo lugar una reacción en un sitio particular. El aparato comprende: (a) un panel de cámaras de reacción formado a partir de un sustrato plano que comprende una pluralidad de superficies con cavidades, formando cada superficie con cavidad una cámara de reacción adaptada para contener analitos, y en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , presentando cada cámara de reacción un volumen de entre 10 y 150 pL, comprendiendo el panel más de 10.000 cámaras de reacción discretas; (b) un dispositivo ópticamente sensible dispuesto de manera que, durante su utilización, la luz procedente de una cámara de reacción particular, incidirá en una región predeterminada particular del dispositivo ópticamente sensible; (c) un medio para determinar el nivel de luz que incide sobre cada una de las regiones predeterminadas; y (d) un medio para registrar las variaciones del nivel de luz a lo largo del tiempo para cada una de las cámaras de reacción.

Otra realización se refiere a un sensor analítico, que comprende: (a) un panel formado a partir de un primer haz de fibras ópticas con una pluralidad de superficies con cavidades en un extremo de las mismas, formando cada superficie con cavidad una cámara de reacción adaptada para contener analitos, y en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , una anchura de entre 20 y 70  $\mu\text{m}$ , comprendiendo el panel más de 10.000 cámaras de reacción discretas; (b) un medio enzimático o fluorescente para generar luz en las cámaras de reacción; y (c) un medio de detección de luz que comprende un medio de captura de luz y un segundo haz de fibras ópticas para transmitir la luz hasta el medio de detección de luz, estando el segundo haz de fibras ópticas en contacto

óptico con el panel, de manera que la luz generada en una cámara de reacción individual resulta capturada por una fibra separada o por grupos de fibras separadas del segundo haz de fibras ópticas, para la transmisión al medio de captura de luz.

5 Otra realización se refiere a un método para llevar a cabo reacciones comunes en paralelo separadamente en un ambiente acuoso. La primera etapa implica administrar en un panel un líquido que contiene por lo menos un reactivo, en donde el panel comprende un sustrato que comprende por lo menos 10.000 cámaras de reacción discretas, estando adaptada cada cámara de reacción para contener analitos, y en donde las cámaras de reacción presentan un volumen de entre 10 y 150 pL y contienen un material de partida que es capaz de reaccionar con el reactivo, estando dimensionada  
10 cada una de las cámaras de reacción de manera que, al introducir el líquido en cada cámara de reacción, el tiempo de difusión para que el reactivo salga del pocillo por difusión excede el tiempo necesario para que el material de partida reaccione con el reactivo para formar un producto. La segunda etapa implica lavar el líquido del panel durante el tiempo (i) posterior a la reacción del material de partida con el reactivo para formar un producto en cada cámara de reacción, aunque (ii) anterior a que el reactivo introducido en cualquiera de las cámaras de reacción se haya difundido  
15 hacia el exterior de la cámara de reacción en cuestión y hacia el interior de otra cámara de reacción.

Otra realización se refiere a un método para administrar en un panel enzimas de secuenciación de ácidos nucleicos. El panel presenta una superficie plana con una pluralidad de cavidades en el mismo, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ . El método implica la etapa de dispersar sobre el panel una pluralidad de soportes sólidos móviles que presentan uno o más enzimas de secuenciación de ácidos nucleicos inmovilizados sobre el mismo, de manera que una pluralidad de las cámaras de reacción contiene por lo menos un soporte sólido móvil.

Otra realización se refiere a un método para administrar en un panel una pluralidad de ácidos nucleicos molde. El panel puede presentar una superficie plana con una pluralidad de cavidades en el mismo, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , y presentando el panel por lo menos 10.000 cámaras de reacción. El método comprende la etapa de dispersar sobre el panel una pluralidad de soportes sólidos móviles, presentando cada soporte sólido móvil no más de una única especie de ácido nucleico molde inmovilizado sobre el mismo, causando la dispersión que no más de un  
25 único soporte sólido móvil se introduzca en el interior de ninguna de las cámaras de reacción.

Otra realización se refiere a un método para la secuenciación de un ácido nucleico. El método comprende la etapa de proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos monocatenarios de molde dispuestos dentro de una pluralidad de cavidades en una superficie plana, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y la superficie plana presenta por lo menos 10.000 cámaras de reacción. La etapa siguiente implica llevar a cabo una reacción de secuenciación basada en el pirofosfato simultáneamente en todas las cámaras de reacción mediante hibridación de una cantidad efectiva de un cebador de secuenciación con los ácidos nucleicos de molde y extendiéndose el cebador de secuenciación con una polimerasa y un nucleótido trifosfato predeterminado, rindiendo un producto de secuenciación y, en el caso de  
35 que el nucleótido trifosfato predeterminado se incorpore en el extremo 3' del cebador de secuenciación, un producto secundario de la reacción de secuenciación. La tercera etapa implica identificar el producto secundario de la reacción de secuenciación, determinando de esta manera la secuencia del ácido nucleico en cada cámara de reacción.

Otra realización se refiere a un método para determinar en un panel la secuencia de bases de una pluralidad de nucleótidos. La primera etapa implica proporcionar por lo menos 10.000 ADN's molde, cada uno dispuesto separadamente dentro de una pluralidad de cavidades en una superficie plana, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y un volumen de entre 10 y 150 pL. La segunda etapa implica añadir un precursor activado nucleótido-5'-trifosfato de una base nitrogenada conocida a una mezcla de reacción en cada cámara de reacción, comprendiendo cada mezcla de reacción una nucleótido polimerasa dirigida por un molde y un polinucleótido monocatenario de molde hibridado con una cadena de oligonucleótido cebador complementario de longitud por lo menos un residuo nucleótido más corta que los moldes, para formar por lo menos un residuo nucleótido desapareado en cada molde en el extremo 3' de la cadena del cebador, bajo condiciones de reacción que permiten la incorporación del precursor activado nucleótido-5'-trifosfato en el extremo 3' de las cadenas de cebador, con la condición de que la base nitrogenada del precursor activado nucleótido-5'-trifosfato sea complementaria a la base nitrogenada del residuo nucleótido desapareado de los moldes. La  
45 tercera etapa implica detectar si el precursor nucleótido-5'-trifosfato se ha incorporado en las cadenas del cebador, en las que la incorporación del precursor nucleótido-5'-trifosfato indica que el residuo nucleótido desapareado del molde presenta una composición de bases nitrogenadas que es complementaria a la del precursor nucleótido-5'-trifosfato incorporado. La cuarta etapa implica repetir secuencialmente las etapas (b) y (c), en donde cada repetición secuencial añade y detecta la incorporación de un tipo de precursor activado nucleótido-5'-trifosfato de composición conocida de bases nitrogenadas. La quinta etapa implica determinar la secuencia de bases de los residuos nucleótidos desapareados del molde en cada cámara de reacción a partir de la secuencia de incorporación de los precursores nucleótidos.

Otra realización se refiere a un método para identificar la base en una posición diana en una secuencia de ADN molde. La primera etapa implica proporcionar por lo menos 10.000 ADN's molde separados, dispuestos separadamente dentro de una pluralidad de cavidades en una superficie plana, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , convirtiendo el ADN en monocatenario antes o después de la introducción en las cámaras de reacción. La segunda etapa implica

proporcionar un cebador de extensión que se hibrida con el ADN monocatenario inmovilizado en una posición inmediatamente contigua a la posición diana. El ADN monocatenario inmovilizado se somete a una reacción de polimerasa en presencia de un desoxinucleótido o dideoxinucleótido predeterminado, en donde, en el caso de que el desoxinucleótido o dideoxinucleótido predeterminado se incorpore en el extremo 3' del cebador de secuenciación, se forma un producto secundario de la reacción de secuenciación. La cuarta etapa implica identificar el producto secundario de la reacción de secuenciación, determinando de esta manera el nucleótido complementario a la base en la posición diana en cada uno de los 10.000 ADN's molde.

Otra realización se refiere a un aparato para analizar una secuencia de ácidos nucleicos. El aparato comprende: (a) una cubeta de administración de reactivo, en donde la cubeta incluye un panel que comprende una superficie plana con una pluralidad de cavidades en la misma, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ , y se encuentran más de 10.000 cámaras de reacción, y en donde la cubeta de administración de reactivo contiene reactivos para la utilización en una reacción de secuenciación; (b) un medio de administración de reactivo en comunicación con la cubeta de administración de reactivo; (c) un sistema de formación de imágenes en comunicación con la cámara de administración de reactivo; y (d) un sistema de recogida de datos en comunicación con el sistema de formación de imágenes.

Otra realización se refiere a un aparato para determinar la secuencia de bases de una pluralidad de nucleótidos en un panel. El aparato comprende: (a) una cubeta de reactivos que contiene una pluralidad de cavidades en una superficie plana, formando cada cavidad una cámara de reacción de analito, en donde existen más de 10.000 cámaras de reacción, presentando cada una un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y un volumen de entre 10 y 150 pL; (b) un medio de administración de reactivo para añadir simultáneamente a cada cámara de reacción un precursor activado nucleótido-5'-trifosfato de una base nitrogenada conocida a una mezcla de reacción en cada cámara de reacción, comprendiendo cada mezcla de reacción una nucleótido polimerasa dirigida por un molde y un polinucleótido monocatenario molde hibridado con una cadena complementaria de un oligonucleótido cebador de longitud por lo menos un residuo nucleótido menor que los moldes, formando por lo menos un residuo nucleótido desapareado en cada molde en el extremo 3' de la cadena del cebador, bajo condiciones de reacción que permiten la incorporación del precursor activado nucleótido-5'-trifosfato en el extremo 3' de las cadenas del cebador, con la condición de que la base nitrogenada del precursor activado nucleótido-5'-trifosfato sea complementaria a la base nitrogenada del residuo nucleótido desapareado de los moldes; (c) medio de detección para detectar en cada cámara de reacción si se ha incorporado el precursor nucleótido-5'-trifosfato en las cadenas del cebador, en las que la incorporación del precursor nucleótido-5'-trifosfato indica que el residuo nucleótido desapareado del molde presenta una composición de bases nitrogenadas que es complementaria a la del precursor nucleótido-5'-trifosfato incorporado; y (d) un medio para repetir secuencialmente (b) y (c), en el que cada repetición secuencial añade y detecta la incorporación de un tipo de precursor activado nucleótido-5'-trifosfato de composición conocida de bases nitrogenadas, y (e) un medio de procesamiento de datos para determinar la secuencia de bases de los residuos nucleótidos desapareados del molde simultáneamente en cada cámara de reacción a partir de la secuencia de incorporación de los precursores nucleótidos.

Otra realización se refiere a un aparato para procesar una pluralidad de analitos. El aparato comprende: (a) una cámara de flujo en la que se ha dispuesto un sustrato que comprende por lo menos 50.000 superficies con cavidades sobre un haz de fibra óptica, formando cada superficie con cavidad una cámara de reacción adaptada para contener analitos, y en donde las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$  y un diámetro de entre 20 y 70  $\mu\text{m}$ ; (b) un medio líquido para administrar reactivos de procesamiento de uno o más reservorios a la cámara de flujo, de manera que los analitos dispuestos en las cámaras de reacción quedan expuestas a los reactivos; y (c) un medio de detección para detectar simultáneamente una secuencia de señales ópticas procedentes de cada una de las cámaras de reacción, siendo indicativa cada señal óptica de la secuencia, de una interacción entre un reactivo de procesamiento y el analito dispuesto en la cámara de reacción, en donde el medio de detección se encuentra en comunicación con las superficies con cavidades.

Otra realización se refiere a un método para secuenciar un ácido nucleico. La primera etapa implica proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos monocatenarios de molde en un panel que presenta por lo menos 50.000 sitios de reacción discretos. La segunda etapa implica poner en contacto los ácidos nucleicos molde con reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de secuenciación basada en pirofosfato acoplada a la emisión de luz. La tercera etapa implica detectar la luz emitida desde una pluralidad de sitios de reacción en porciones respectivas de un dispositivo ópticamente sensible. La cuarta etapa implica convertir la luz incidente en cada una de las porciones del dispositivo ópticamente sensible en una señal eléctrica que es distinguible de las señales procedentes de la totalidad de los demás sitios de reacción. La quinta etapa implica determinar la secuencia de los ácidos nucleicos molde basándose en la emisión de luz de cada sitio de reacción discreto a partir de la correspondiente señal eléctrica.

Otra realización se refiere a un método para secuenciar ácidos nucleicos. La primera etapa implica fragmentar moléculas grandes de ácidos nucleicos de molde para generar una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados. La segunda etapa implica unir individualmente a perlas una cadena de entre una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentos para generar ácidos nucleicos monocatenarios unidos individualmente a perlas. La tercera etapa implica administrar una población de ácidos nucleicos fragmentados monocatenarios unidos individualmente a perlas, en un panel de por lo menos 10.000 cámaras de reacción en una superficie plana, en donde una pluralidad de los pocillos comprende no más de una perla con un ácido nucleico fragmentado monocatenario. La cuarta etapa implica llevar a cabo una reacción de secuenciación simultáneamente en una pluralidad de las cámaras de reacción. La reacción de secuenciación

ción puede presentar las etapas siguientes: (a) hibridar una cantidad efectiva de un cebador de secuenciación con los ácidos nucleicos fragmentados monocatenarios de molde y extender el cebador de secuenciación con una polimerasa y un nucleótido trifosfato predeterminado, rindiendo un producto de secuenciación y, en el caso de que el nucleótido trifosfato predeterminado se incorpore en el extremo 3' del cebador de secuenciación, un producto secundario de la reacción de secuenciación; y (b) identificar el producto secundario de la reacción de secuenciación, determinando de esta manera la secuencia del ácido nucleico en una pluralidad de cámaras de reacción. Alternativamente, la reacción de secuenciación puede comprender las etapas siguientes: (a) hibridar dos o más cebadores de secuenciación con uno o con una pluralidad de cadenas individuales de la molécula de ácidos nucleicos, en donde la totalidad de los cebadores excepto uno son cebadores reversiblemente bloqueados; (b) incorporar por lo menos una base en la molécula de ácidos nucleicos mediante elongación por una polimerasa a partir de un cebador no bloqueado; (c) evitar la elongación adicional del cebador no bloqueado; (d) desbloquear uno de los cebadores bloqueados reversiblemente, formando un cebador desbloqueado; y (e) repetir las etapas (b) a (d) hasta desbloquear, y utilizar para determinar una secuencia, por lo menos uno de los cebadores reversiblemente bloqueados.

Pueden encontrarse otros materiales y métodos en las solicitudes copendientes siguientes: patente WO 2004/069849, presentada el 28 de enero de 2004, y patente WO 2004/070005, presentada el 28 de enero de 2004.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Preparación de las muestras*

##### *Muestra de ADN*

El ADN debería ser de elevada calidad y encontrarse libre de contaminantes, tales como proteínas, nucleasas, lípidos y otros compuestos químicos (tales como EDTA residual de la preparación) y sales. Resulta preferente que el ADN genómico presente una proporción 260/280 de 1,8 o superior. En caso de desearse la secuenciación del genoma de únicamente un organismo, debería comprobarse la calidad del ADN para garantizar la ausencia de ADN contaminante. Por ejemplo, puede comprobarse una preparación de ADN humano mediante PCR para garantizar que no se encuentre contaminada por moléculas de ADN bacteriano. Otro método para comprobar que no hay contaminación utiliza patrones de digestión de restricción y especialmente la digestión de restricción seguida de transferencia southern utilizando sondas adecuadas que es conocido que son específicas de un organismo (por ejemplo de ser humano o de ratón) y una segunda sonda que es conocido que es específica de un posible organismo contaminante (por ejemplo *E. coli*). Si se desea, el ADN debería originarse a partir de un único clon del organismo (por ejemplo una colonia, si procede de una bacteria).

### Etapas 1

#### *Digestión con ADNasa I*

El propósito de la etapa de digestión con ADNasa I es fragmentar un tramo largo de ADN, tal como un genoma completo o una porción grande de un genoma, en especies más pequeñas. Esta población de especies de ADN de menor tamaño generadas a partir de un único ADN molde se denomina "biblioteca". La desoxirribonucleasa I (ADNasa I) es una endonucleasa que corta ADN bicatenario molde. Las características de corte de la ADNasa I permiten la digestión aleatoria del ADN molde (es decir, un sesgo de secuencias mínimo), resultando en el predominio de fragmentos de ADN bicatenarios de extremos romos al utilizarlo en presencia de tampones basados en manganeso (Melgar y Goldthwait 1968). La digestión de moldes genómicos con ADNasa depende de tres factores: i) la cantidad de enzima utilizada (unidades); ii) la temperatura de digestión (°C); e iii) el tiempo de incubación (minutos). Se optimizaron las condiciones de digestión con ADNasa I que se indican de manera general posteriormente, rindiendo bibliotecas de ADN con un tamaño comprendido en el intervalo de entre 50 y 700 pares de bases (pb).

1. Se obtuvo y se preparó ADN a una concentración de 0,3 mg/ml en Tris-HCl (10 mM, pH 7 a 8). Se requirió un total de 134 µl de ADN (15 µg) para esta preparación. Se recomienda no utilizar preparaciones de ADN diluidas con tampones que contienen EDTA (es decir, TE, Tris/EDTA). La presencia de EDTA es inhibidora de la digestión enzimática con ADNasa I. Si la preparación de ADN contiene EDTA, es importante que el ADN se separe mediante extracción salina de la solución y se reconstituya con el tampón Tris-HCl (10 mM, pH 7 a 8) o H<sub>2</sub>O nanopura (pH 7 a 8).
2. En un tubo de 0,2 ml se preparó tampón de ADNasa I, que comprendía 50 µl de Tris, pH 7,5 (1 M), 10 µl de MnCl<sub>2</sub> (1 M), 1 µl de BSA (100 mg/ml) y 39 µl de agua.
3. En un tubo separado de 0,2 ml, se añadieron 15 µl de tampón ADNasa I y 1,5 µl de ADNasa I (1 U/ml). Se introdujo el tubo de reacción en un ciclador térmico fijado a 15°C.



## ES 2 330 339 T3

4. Se añadieron 134  $\mu$ l de ADN (0,3 mg/ml) al tubo de reacción de ADNasa I en un ciclador térmico fijado a 15°C. Se cerró la tapa y la muestra se incubó durante exactamente 1 minuto. Tras la incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de EDTA 50 mM para detener la digestión enzimática.

5. El ADN digerido se purificó mediante la utilización del kit QiaQuick de purificación por PCR. A continuación, la reacción de digestión se dividió en cuatro alícuotas y se utilizaron cuatro columnas de centrifugación para purificar cada alícuota (37,5  $\mu$ l por columna de centrifugación). Se eluyó cada columna con 30  $\mu$ l de tampón de elución (EB) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, los eluidos se agruparon, generando un volumen de reacción final de 120  $\mu$ l.

6. Se salvó una alícuota de 3  $\mu$ l de la reacción de digestión para el análisis con un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip.

### Etapa 2

#### *Pulido con Pfu*

La digestión de los moldes de ADN con ADNasa I rinde fragmentos de ADN que presentan principalmente extremos romos. Sin embargo, algunos fragmentos presentarán extremos que contienen extremos protuberantes de uno o dos nucleótidos de longitud. El pulido con *Pfu* se utiliza para incrementar el número de especies con extremos romos mediante rellenado (es decir, “formación de extremos romos”) de los salientes 5'. Además, la ADN polimerasa *Pfu* presenta actividad exonucleasa 3'→5' que resultará en la eliminación de las extensiones de uno o dos nucleótidos. El pulido con *Pfu* incrementa el número de fragmentos de ADN con extremos romos disponibles para la ligación de adaptadores (Costa 1994a, 1994b, 1994c). Se utilizó el protocolo de pulido con *Pfu* siguiente.

1. En un tubo de 0,2 ml, se añadieron en orden 115  $\mu$ l de fragmentos de ADN purificados digeridos con ADNasa I, 15  $\mu$ l de tampón *Pfu* clonado 10X, 5  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) y 15  $\mu$ l de *Pfu* ADN polimerasa clonada (2,5 U/ $\mu$ l).

2. Los componentes de la reacción de pulido se mezclaron bien y se incubaron a 72°C durante 30 minutos.

3. Tras la incubación, se retiró el tubo de reacción y se mantuvo en hielo durante 2 minutos.

4. A continuación, la mezcla de reacción de pulido se dividió en cuatro alícuotas y se purificó utilizando columnas QiaQuick de purificación por PCR (37,5  $\mu$ l en cada columna). Cada columna se eluyó con 30  $\mu$ l de tampón EB siguiendo el protocolo del fabricante. Seguidamente se agruparon los eluidos, generando un volumen final de reacción de 120  $\mu$ l.

5. Se salvó una alícuota de 3  $\mu$ l de la reacción final de pulido para el análisis con el BioAnalyzer DNA 1000 LabChip.

### Etapa 3

#### *Ligación de adaptadores universales a biblioteca de ADN fragmentado*

Tras la fragmentación y pulido de la biblioteca de ADN genómico, se añadieron secuencias de cebador a los extremos de cada fragmento de ADN. Estas secuencias de cebador se denominan “adaptadores universales” y comprenden oligonucleótidos bicatenarios que contienen regiones de cebado específicas que permiten tanto la amplificación por PCR como la secuenciación de nucleótidos. Los adaptadores universales están diseñados para incluir un conjunto de regiones de cebado de PCR que presentan una longitud de 20 pares de bases, situadas contiguamente a un conjunto de regiones únicas de cebado de secuenciación que presentan una longitud de 20 pares de bases, seguido de una “llave” única de 4 bases que consiste de uno de cada desoxirribonucleótido (es decir, A, C, G y T). Cada adaptador universal único (denominado “adaptador universal A” y “adaptador universal B”) presenta una longitud de cuarenta y cuatro pares de bases (44 pb). Se ligan los adaptadores universales utilizando ADN ligasa de T4, a cada extremo del fragmento de ADN, generando una adición total de nucleótidos de 88 pb en cada fragmento de ADN. Cada adaptador universal diferente está diseñado específicamente para cada preparación de biblioteca de ADN genómico y por lo tanto proporcionará un identificador único para cada organismo.

Para preparar una pareja de adaptadores universales, se diseñan oligonucleótidos monocatenarios en el laboratorio de los inventores y se fabrican mediante un proveedor comercial. Los oligonucleótidos de ADN del adaptador universal están diseñados con dos enlaces fosforotioato en cada extremo oligonucleotídico que sirve de protección frente a la actividad nucleasa (Samini, T.D., B. Jolles y A. Laigle, Best minimally modified antisense oligonucleotides according to cell nuclease activity, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11(3):129, 2001).

Se purificó mediante HPLC cada oligonucleótido para garantizar la ausencia de secuencias de oligonucleótidos de ADN contaminantes o espurios en la preparación final.

## ES 2 330 339 T3

Los adaptadores universales se diseñan para permitir la ligación direccional al ADN genómico fragmentado de extremos romos. Para cada pareja de adaptadores universales, la región de cebado de PCR contiene un saliente 5' de cuatro bases y una región llave 3' de extremo romo. La direccionalidad se consigue mediante ligación del extremo romo del adaptador universal con el fragmento de ADN de extremos romos, mientras que el saliente 5' del adaptador no puede ligarse al fragmento de ADN de extremos romos. Además, se añade una biotina 5' al adaptador universal B para permitir el aislamiento posterior del molde de ADNmc (Etapa 8). Se prepara cada adaptador universal mediante hibridación, en un único tubo, de dos oligonucleótidos de ADN complementario monocatenario (es decir, un oligo que contiene la secuencia sentido y un segundo oligo que contiene la secuencia antisentido). Se utilizó el protocolo de ligación siguiente.

1. En un tubo de 0,2 ml, se añadieron en orden 39  $\mu$ l de  $\text{nH}_2\text{O}$  (agua de grado para biología molecular), 25  $\mu$ l de biblioteca de ADN pulido, 100  $\mu$ l de tampón de reacción de ligasa ácida 2X, 20  $\mu$ l de conjunto de adaptadores MMP1 (10  $\mu$ M/ $\mu$ l), proporción 100:1 y 16  $\mu$ l de ligasa Quick. La reacción de ligación se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.
2. A continuación, se separó la reacción de ligación y una alícuota de 10  $\mu$ l de la reacción de ligación se purificó para la utilización en el BioAnalyzer. Se utilizó una única columna de centrifugación del kit Min-Elute de Qiagen. La columna se eluyó con 10  $\mu$ l de EB siguiendo el procedimiento en el protocolo del fabricante. Se cargó una alícuota de 1  $\mu$ l de la reacción de ligación purificada utilizando un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip. Esta etapa de purificación está recomendada debido a que la reacción de ligación no purificada contiene cantidades elevadas de sales y PEG, que inhibirán el análisis correcto de la muestra en el BioAnalyzer.
3. Se utilizó el resto de la reacción de ligación (190  $\mu$ l) para el aislamiento en gel, en la Etapa 4.

### Etapa 3a

*Filtración con Microcon y construcción de adaptador. Tiempo total de preparación: aproximadamente 25 minutos*

La reacción de ligación del adaptador universal requiere un exceso de adaptadores de 100 veces. Para ayudar a la eliminación de este exceso de adaptadores, la biblioteca de ADN<sub>g</sub> bicatenario se filtra a través de un dispositivo de filtración YM-100 de Microcon. Las membranas YM-100 de Microcon pueden utilizarse para eliminar el ADN bicatenario de longitud inferior a 125 pb. Por lo tanto, los adaptadores no unidos (44 pb), así como los dímeros adaptadores (88 pb) pueden eliminarse de la población de biblioteca de ADN<sub>g</sub> ligado. Se utilizó el protocolo de filtración siguiente:

1. Se aplicaron 190  $\mu$ l de la reacción de ligación de la Etapa 4 a un dispositivo YM-100 de Microcon.
2. El dispositivo se introdujo en una centrífuga y se centrifugó a 5.000xg durante aproximadamente 6 minutos, o hasta que la membrana se encontrase prácticamente seca.
3. Para lavar, se añadieron 200  $\mu$ l de tampón 1X TE.
4. La muestra se centrifugó a 5.000xg durante 9 minutos adicionales o hasta que la membrana se encontrase prácticamente seca.
5. Para la recuperación, el reservorio se insertó en un nuevo vial y se centrifugó a 3.000xg durante 3 minutos. Se descartó el reservorio. El volumen recuperado fue de aproximadamente 10  $\mu$ l. A continuación, se añadieron 80  $\mu$ l de TE.

Se purificaron los adaptadores (A y B) mediante HPLC y se modificaron con enlaces fosforotioato antes de su utilización. Para el adaptador "A" (10  $\mu$ M), se mezclaron 10  $\mu$ l de adaptador A 100  $\mu$ M (44 pb, cadena sentido) con 10  $\mu$ l de adaptador A 100  $\mu$ M (40 pb, cadena antisentido) y se añadieron 30  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X ( $V_f=50$   $\mu$ l). Los cebadores se hibridaron utilizando el programa ANNEAL en el ciclador térmico de laboratorio para muestras preparativas (ver posteriormente). Para el adaptador "B" (10  $\mu$ M), se mezclaron 10  $\mu$ l de adaptador B 100  $\mu$ M (40 pb, cadena sentido) con 10  $\mu$ l de adaptador B 100  $\mu$ M (44 pb, cadena antisentido) y 30  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X ( $V_f=50$   $\mu$ l). Los cebadores se hibridaron utilizando el programa ANNEAL en el ciclador térmico de laboratorio de muestras preparativas. Los conjuntos de adaptadores se almacenaron a -20°C hasta la utilización.

Programa ANNEAL-A para la hibridación de cebadores:

1. Incubación a 95°C, 1 minuto,
2. Reducción de la temperatura hasta 15°C, a 0,1°C/s, y
3. Mantenimiento de la temperatura a 15°C.

## ES 2 330 339 T3

No resultó necesaria ninguna orientación particular para el fragmento insertado de ADN genómico ni para los adaptadores. Los fragmentos pudieron ligarse en cualquiera de los extremos. Se incluyeron cuatro oligonucleótidos de ADN monocatenario en el conjunto de adaptadores universales. Se sintetizó cada oligonucleótido monocatenario a escala de 1 micromol y se purificó mediante HPLC. Cada oligonucleótido monocatenario incluía cuatro enlaces fosforotioato en cada extremo.

### Etapa 4

#### *Electroforesis en gel y extracción de la biblioteca de ADN adaptado*

El protocolo de ligación de adaptadores universales produce lo siguiente: 1) ADNs fragmentados con adaptadores en cualquiera de los extremos; 2) adaptadores individuales no unidos; o 3) la formación de adaptadores dímeros. La electroforesis en gel de agarosa se utiliza como método para separar y aislar la población de biblioteca de ADN adaptador de las poblaciones de adaptadores individuales no ligados y de adaptadores dímeros. El procedimiento de digestión con ADNasa I del ADN genómico rinde una población de biblioteca con tamaños comprendidos entre 50 y 700 pb (Etapa 1). La adición del conjunto de adaptadores universales de 88 pb desplazará la población a un tamaño mayor y resultará en un perfil de migración en el intervalo de tamaños de entre aproximadamente 130 y 800 pb. Los adaptadores dímeros migrarán a 88 pb y los adaptadores no ligados migrarán a 44 pb. Por lo tanto, las bibliotecas de ADN genómico de tamaños >200 pb pueden aislarse físicamente del gel de agarosa y purificarse utilizando técnicas estándares de extracción en gel. El aislamiento en gel de la biblioteca de ADN adaptado resultará en la recuperación de una población de biblioteca en un intervalo de tamaños que es  $\geq 200$  pb (el intervalo de tamaños de la biblioteca puede modificarse dependiendo de la aplicación). Se utilizó el protocolo siguiente de electroforesis y extracción.

1. Se preparó un gel de agarosa al 2%.
2. Se añadieron 10  $\mu$ l de pigmento Ready-Load 10X a los 90  $\mu$ l restantes de mezcla de ligación de ADN.
3. La mezcla de pigmento/reacción de ligación se cargó en el gel utilizando cuatro carriles contiguos (25  $\mu$ l por carril).
4. Se cargaron 10  $\mu$ l de la escalera de 100 pb (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) a dos carriles de los carriles de la reacción de ligación.
5. Se corrió el gel a 100 V durante 3 horas.
6. Al completar el corrido del gel, se extrajo el gel de la caja y se transfirió a una superficie plana cubierta con película de plástico. Se visualizaron las bandas de ADN utilizando una lámpara manual de UV de longitud de onda larga. Utilizando un bisturí desechable estéril, se recortaron los fragmentos de tamaños entre 200 y 400 pb del gel de agarosa. Mediante la utilización de este procedimiento, pueden aislarse bibliotecas de cualquier intervalo de tamaños. También resulta posible aislar más de un intervalo de tamaños. En el caso de que el intervalo de tamaños de la biblioteca sea de 200 a 900 pb, resulta posible aislar varios intervalos de tamaño de un único pocillo (es decir, 200 a 400 pb y 500 a 700 pb).
7. El ADN incluido en el gel de agarosa se aisló utilizando un kit de extracción de gel MinElute de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió tampón QG para cubrir la agarosa en el tubo. Se dejó que la agarosa se disolviese por completo. Se mantuvo el color del tampón QG ajustando el pH siguiendo las instrucciones de Qiagen para minimizar la pérdida de muestra. Se utilizaron dos columnas de centrifugación MinElute (Qiagen) para la purificación. El gran volumen de agarosa disuelta requirió que cada columna se cargase varias veces. Las columnas se eluyeron con 10  $\mu$ l de tampón EB precalentado a 55°C. Los eluidos se agruparon, produciendo 20  $\mu$ l de biblioteca de ADNg.
8. Se analizó 1  $\mu$ l de alícuota de cada biblioteca de ADN aislada utilizando un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip para evaluar la distribución exacta de la población de biblioteca de ADN.

### Etapa 5

#### *Desplazamiento de cadena y extensión de biblioteca de ADN bicatenario con muesca*

Debido a que los oligonucleótidos de ADN utilizados para los adaptadores universales no están fosforilados, se encuentran huecos en las uniones 3' de los ADNg fragmentados. Estos dos "huecos" o "muescas" pueden rellenarse mediante la utilización de una ADN polimerasa de desplazamiento de cadena. La polimerasa reconoce las muescas, desplaza las cadenas con muesca y extiende la cadena de una manera que resulta en la reparación de las muescas y en la formación de ADN bicatenario sin muescas. El enzima de desplazamiento de cadena utilizado es el fragmento grande de la ADN polimerasa *Bst*.

1. En un tubo de 0,2 ml, se añadieron en orden 19  $\mu$ l de biblioteca de ADN extraída de gel, 40  $\mu$ l de  $\text{nH}_2\text{O}$ , 8  $\mu$ l de tampón de reacción ThermoPol 10X, 8  $\mu$ l de BSA (1 mg/ml), 2  $\mu$ l de dNTPs (10 mM) y 3  $\mu$ l de polimerasa *Bst*II (8 U/ $\mu$ l).

## ES 2 330 339 T3

2. Las muestras se mezclaron bien y se introdujeron en un ciclador térmico y se incubaron utilizando el programa de incubación de desplazamiento de cadena: “BST”. El programa BST para el desplazamiento y extensión de cadenas de ADN bicatenario con muescas es el siguiente:

1. Incubación a 65°C, 30 minutos,
2. Incubación a 80°C, 10 minutos,
3. Incubación a 58°C, 10 minutos, y
4. Mantenimiento a 14°C.

3. Se corrió una alícuota de 1  $\mu$ l de la biblioteca de ADN tratado con *Bst*, utilizando un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip.

### Etapas 6

#### *Preparación de perlas con estreptavidina*

Tras la generación del ADN genómico bicatenario sin muescas, resulta necesario aislar los ADNs genómicos monocatenarios que contienen secuencias flanqueantes de adaptador universal. La presente etapa describe generalmente la unión de ADN bicatenario etiquetado con biotina a perlas con estreptavidina. Para la preparación de las perlas con estreptavidina se utilizó el protocolo siguiente.

1. Se lavaron 100  $\mu$ l de perlas con estreptavidina Dynal M-270 dos veces con 200  $\mu$ l de tampón de unión 1X (NaCl 1 M, EDTA 0,5 mM, Tris 5 mM, pH 7,5) mediante la introducción de las perlas magnéticas en el concentrador MPC.
2. Las perlas se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de unión “X” y después se añadieron los 79  $\mu$ l restantes a la muestra de ADN tratada con *Bst* (de la Etapa 5) y 20  $\mu$ l de agua.
3. Se mezcló bien la solución de perlas y se introdujo en un tubo rotativo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las mezclas de perlas se lavaron, utilizando el MPC, dos veces con 100  $\mu$ l de tampón de unión 1X, después se lavaron dos veces con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se preparó tampón de unión y lavado (B&W) (2X y 1X): B&W 2X mediante la mezcla de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM y NaCl 2 M. Los reactivos se agruparon tal como se ha indicado anteriormente y se mezclaron uniformemente. La solución puede almacenarse a temperatura ambiente durante 6 meses; se preparó tampón B&W 1X mediante la mezcla de tampón B&W 2X con  $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1. Las concentraciones finales eran la mitad de las anteriormente indicadas, es decir Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), EDTA 0,5 mM y NaCl 1 M.

### Etapas 7

#### *Aislamiento de biblioteca de ADN monocatenario utilizando perlas con estreptavidina*

Tras la unión de la biblioteca de ADN bicatenario a las perlas con estreptavidina, resulta preferente aislar del pool de ligados únicamente los ADN monocatenarios que contienen adaptador universal A y adaptador universal B (las poblaciones deseadas se señalan a continuación con asteriscos). Los pools de fragmentos de ADN genómico bicatenario presentarán adaptadores unidos en las configuraciones posibles siguientes:

Adaptador universal A-fragmento de ADN-adaptador universal A

Adaptador universal B-fragmento de ADN-adaptador universal A\*

Adaptador universal A-fragmento de ADN-adaptador universal B\*

Adaptador universal B-fragmento de ADN-adaptador universal B

Debido a que únicamente el adaptador universal B presenta un grupo de biotina 5', pueden utilizarse las perlas magnéticas que contienen estreptavidina para unirse a la totalidad de las especies de la biblioteca de ADN que presentan el adaptador universal B. Las poblaciones de biblioteca genómica que contienen dos especies de adaptador universal A (o especies no ligadas) no se unen a perlas que contienen estreptavidina y resultan eliminadas durante el procedimiento de lavado. Entre las especies que permanecen unidas a perlas tras el lavado se incluyen aquellas con los adaptadores universales A y B o aquellas con dos extremos de adaptador universal B.

## ES 2 330 339 T3

Las especies de ADN genómico con dos secuencias de adaptador universal B con dos moléculas de biotina pueden unirse a las perlas que contienen estreptavidina en ambos extremos. Las especies con adaptadores A y B que presenten únicamente una sola molécula de biotina pueden unirse a las perlas únicamente en el extremo "B". Para aislar la población monocatenaria, se trata el ADN bicatenario unido a perlas con una solución de hidróxido sódico que sirve para romper los enlaces de hidrógeno entre las cadenas complementarias de ADN. Si el fragmento de ADN presenta biotina en cada extremo (extremos del adaptador universal B), ambas cadenas individuales resultantes permanecen unidas a las perlas. Si el fragmento presenta únicamente una sola biotina (adaptadores universales A y B), la cadena complementaria se separa del complejo de ADN-perla.

La biblioteca de ADN genómico monocatenario resultante se recoge de la fase solución y se cuantifica, por ejemplo utilizando la secuenciación a partir de pirofosfato (PyroSequence) o mediante la utilización de un RNA Pico 6000 Lab-Chip (Agilent, Palo Alto, CA). Las bibliotecas de ADN genómico monocatenario se cuantifican mediante el cálculo del número de moléculas por unidad de volumen. Seguidamente se hibridan las moléculas de ADN monocatenario (a media copia por perla para obtener una copia efectiva por perla) a perlas de sefarosa de entre 25 y 30  $\mu\text{m}$  que contienen cebadores de captura de ADN (cebador B de PCR). A continuación, los moldes se amplifican utilizando protocolos de reacción en cadena de la polimerasa en emulsión. La secuenciación posterior puede llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas. Para el aislamiento de la biblioteca monocatenaria, se utilizó el protocolo siguiente.

1. Se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de solución de fundido (NaOH 0,125 M, NaCl 0,1 M) a las perlas lavadas de la Etapa 6, anteriormente.
2. La solución de perlas se mezcló bien y la mezcla de perlas se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en tubo rotativo.
3. Se utilizó un MPC Dynal (concentrador de partículas magnéticas), se extrajeron con cuidado las perlas en el pellet y se reservó el sobrenadante. Los 250  $\mu\text{l}$  de sobrenadante incluían la biblioteca de ADN monocatenario.
4. En un tubo separado, se añadieron 1250  $\mu\text{l}$  de PB (del kit de purificación QiaQuick) y la solución se neutralizó mediante adición de 9  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 20%.
5. Utilizando un MPC e Dynal, se peletizaron las perlas del sobrenadante de 250  $\mu\text{l}$ , incluyendo la biblioteca de ADN monocatenario, y se extrajo con cuidado el sobrenadante y se transfirió a la solución recién preparada de PB/ácido acético.
6. Se purificaron los 1500  $\mu\text{l}$  de solución utilizando una única columna de purificación por centrifugación QiaQuick (muestra de carga a través de la misma columna dos veces; 750  $\mu\text{l}$  por carga). Se eluyó la biblioteca de ADN monocatenario con 50  $\mu\text{l}$  de EB.

### **Etapa 8a**

*Cuantificación del ADN monocatenario utilizando secuenciación a partir de pirofosfato. El tiempo total de preparación fue de aproximadamente 1 hora*

1. En un tubo de 0,2 ml se añadieron los reactivos siguientes, en orden:

25 $\mu\text{l}$	ADNg monocatenario
1 $\mu\text{l}$	cebador de secuenciación MMP2B
14 $\mu\text{l}$	<u>Tampón de hibridación de biblioteca</u>
40 $\mu\text{l}$	total

2. Se dejó que el ADN se hibridase utilizando el programa ANNEAL-S (ver el apéndice, posteriormente).
3. Las muestras se analizaron mediante PSQ (dispositivo de secuenciación a partir de pirofosfato) para determinar el número de picomoles de molde en cada muestra (ver posteriormente). Pueden encontrarse métodos de secuenciación en la patente US 6.274.320; la patente US 4.863.849; la patente US 6.210.891; y la patente US 6.258.568. Se llevaron a cabo cálculos para determinar el número de moléculas de ADN monocatenario de molde por microlitro. Se utilizaron los 25  $\mu\text{l}$  restantes de biblioteca de ADN monocatenario preparado para la amplificación y la posterior secuenciación (aproximadamente  $1 \times 10^6$  reacciones).

## ES 2 330 339 T3

### Etapa 8b

*Cuantificación de ADNg monocatenario utilizando RNA Pico 6000 LabChip. Tiempo total de preparación: aproximadamente 30 minutos*

1. Se seleccionó la opción ensayo Pico del ARNm en el BioAnalyzer (versión 2.12 del programa).
2. Se preparó un RNA Pico 6000 LabChip en el BioAnalyzer siguiendo las recomendaciones del fabricante.
3. Se preparó una escalera del RNA LabChip (escalera RNA 6000) siguiendo las indicaciones del fabricante (Ambion). Brevemente, la escalera RNA LabChip, en solución, se calentó a 70°C durante 2 minutos. La solución se enfrió sobre hielo durante 5 minutos para enfriar rápidamente la escalera. La solución se centrifugó brevemente para desprender cualquier condensado de las paredes del tubo. La escalera RNA LabChip se almacenó sobre hielo y se utilizó en menos de un día.
4. Se corrió la biblioteca de ADNmc por triplicado, en carriles contiguos, utilizando tres alícuotas de 1 µl.
5. Se utilizó el programa BioAnalyzer para calcular la concentración de cada carril de biblioteca de ADNmc (ver la Tabla, posteriormente, y la figura 24). Se utilizó la media de los tres carriles para calcular la concentración de ADN de la biblioteca utilizando el procedimiento descrito generalmente a continuación.
  - a. Se desplazó la línea de límite inferior de integración del pico (línea discontinua en la figura 24) inmediatamente delante del pico de la biblioteca (ver posteriormente).
  - b. Se desplazó la línea de límite superior de integración del pico (línea discontinua en la figura 24) inmediatamente después del pico de la biblioteca. De esta manera, la línea de integración del pico que conecta las líneas de integración inferior y superior seguían la pendiente del fondo.
  - c. Se utilizó el puntero del ratón para determinar el tamaño medio del pico en bases (habitualmente próximo al punto más alto del pico) o se utilizó un pico definido según seleccionó el software.
  - d. El valor integrado se utilizó para la cantidad de material en el pico. El valor obtenido de picogramos recuperados se convirtió en moléculas recuperadas (ver la Tabla, posteriormente). A continuación, se determinó la concentración de la biblioteca (moléculas por microlitro).

TABLA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		pg/µl (1)	pg/µl (2)	pg/µl (3)	Promedio pg/µl	Media Tamaño (pb) 1	Media Tamaño (pb) 2	Media Tamaño (pb) 3	Promedio Tamaño (pb)
muestra		1633	1639	1645	1639	435	435	432	434

	10	11	12	13	14	15
	PM promedio (g/mol)	PM promedio (g/mol)	Biblioteca g/µl	moles/g	moles/µl	moléculas/µl
	Ribonucleótido					
	328,2	$1,42 \times 10^5$	$1,64 \times 10^{-9}$	$7,02 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-14}$	$6,93 \times 10^9$

Tal como se muestra en la Tabla, anteriormente, se calculó que la concentración de la Biblioteca 1 era de 1.639 pg/µl (columna 5) y el tamaño medio de fragmento era de 434 nucleótidos (columna 9). Estos valores se obtuvieron del programa Agilent 2100, tal como se describe en las etapas (a) a (d), anteriormente. El peso molecular (PM) promedio de un ribonucleótido es 328,2 g/mol (columna 10). El PM del fragmento medio de biblioteca ( $1,42 \times 10^5$  g/mol, columna 11) se calculó multiplicando la longitud media de fragmento (434) por el ribonucleótido medio (328,2). La biblioteca cuantificada (1.639 pg/µl) se convirtió en gramos por microlitro ( $1,64 \times 10^{-9}$  g/µl, columna 12). El número de moles por microlitro ( $1,15 \times 10^{-14}$  moles/µl, columna 14) se calculó dividiendo los gramos por microlitro ( $1,64 \times 10^{-9}$  g/µl, columna 12) por el peso molecular medio de los fragmentos de biblioteca ( $1,42 \times 10^5$ , columna 11). Finalmente, el número de moléculas por microlitro ( $6,93 \times 10^9$  moléculas/µl, columna 15) se derivó multiplicando el número de moles por microlitro ( $1,15 \times 10^{-14}$  moles/µl, columna 14) por el número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$  moléculas/mol).

Se esperaba que la concentración final de la biblioteca fuese superior a  $1 \times 10^8$  moléculas/µl. Un factor más importante para la calidad de la biblioteca era la concentración de adaptadores dímeros. En la figura 24 se determinó

## ES 2 330 339 T3

que la altura del pico de la biblioteca era aproximadamente 10 veces superior al pico de dímeros adaptadores (el primer pico después del marcador). Se espera que una biblioteca de buena calidad presente una altura de pico por lo menos 2 veces mayor que el pico de dímeros. Debe indicarse que el RNA Pico 6000 LabChip proporciona estimaciones con una precisión del 500% de la concentración de ADNg monocatenario. De esta manera, resultaba importante llevar a cabo una secuenciación inicial utilizando una titulación del molde para determinar el número de copias por perla (cpb) de ADNg de entrada. El cpb recomendado de ADN de entrada es 2,5 cpb, 1 cpb, 0,5 cpb y 0,1 cpb. La titulación se comprobó fácilmente utilizando una cámara de carga de perlas de 4 ranuras en una placa PTP de 14 x 43.

### Etapa 9

#### *Dilución y almacenamiento de la biblioteca de ADNg monocatenario*

Se eluyó la biblioteca de ADNg monocatenario y se cuantificó en tampón EB. Para evitar la degradación, la biblioteca de ADNg monocatenario se almacenó congelada a -20°C en presencia de EDTA. Tras la cuantificación, se añadió un volumen igual de TE 10 mM al stock de la biblioteca. Todas las diluciones posteriores se realizaron con TE. El rendimiento fue el siguiente:

Volumen final restante de biblioteca de ADNmc tras el análisis PSQ = 25  $\mu$ l.

Volumen final restante de biblioteca de ADNmc tras el análisis LabChip = 47  $\mu$ l.

Para la dilución inicial de la solución madre, se diluyó la biblioteca de ADNg monocatenario a 100 millones de moléculas/ $\mu$ l en tampón de elución de grado para biblioteca 1X. Se prepararon alícuotas de la biblioteca de ADNg monocatenario para la utilización común. Para ello, se diluyeron 200.000 moléculas/ $\mu$ l en tampón de elución de grado para biblioteca 1X y se prepararon alícuotas de 20  $\mu$ l. Las alícuotas de la biblioteca de una única utilización se almacenaron a -20°C.

### Etapa 10

#### *Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión*

En el caso de que resultase preferente un número incrementado de cpb, se llevaba a cabo una PCR en emulsión de perlas tal como se describe en la solicitud de patente US No. de serie 06/476.504, presentada el 6 de junio de 2003.

#### *Preparación de reactivo*

La solución de parada (EDTA 50 mM) incluía 100  $\mu$ l de EDTA 0,5 M con 900  $\mu$ l de nH<sub>2</sub>O, obteniendo 1,0 ml de solución EDTA 50 mM. Para obtener dNTPs 10 mM, se mezclaron 10  $\mu$ l de dCTP (100 mM), 10  $\mu$ l de dATP (100 mM), 10  $\mu$ l de dGTP (100 mM) y 10  $\mu$ l de dTTP (100 mM) con 60  $\mu$ l de agua de grado para biología molecular. La totalidad de las cuatro soluciones madre de nucleótidos 100 mM se descongelaron sobre hielo. A continuación, se agruparon 10  $\mu$ l de cada nucleótido y 60  $\mu$ l de nH<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 100  $\mu$ l y se mezclaron uniformemente. Seguidamente, se dispensaron alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Las soluciones madre pudieron almacenarse a -20°C durante un año.

El tamaño de hibridación 10X incluía Tris 200 mM (pH 7,5) y acetato de magnesio 50 mM. Para esta solución se añadieron 24,23 g de Tris a 800 ml de nH<sub>2</sub>O y la mezcla se ajustó a pH 7,5. A esta solución, se añadieron 10,72 g de acetato de magnesio y se disolvieron por completo. La solución se llevó a un volumen final de 1.000 ml y pudo almacenarse a 4°C durante 1 mes. La solución de TE 10X incluía Tris·HCl 100 mM (pH 7,5) y EDTA 50 mM. Se agruparon estos reactivos y se mezclaron uniformemente. La solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante 6 meses.

### Ejemplo 2

#### *Diseño de cebadores*

Tal como se ha comentado anteriormente, los adaptadores universales se diseñan para incluir: 1) un conjunto de regiones de cebado de PCR únicas que típicamente presentan una longitud de 20 pb (situadas contiguamente a (2)); 2) un conjunto de regiones de cebador de PCR únicas que típicamente presenta una longitud de 20 pb; y 3) opcionalmente seguido de una secuencia clave discriminadora única que consiste de por lo menos uno de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (es decir, A, C, G y T). La probabilidad de hibridación cruzada entre cebadores y regiones no deseadas del genoma de interés se incrementa a medida que se incrementa el tamaño del tramo de genoma y se reduce la longitud de correspondencia perfecta con el cebador. Sin embargo, esta potencial interacción con una región de hibridación cruzada (CHR) no se espera que provoque problemas, por los motivos que se indican posteriormente.

En una realización preferente, la biblioteca de ADN monocatenario se utiliza para la amplificación por PCR y la posterior secuenciación. La metodología de secuenciación requiere la digestión aleatoria de un genoma dado formando fragmentos de 150 a 500 pares de bases, después de lo cual se ligaron dos cebadores bipartitos únicos (compuestos de una región para PCR y una de secuenciación) en los extremos 5' y 3' de los fragmentos (figura 25). Al contrario que las amplificaciones de PCR típicas, en las que se selecciona una sección existente del genoma como sitio de cebado basado en la temperatura de fusión ( $T_m$ ), el carácter único de la secuencia de cebado en el genoma y la proximidad a la región particular o al gen de interés, el procedimiento dado a conocer utiliza sitios de cebado sintéticos que exigen el diseño cuidadoso *de novo* del cebador.

#### Selección de tetrámero

Pueden encontrarse estrategias para el diseño *de novo* de cebadores en la literatura publicada de trabajos realizados sobre etiquetas moleculares para experimentos de hibridación (ver Hensel M. y D.W. Holden, Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi, Microbiology 142(parte 5):1049-58, 1996; Shoemaker D.D. *et al.*, Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy, Nat. Genet. 14(4):450-6, 1996) y cebadores de hibridación PCR/LDR (reacción en cadena de la polimerasa/reacción de detección de ligación) (ver Gerry N.P. *et al.*, Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations, Journal of Molecular Biology 292:251-262, 1999; Witowski N.E. *et al.*, Microarray-based detection of select cardiovascular disease markers, BioTechniques 29(5): 936-944, 2000).

El trabajo sobre PCR/LDR resultó particularmente relevante y se centraba en el diseño de oligonucleótidos "zipcode", cebadores de 24 bases que comprendían seis tetrámeros diseñados específicamente con una  $T_m$  final similar (ver Gerry N.P. *et al.*, Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations, Journal of Molecular Biology 292:251-262, 1999; patente US nº 6.506.594). Se seleccionaron componentes tetraméricos basándose en los criterios siguientes: cada tetrámero difería de los demás en por lo menos dos bases, los tetrámeros que inducían autoapareamiento o formación de horquillas fueron excluidos, y los tetrámeros palindrómicos (AGCT) o repetitivos (TATA) se omitieron también. Treinta y seis de las 256 ( $4^4$ ) posibles permutaciones cumplían los requisitos necesarios y se sometieron a los cortes adicionales necesarios para un diseño aceptable de cebador de PCR (Tabla 1).

TABLA 1

	TT	TC	TG	TA	CT	CC	CG	CA	GT	GC	GG	GA	AT	AC	AG	AA
TT	<b>TTTT</b>	TTTC	TTTG	TTTA	TTCT	TTCC	TTGC	TTCA	TTGT	TTGC	TTGG	TTGA	TTAT	TTAC	TTAG	TTAA
TC	TCCT	<b>TTTC</b>	TCGT	TCCTA	TCCT	TCOC	TCOG	TCOA	TCGT	TCGC	TCGG	TCGA	TCAT	TCAC	TCAG	TCAA
TG	TGCT	TGTC	<b>TTTG</b>	TGTA	TGCT	TGOC	TGOG	TGOA	TGGT	TGGC	TGGG	TGGA	TGAT	TGAC	TGAG	TGAA
TA	TATT	TATC	TATG	<b>TATA</b>	TACT	TACC	TAOG	TACA	TAGT	TAGC	TAGG	TAGA	TAAT	TAAC	TAAG	TAAA
CT	CTTT	CTTC	CTTG	CTTA	<b>CTCT</b>	CTCC	CTGC	CTCA	CTGT	CTGC	CTGG	CTGA	CTAT	CTAC	CTAG	CTAA
CC	CCCT	CCTC	CCTG	CCTA	CCCT	<b>CCOC</b>	CCOG	CCOA	CCGT	CCGC	CCGG	CCGA	CCAT	CCAC	CCAG	CCAA
CG	CGCT	CGTC	CGTG	CGTA	CGCT	CGCC	<b>CGCG</b>	CGCA	CGGT	CGGC	CGGG	CGGA	CGAT	CGAC	CGAG	CGAA
CA	CATT	CATC	CATG	CATA	CACT	CACC	CACG	<b>CACA</b>	CAGT	CAGC	CAGG	CAGA	CAAT	CAAC	CAG	CAAA
GT	GTTT	GTTTC	GTTTG	GTTTA	GTTCT	GTTCC	GTTGC	GTTCA	<b>GTTGT</b>	GTTGC	GTTGG	GTTGA	GTTAT	GTTAC	GTTAG	GTTAA
GC	GCTT	GCTC	GCTG	GCTA	GCTCT	GCTCC	GCTGC	GCTCA	GCTGT	<b>GCTGC</b>	GCTGG	GCTGA	GCTAT	GCTAC	GCTAG	GCTAA
GG	GGTT	GGTC	GGTG	GGTA	GGCT	GGCC	GGGC	GGCA	GGGT	GGGC	<b>GGGG</b>	GGGA	GGAT	GGAC	GGAG	GGAA
GA	GATT	GATC	GATG	GATA	GACT	GACC	GACG	GACA	GAGT	GAGC	GAGG	<b>GAGA</b>	GAAT	GAAC	GAG	GAAA
AT	ATTT	ATTC	ATTG	ATTA	ATCT	ATCC	ATGC	ATCA	ATGT	ATGC	ATGG	ATGA	ATAT	ATAC	ATAG	ATAA
AC	ACTT	ACTC	ACTG	ACTA	ACTCT	ACTCC	ACTGC	ACTCA	ACTGT	ACTGC	ACTGG	ACTGA	ACTAT	<b>ACTAC</b>	ACTAG	ACTAA
AG	AGTT	AGTC	AGTG	AGTA	AGCT	AGCC	AGGC	AGCA	AGGT	AGGC	AGGG	AGGA	AGAT	AGAC	<b>AGAG</b>	AGAA
AA	AATT	AATC	AATG	AATA	AACT	AACC	AACG	AACA	AAGT	AAGC	AAGG	AAGA	AAAT	AAAC	AAAG	AAAA

La tabla muestra una matriz que demuestra la selección de componente cebador tetramérico basada en criterios descritos de manera general por Gerry *et al.*, J. Mol. Bio. 292:251-262, 1999. Se exige que cada tetrámero difiera del resto en por lo menos dos bases. Los tetrámeros no pueden ser palindrómicos ni complementarios a ningún otro tetrámero. Se seleccionaron treinta y seis tetrámeros (en negrita, subrayados); las secuencias en itálica indican los tetrámeros palindrómicos que fueron excluidos.

#### Diseño de cebadores

Se diseñaron los cebadores de PCR para cumplir las especificaciones comunes al diseño general de cebadores (ver Rubin E. Y A.A. Levy, A mathematical model and a computerized simulation of PCR using complex templates, Nucleic Acids Res. 24(18):3538-45, 1996; Buck G.A. *et al.*, Design strategies and performance of custom DNA sequencing primers. Biotechniques 27(3):528-36, 1999) y la selección real fue llevada a cabo por un programa informático, MMP. Se limitó la longitud de los cebadores a 20 bases (5 tetrámeros) para la síntesis eficiente del cebador



## ES 2 330 339 T3

bipartito total de PCR/secuenciación. Cada cebador contenía una abrazadera GC, de dos bases, en el extremo 5' y una única abrazadera GC en el extremo 3' (Tabla 2) y todos los cebadores compartían una T<sub>m</sub> similar ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (figura 27). No se permitió la formación de horquillas dentro del cebador ( $\Delta G$  de la horquilla interna  $> -1,9$  kcal/mol). También se controló la dimerización; se permitió un dímero de 3 bases como máximo aceptable, pero podía encontrarse en las seis bases 3' finales y la  $\Delta G$  máxima permisible para un dímero 3' era  $-2,0$  kcal/mol. Además, se aplicó una penalización a los cebadores en los que los extremos 3' eran excesivamente similares a otros en el grupo, evitando de esta manera la hibridación cruzada entre un cebador y el complemento inverso de otro.

TABLA 2

	Pos. 1	Pos. 2	Pos. 3	Pos. 4	Pos. 5
1	CCAT	TGAT	TGAT	TGAT	ATAC
2	CCTA	CTCA	CTCA	CTCA	AAAG
3	CGAA	TACA	TACA	TACA	TTAG
4	CGTT	AGCC	AGCC	AGCC	AATC
5	GCAA	GACC	GACC	GACC	TGTC
6	GCTT	TCCC	TCCC	TCCC	AGTG
7	GGAC	ATCG	ATCG	ATCG	CTTG
8	GGTA	CACG	CACG	CACG	GATG
9		TGCG	TGCG	TGCG	TCTG
10		ACCT	ACCT	ACCT	
11		GTCT	GTCT	GTCT	
12		AGGA	AGGA	AGGA	
13		TTGA	TTGA	TTGA	
14		CAGC	CAGC	CAGC	
15		GTGC	GTGC	GTGC	
16		ACGG	ACGG	ACGG	
17		CTGT	CTGT	CTGT	
18		GAGT	GAGT	GAGT	
19		TCGT	TCGT	TCGT	

La Tabla 2 muestra las posibles permutaciones de las 36 tétradas seleccionadas, que proporcionan dos abrazaderas G/C 5' y una sola 3'. Las posiciones internas están compuestas de las tétradas restantes. Esto resulta en  $8 \times 19 \times 19 \times 19 \times 9$  permutaciones, o 493.848 posibles combinaciones. La figura 27 muestra la selección de primer paso basada en T<sub>m</sub> de los cebadores aceptables, reduciendo el campo de 493.848 cebadores a 56.246 candidatos con una T<sub>m</sub> de entre  $64^{\circ}\text{C}$  y  $66^{\circ}\text{C}$ .

TABLA 3

La probabilidad de correspondencia perfecta de la secuencia de un cebador se incrementa a medida que se reducen los requisitos de longitud de correspondencia y se incrementa el tamaño del tramo de genoma de interés				
Longitud de correspondencia	Probabilidad de correspondencia perfecta ( $1/(4^{\text{longitud}})$ )	% de probabilidad de correspondencia en ~35K bases del adeno-virus	% de probabilidad de correspondencia en la base de datos bacteriana NOBI ~488 M bases	% de probabilidad de correspondencia en ~3B bases humanas
20	$9,1 \times 10^{-13}$	0,00%	0,04%	0,27%
19	$7,3 \times 10^{-12}$	0,00%	0,65%	4,32%
18	$4,4 \times 10^{-11}$	0,00%	5,76%	34,37%
17	$23 \times 10^{-10}$	0,00%	35,69%	99,17%
16	$1,2 \times 10^{-9}$	0,02%	97,52%	>100%
15	$5,6 \times 10^{-9}$	0,12%	>100%	>100%
14	$26 \times 10^{-8}$	0,64%	>100%	>100%
13	$1,2 \times 10^{-7}$	3,29%	>100%	>100%
12	$5,4 \times 10^{-7}$	15,68%	>100%	>100%
11	$24 \times 10^{-6}$	58,16%	>100%	>100%
10	$1,0 \times 10^{-5}$	99,35%	>100%	>100%
9	$4,5 \times 10^{-5}$	99,77%	>100%	>100%

## ES 2 330 339 T3

8	$20 \times 10^{-4}$	>100%	>100%	>100%
7	$8,5 \times 10^{-4}$	>100%	>100%	>100%
6	$3,7 \times 10^{-3}$	>100%	>100%	>100%
5	$1,6 \times 10^{-2}$	>100%	>100%	>100%
4	$6,4 \times 10^{-2}$	>100%	>100%	>100%
3	$2,5 \times 10^{-1}$	>100%	>100%	>100%
2	$7,1 \times 10^{-1}$	>100%	>100%	>100%
1	1,0	>100%	>100%	>100%

La posibilidad de que se encuentren regiones complementarias dentro del genoma de interés no era una cuestión importante en el proceso de diseño de un cebador, a pesar de la tolerancia que se informa que presenta la PCR frente a las faltas de correspondencia en poblaciones complejas de muestra (ver, por ejemplo, Rubin E y A.A. Levy, A mathematical model and a computerized simulation of PCR using complex templates, Nucleic Acids Res. 24(18):3538-45, 1996). Aunque la probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta con un cebador de 20 bases es extremadamente baja (4/20) (Tabla 3), la probabilidad de encontrar correspondencias menos no consecutivas se incrementa significativamente con el tamaño del tramo de genoma de interés. Como resultado, la probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta de por lo menos 10 de las 20 bases es 99,35% para un genoma de adenovirus. La probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta de 16 bases es 97% para las secuencias en la base de datos NCBI (aproximadamente 100 veces mayor que el genoma del adenovirus). La probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta de 17 bases con un cebador de 20 bases es 99% para las secuencias en el genoma humano (3.000 millones de bases).

La elevada probabilidad de hibridación cruzada de un cebador con regiones del genoma es menos problemática de lo esperado debido a la digestión aleatoria del ADN utilizada para producir los fragmentos molde. De esta manera, los efectos de una región de hibridación cruzada (CHR) son bastante benignos. Resulta improbable que una CHR pueda competir con éxito con la correspondencia perfecta entre los cebadores de PCR en solución y el molde. Además, cualquier cebador que incluya no correspondencias en su extremo 3' se encontraría en desventaja competitiva significativa. Aunque una CHR pudiese ganar en competencia con el cebador de PCR pretendido, produciría un producto de PCR truncado, sin sitio cadena abajo para el cebador de secuenciación. Si el producto truncado pudiese transportarse a la perla de captura e inmovilizarse, podrían resultar dos situaciones. Si la CHR ganase en competencia con el cebador en fase solución, el producto inmovilizado no presentaría un sitio de unión del cebador de secuenciación y resultaría en un pocillo vacío en la placa PicoTiter (PTP). Si la CHR ganase en competencia con el cebador unido a una perla, el cebador de secuenciación seguiría encontrándose presente, y el único efecto sería una inserción más corta. Ninguno de los dos resultados comprometería indebidamente la calidad de la secuenciación. Dada la gran cantidad de material genómico utilizado en el procedimiento de preparación de muestra (en la actualidad 25 µg, que contienen  $5,29 \times 10^{16}$  copias del genoma del adenovirus de 35 Kb), podría utilizarse el sobremuestreo para proporcionar fragmentos sin la CHR completa, permitiendo la amplificación estándar por PCR de la región en cuestión.

### Ejemplo 3

#### *Preparación de muestras mediante nebulización*

#### *Preparación de ADN mediante nebulización*

El propósito de la etapa de nebulización es fragmentar un tramo grande de ADN, tal como un genoma completo o una porción grande de un genoma, en especies moleculares más pequeñas que puedan someterse a secuenciación del ADN. Esta población de especies de ADN de menor tamaño generadas a partir de un único ADN molde se denomina biblioteca. La nebulización corta el ADN molde bicatenario en fragmentos de longitud comprendida entre 50 y 900 pares de bases. La biblioteca cortada contiene extremos monocatenarios que se reparan mediante una combinación de ADN polimerasa de T4, ADN polimerasa I de *E. coli* (fragmento Klenow) y polinucleótido quinasa de T4. Las ADN polimerasas tanto de T4 como Klenow se utilizan para "rellenar" los extremos hundidos 3' (protuberantes 5') de ADN mediante la actividad 5' a 3' polimerasa de las mismas. La actividad exonucleasa 3' a 5' monocatenaria de las polimerasas de T4 y Klenow eliminan los extremos protuberantes 3' y la actividad quinasa de la polinucleótido quinasa de T4 añaden fosfatos a los extremos 5' hidroxilo.

La muestra se preparó de la manera siguiente:

- Se obtuvieron 15 µg de ADNg (ADN genómico) y se ajustaron a un volumen final de 100 µl en TE 10 mM (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,6; ver la lista de reactivos al final de la sección). El ADN se analizó para la presencia de contaminantes midiendo la proporción de D.O<sub>260/280</sub>, que era de 1,8 o mayor. Se esperaba que la concentración final de ADNg fuese de aproximadamente 300 µg/ml.

## ES 2 330 339 T3

2. Se añadieron 1.600  $\mu$ l de tampón de nebulización helado (ver el final de la sección) al ADNg.
3. La mezcla de reacción se introdujo en un nebulizador helado (CIS-US, Bedford, MA).
- 5 4. Se colocó el tapón de un tubo Falcon con tapa de presión sobre la tapa superior del nebulizador (figura 28A).
- 10 5. La tapa se fijó con un conjunto de abrazadera limpio para nebulizador, que consiste de la cubierta ajustada (para la tapa del tubo Falcon) y dos anillos en O de goma (figura 28B).
6. El fondo del nebulizador se conectó a una fuente de nitrógeno y el dispositivo completo se envolvió en parafilm (figuras 28C y 28D).
- 15 7. Mientras se mantenía en posición vertical el nebulizador (tal como se muestra en la figura 28D), se aplicaron durante 5 minutos 50 psi (libras por pulgada cuadrada) de nitrógeno. Se golpeó ligeramente el fondo del nebulizador sobre una superficie dura cada pocos segundos para forzar la caída del líquido condensado hasta el fondo.
- 20 8. Se cerró la entrada de nitrógeno tras 5 minutos. Tras normalizarse la presión (30 segundos), se retiró del nebulizador la fuente de nitrógeno.
9. Se retiró el parafilm y se desenroscó la tapa del nebulizador. Se extrajo la muestra y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
- 25 10. Se reinstaló la tapa del nebulizador y el nebulizador se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos.
11. Se recogió el resto de la muestra en el nebulizador. La recuperación total fue de aproximadamente 700  $\mu$ l.
- 30 12. La muestra recuperada se purificó utilizando una columna QIAquick (Qiagen Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a que el volumen era grande resultó necesario cargar la columna varias veces. La muestra se eluyó con 30  $\mu$ l de tampón EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5, suministrado en el kit de Qiagen) que se precalentó a 55°C.
- 35 13. La muestra se cuantificó mediante espectroscopía de UV (2  $\mu$ l en 198  $\mu$ l de agua para una dilución 1:100).

### *Pulido enzimático*

40 La nebulización de ADNs de molde rinde muchos fragmentos de ADN con extremos deshilachados. Estos extremos se convierten en romos y se preparan para la ligación con fragmentos adaptadores mediante la utilización de tres enzimas: la ADN polimerasa de T4, la ADN polimerasa de *E. coli* (fragmento Klenow) y la polinucleótido quinasa de T4.

45 La muestra se preparó de la manera siguiente:

1. En un tubo de 0,2 ml se añadieron en orden los reactivos siguientes:

50	28 $\mu$ l	fragmentos nebulizados purificados de ADNg
	5 $\mu$ l	agua
	5 $\mu$ l	tampón 10X de ADN polimerasa de T4
	5 $\mu$ l	BSA (1 mg/ml)
55	2 $\mu$ l	dNTPs (10 mM)
	5 $\mu$ l	ADN polimerasa de T4 (3 unidades/ $\mu$ l)
60	50 $\mu$ l	volumen final

2. La solución de la etapa 1 se mezcló bien y se incubó a 25°C durante 10 minutos en un termociclador MJ (puede utilizarse cualquier incubador adecuado).
3. Se añadieron 1,25  $\mu$ l de ADN polimerasa de *E. coli* (fragmento Klenow) (5 unidades/ml).
- 65 4. La reacción se mezcló bien y se incubó en el termociclador MJ durante 10 minutos a 25°C y durante 2 horas adicionales a 16°C.

## ES 2 330 339 T3

5. El ADN tratado se purificó utilizando una columna QiaQuick y se eluyó con 30  $\mu$ l de tampón EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5) que se había precalentado a 55°C.

6. Se agruparon en un tubo de 0,2 ml los reactivos siguientes:

30 $\mu$ l	fragmentos de ADNg nebulizado, pulidos y purificados con Qiagen
5 $\mu$ l	agua
5 $\mu$ l	tampón 10X PNK de T4
5 $\mu$ l	ATP (10 mM)
5 $\mu$ l	PNK de T4 (10 unidades/ml)
50 $\mu$ l	volumen final

7. La solución se mezcló y se introdujo en un termociclador MJ utilizando el programa PNK de T4 para la incubación a 37°C durante 30 minutos, 65°C durante 20 minutos, seguido del almacenamiento a 14°C.

8. La muestra se purificó utilizando una columna QiaQuick y se eluyó en 30  $\mu$ l de tampón EB que había sido precalentado a 55°C.

9. Se retuvo una alícuota de 2  $\mu$ l de la reacción de pulido final para el análisis con un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip (ver posteriormente).

### *Ligación de adaptadores*

El procedimiento para la ligación de los adaptadores se llevó a cabo de la manera siguiente:

1. En un tubo de 0,2 ml, se añadieron en orden los reactivos siguientes:

20,6 $\mu$ l	agua de grado para biología molecular
28 $\mu$ l	biblioteca de ADNg pulida y digerida
60 $\mu$ l	tampón 2X de reacción de ligasa rápida
1,8 $\mu$ l	conjunto de adaptadores universales MMP (200 pmoles/ $\mu$ l)
9,6 $\mu$ l	Ligasa rápida
120 $\mu$ l	total

La reacción anterior se diseñó para 5  $\mu$ g y se escaló dependiendo de la cantidad de ADN utilizada.

2. Los reactivos se mezclaron bien y se incubaron a 25°C durante 20 minutos. El tubo se mantuvo sobre hielo hasta que estuvo preparado el gel para la electroforesis en gel de agarosa.

### *Electroforesis en gel y extracción de la biblioteca de ADNg adaptado*

La nebulización del ADN genómico rinde una población de biblioteca de longitudes comprendidas entre 50 y 900 pb. La adición del conjunto de adaptadores universales de 88 pb desplazará la población a un tamaño mayor y resultará en un perfil de migración con un intervalo de tamaños más grande (aproximadamente 130 a 980 pb). Los adaptadores dímeros migrarán a 88 pb y los adaptadores no ligados migrarán a 44 pb. Por lo tanto, las bibliotecas de ADN genómico aisladas en los intervalos de tamaño  $\geq 250$  pb (el intervalo de tamaños de la biblioteca puede modificarse dependiendo de la aplicación). El intervalo de tamaños de la biblioteca tras la ligación de adaptadores es de entre 130 y 980 pb. Debe indicarse que el procedimiento puede adaptarse para el aislamiento de cualquier tamaño de banda, tal como, por ejemplo, 130 a 200 pb, 200 a 400 pb, 250 a 500 pb, 300 a 600 pb, 500 a 700 pb y similar, mediante el corte de diferentes regiones del gel. El procedimiento descrito posteriormente se utilizó para aislar fragmentos de entre 250 y 500 pb.

Se preparó un gel de agarosa de 150 ml, que incluía agarosa al 2%, TBE 1X y 4,5  $\mu$ l de bromuro de etidio (solución madre de 10 mg/ml). El ADN ligado se mezcló con pigmento Ready Load 10X y se cargó en el gel. Además, se cargaron 10  $\mu$ l de una escalera de 100 pb (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) en dos carriles alejados de la reacción de ligación que flanqueaba la muestra. El gel se sometió a electroforesis a 100 V durante 3 horas. Tras completar el corrido del gel, éste se

extrajo de la caja, se transfirió a un GelDoc y se cubrió con película de plástico. Las bandas de ADN se visualizaron utilizando la luz UV preparativa. Se utilizó un bisturí desechable estéril para recortar una población de biblioteca del gel de agarosa con tamaños de fragmento de 250 a 500 pb. Este procedimiento se realizó con la máxima rapidez para evitar la formación de muescas en el ADN. Las rodajas de gel se introdujeron en un tubo Falcon de 15 ml.

5 La biblioteca de ADN<sub>g</sub> incluida en agarosa se aisló utilizando un kit de extracción de gel MinElute de Qiagen. Se analizaron alícuotas de cada biblioteca de ADN<sub>g</sub> aislado utilizando un BioAnalyzer DNA 1000 LabChip para evaluar la distribución exacta de la población de biblioteca de ADN<sub>g</sub>.

10 *Desplazamiento y extensión de cadena de la biblioteca de ADN<sub>g</sub> y aislamiento de la biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario utilizando perlas con estreptavidina*

Se llevó a cabo el desplazamiento y extensión de cadena de la biblioteca de ADN<sub>g</sub> bicatenario con muesca tal como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que se incubaron las muestras tratadas con Bst en el ciclador térmico a 65°C durante 30 minutos y se dejaron sobre hielo hasta la utilización. Las perlas con estreptavidina se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 1, excepto en que el lavado final se llevó a cabo utilizando dos lavados con 200 µl de tampón de unión 1X y dos lavados con 200 µl de nH<sub>2</sub>O. La biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario se aisló utilizando perlas con estreptavidina de la manera siguiente. Se eliminó el agua de las perlas lavadas y se añadieron 250 µl de solución de fusión (ver posteriormente). La suspensión de perlas se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en un tubo rotatorio. En un tubo separado, se mezclaron 1.250 µl de PB (del kit de purificación QiaQuick) y 9 µl de ácido acético al 20%. Las perlas en 250 µl de solución de fusión se pelletizaron utilizando un concentrador MPC de Dynal y el sobrenadante se separó cuidadosamente y se transfirió a la solución recién preparada de PB/ácido acético. Se purificó el ADN de los 1.500 µl de solución utilizando una sola columna de centrifugación de purificación MinElute. Lo anterior se llevó a cabo cargando la muestra a través de la misma columna dos veces en una cantidad de 750 µl por carga. Se eluyó la biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario con 15 µl de tampón EB que se había precalentado a 55°C.

30 *Cuantificación y almacenamiento del ADN<sub>g</sub> monocatenario*

Se cuantificó el ADN<sub>g</sub> monocatenario utilizando el RNA Pico 6000 LabChip tal como se describe en el Ejemplo 1. En algunos casos, se cuantificó la biblioteca monocatenaria mediante un segundo ensayo para garantizar que la cuantificación inicial con Agilent 2100 se había llevado a cabo con exactitud. Con este fin, se llevó a cabo una cuantificación RiboGreen tal como se ha descrito (cuantificación de ADN<sub>mc</sub> mediante fluorometría) para confirmar la cuantificación con Agilent 2100. Si las dos estimaciones diferían en más de 3 veces, se repitió cada análisis. En el caso de que la cuantificación mostrase una diferencia superior a más de 3 veces entre los dos procedimientos, se utilizó un intervalo más amplio de molde a perla.

Se llevó a cabo la dilución y el almacenamiento de la biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario tal como se describe en el Ejemplo 1. El rendimiento fue el siguiente:

Volumen final restante de biblioteca de ADN<sub>mc</sub> tras el análisis LabChip = 12 µl

Volumen final restante de biblioteca de ADN<sub>mc</sub> tras el análisis RiboGreen = 9 µl

Volumen final de biblioteca de ADN<sub>mc</sub> tras la adición de TE = 18 µl

Se añadió un volumen igual de TE a la solución madre de biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario. Biblioteca de ADN<sub>g</sub> monocatenario a 1x10<sup>8</sup> moléculas/µl en tampón TE. La solución madre se diluyó (1/500) hasta 200.000 moléculas/µl en TE y se prepararon alícuotas de 20 µl.

55 *Distribución de tamaños de fragmento de la biblioteca tras la nebulización*

Los resultados típicos del análisis con Agilent 2100 DNA 1000 LabChip de 1 µl del material tras la nebulización y el pulido se muestran en la figura 29a. Se esperaba que la distribución de tamaños de la mayoría del producto cayese entre aproximadamente 50 y 900 pares de bases. Se esperaba que el tamaño medio (parte superior del pico) fuese de aproximadamente 450 pb. Los resultados típicos de la purificación en gel de fragmentos de biblioteca ligados a adaptador se muestran en la figura 29B.

*Reactivos*

65 A menos que se indique lo contrario, los reactivos indicados en los Ejemplos representan reactivos estándares que se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, Klenow, ADN polimerasa de T4, tampón de ADN polimerasa de T4, PNK de T4, tampón de PNK de T4, ADN ligasa Quick de T4, tampón de ligación Quick, ADN polimerasa Bst (fragmento grande) y tampón de reacción ThermoPol se encuentran disponibles de New England Biolabs (Beverly,

## ES 2 330 339 T3

MA). La mezcla de dNTPs se encuentra disponible de Pierce (Rockford, IL). La agarosa, TBE ultrapuro, tampón de carga de gel BlueJuice y escalera de ADN de 100 pb Read-Load pueden obtenerse de Invitrogen (Carlsbad, CA). El bromuro de etidio y el 2-propanol pueden obtenerse de Fisher (Hampton, NH). La escalera de ARN puede obtenerse de Ambion (Austin, TX). Otros reactivos comúnmente conocidos y/o se indican a continuación:

### *Solución de fusión*

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
NaCl (5 M)	200 µl	Invitrogen	24740-011
NaOH (10 N)	125 µl	Fisher	SS255-1
Agua de grado para biología molecular	9,675 ml	Eppendorf	0032-006-205

La solución de fusión incluía NaCl 100 mM y NaOH 125 mM. Los reactivos indicados se agruparon y se mezclaron uniformemente. La solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante seis meses.

### *Tampón de unión y lavado (B&W) (2X y 1X)*

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Tris-HCl ultrapuro (pH 7,5, 1 M)	250 µl	Invitrogen	15567-027
EDTA (0,5 M)	50 µl	Invitrogen	15575-020
NaCl (5 M)	10 ml	Invitrogen	24740-011
Agua de grado para biología molecular	14,7 ml	Eppendorf	0032-006-205

El tampón B&W 2X incluía las concentraciones finales de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM y NaCl 2 M. Los reactivos indicados se agruparon y se mezclaron uniformemente. La solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante 6 meses. El tampón B&W 1X se preparó mezclando tampón B&W 2X con H<sub>2</sub>O picopura, 1:1. Las concentraciones finales eran la mitad de las indicadas anteriormente, es decir Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), EDTA 0,5 mM y NaCl 1 M.

Entre otros tampones se incluían los siguientes: tampón 1X de ADN polimerasa de T4, NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotretol 1 mM (pH 7,9 a 25°C). TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM.

### *Preparación de reactivos especiales*

#### *TE (10 mM)*

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
TE (1 M)	1 ml	Fisher	BP1338-1
Agua de grado para biología molecular	99 ml	Eppendorf	0032-006-205

Los reactivos se mezclaron y la solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante seis meses.

#### *Tampón de nebulización*

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Glicerol	53,1 ml	Sigma	G5516
Agua de grado para biología molecular	42,1 ml	Eppendorf	0032-006-205
Tris-HCl ultrapura (pH 7,5, 1 M)	3,7 ml	Invitrogen	15567-027
EDTA (0,5 M)	1,1 ml	Sigma	M-10228

Se añadieron todos los reactivos (el glicerol se añadió el último) a un vaso de filtración Stericup y se mezclaron bien. La solución se etiquetó y pudo almacenarse a temperatura ambiente durante seis meses.

## ES 2 330 339 T3

### ATP (10 mM)

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
ATP (10 mM)	10 µl	Roche	1140965
Agua de grado para biología molecular	90 µl	Eppendorf	0032-006-205

Se mezclaron los reactivos y la solución pudo almacenarse a -20°C durante seis meses.

### BSA (1 mg/ml)

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
BSA (10 mg/ml)	10 µl	NEB	Kit M0203
Agua de grado para biología molecular	90 µl	Eppendorf	0032-006-205

Los reactivos se mezclaron y la solución pudo almacenarse a 4°C durante seis meses.

### Tampón de hibridación de biblioteca, 10X

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Tris-HCl ultrapura (pH 7,5, 1 M)	200 ml	Invitrogen	15567-027
Acetato de magnesio, grado enzimático (1 M)	10,72 g	Fisher	BP-215-500
Agua de grado para biología molecular	~1 l	Eppendorf	0032-006-205

El tampón de hibridación 10X incluía Tris 200 mM (pH 7,5) y acetato de magnesio 50 mM. Para este tampón se añadieron 200 ml de Tris a 500 ml de H<sub>2</sub>O picopura. A continuación, se añadieron 10,72 g de acetato de magnesio a la solución y se disolvieron completamente. La solución se ajustó a un volumen final de 1.000 ml. La solución pudo almacenarse a 4°C durante seis meses. Para evitar el potencial de contaminación de las bibliotecas, el tampón se dividió en alícuotas para la utilización única o a corto plazo.

### Adaptadores

#### Adaptador "A" (400 µM)

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Adaptador A (cadena sentido; purificado por HPLC, enlaces fosforotioato, 44 pb, 1.000 pmol/µl)	10,0 µl	IDT	Adaptado al cliente
Adaptador A (antisentido, purificado por HPLC, enlaces fosforotioato, 40 pb, 1.000 pmoles/µl)	10,0 µl	IDT	Adaptado al cliente
Tampón de hibridación (10X)	2,5 µl	454 Corp.	Tabla anterior
Agua de grado para biología molecular	2,5 µl	Eppendorf	0032-006-205

Para dicha solución se mezclaron 10 µl de adaptador A 1.000 pmoles/µl (44 pb, cadena sentido) con 10 µl de adaptador A 1.000 pmoles/µl (40 pb, cadena antisentido), 2,5 µl de tampón de hibridación de biblioteca 10X, y 2,5 µl de agua (V<sub>f</sub>=25 µl). Los adaptadores se hibridaron utilizando el programa ANNEAL-A (ver apéndice, más abajo) en el termociclador de muestras preparativas. En los apéndices se proporcionan más detalles sobre el diseño del adaptador.

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Adaptador B (cadena sentido; purificado por HPLC, enlaces fosforotioato, 40 pb, 1.000 pmol/µl)	10 µl	IDT	Adaptado al cliente
Adaptador B (anti, purificado por HPLC, enlaces fosforotioato, 5' biotinilado, 44 pb, 1.000 pmoles/µl)	10 µl	IDT	Adaptado al cliente
Tampón de hibridación (10X)	2,5 µl	454 Corp.	Tabla anterior
Agua de grado para biología molecular	2,5 µl	Eppendorf	0032-006-205

## ES 2 330 339 T3

Para dicha solución se mezclaron 10  $\mu$ l de adaptador B 1.000 pmoles/ $\mu$ l (40 pb, cadena sentido) con 10  $\mu$ l de adaptador B 1.000 pmoles/ $\mu$ l (44 pb, cadena antisentido), 2,5  $\mu$ l de tampón de hibridación de biblioteca 10X y 2,5  $\mu$ l de agua ( $V_f=25$   $\mu$ l). Los adaptadores se hibridaron utilizando el programa ANNEAL-A (ver el apéndice) en el termociclador de muestras preparativas. Tras la hibridación, se agruparon los adaptadores "A" y "B" ( $V_f=50$   $\mu$ l). Los conjuntos de adaptadores pudieron almacenarse a -20°C hasta la utilización.

### Ácido acético al 20%

Ingrediente	Cantidad necesaria	Proveedor	Número de catálogo
Ácido acético glacial	2 ml	Fisher	A35-500
Agua de grado para biología molecular	8 ml	Eppendorf	0032-006-205

Para esta solución, se añadió ácido acético glacial al agua. La solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante seis meses.

### Programa de hibridación de adaptadores

Programa ANNEAL-A para la hibridación de cebadores:

1. Incubar a 95°C, 1 minuto,
2. Reducir la temperatura hasta 15°C a 0,1°C/s; y
3. Mantener la temperatura a 14°C

Programa POLISH de polimerasa de T4/Klenow para la reparación de extremos:

1. Incubar a 25°C, 10 minutos,
2. Incubar a 16°C, 2 horas; y
3. Mantener la temperatura a 4°C.

Programa PNK para la reparación de extremos:

1. Incubar a 37°C, 30 minutos,
2. Incubar a 65°C, 20 minutos; y
3. Mantener la temperatura a 14°C.

Programa BST para el desplazamiento y extensión de cadenas de ADN bicatenario con muescas:

1. Incubar a 65°C, 30 minutos; y
2. Mantener la temperatura a 14°C.

### Etapas 9

#### Dilución y almacenamiento de biblioteca de ADN monocatenario

Biblioteca de ADN monocatenario en tampón EB: volumen final restante = 25  $\mu$ l.

La dilución inicial de la solución madre se llevó a cabo de la manera siguiente. Utilizando los resultados de pirosecuenciación (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia), se diluyó la biblioteca de ADN monocatenario a moléculas 100M/ $\mu$ L en tampón de hibridación 1X (habitualmente a una dilución de 1:50).

Se prepararon alícuotas de la biblioteca de ADN monocatenario para la utilización común mediante la dilución de 200.000 moléculas/ $\mu$ l en tampón de hibridación 1X y la preparación de alícuotas de 30  $\mu$ l. Almacenamiento a -20°C. Las muestras se utilizaron en PCR en emulsión.



## ES 2 330 339 T3

### *Preparación de reactivos*

Solución de parada (EDTA 50 mM): se mezclaron 100  $\mu$ l de EDTA 0,5 M con 900  $\mu$ l de  $\text{nH}_2\text{O}$  para preparar 1,0 ml de solución 50 mM de EDTA.

La solución de dNTPs 10 mM incluía 10  $\mu$ l de dCTP (100 mM), 10  $\mu$ l de dATP (100 mM), 10  $\mu$ l de dGTP (100 mM) y 10  $\mu$ l de dTTP (100 mM), 60  $\mu$ l de agua de grado para biología molecular ( $\text{nH}_2\text{O}$ ). La totalidad de las cuatro soluciones madre de nucleótidos 100 mM se descongelaron sobre hielo. Se agruparon 10  $\mu$ l de cada nucleótido con 60  $\mu$ l de  $\text{nH}_2\text{O}$  hasta un volumen final de 100  $\mu$ l y se mezclaron uniformemente. Se dispensaron alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  durante no más de un año.

Tampón de hibridación, 10X: el tampón de hibridación 10X incluía Tris 200 mM (pH 7,5) y acetato de magnesio 50 mM. Para esta solución, se añadieron 24,23 g de Tris a 800 ml de  $\text{nH}_2\text{O}$  y se ajustó el pH a 7,5. A esta solución se añadieron 10,72 g de acetato de magnesio y disolvieron completamente. La solución se llevó a un volumen final de 1.000 ml. La solución pudo almacenarse a  $4^\circ\text{C}$  durante 1 mes.

TE 10X: la solución TE 10X incluía Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) y EDTA 50 mM. Estos reactivos se añadieron conjuntamente y se mezclaron uniformemente. La solución pudo almacenarse a temperatura ambiente durante 6 meses.

### *Ejemplo 4*

#### *PCR en emulsión de perlas*

Los procedimientos siguientes, incluyendo la captura del ADN molde, la amplificación del ADN y la recuperación de las perlas unidas al molde amplificado, pueden llevarse a cabo en un único tubo. El formato emulsión garantiza la separación física de las perlas en "microrreactores" de 100 a 200  $\mu\text{m}$  dentro de este único tubo, permitiendo de esta manera la amplificación clonal de los diversos moldes. La inmovilización del producto de amplificación se consigue mediante la extensión del molde a lo largo de los oligonucleótidos unidos a las perlas de captura de ADN. Típicamente el número de copia del molde inmovilizado se encuentra comprendido entre 10 y 30 millones de copias en cada perla. Las perlas de captura de ADN con múltiples copias fijadas de una única especie de ácido nucleico molde se encuentran listas para la distribución sobre placas PTP.

Los 300.000 pocillos de 75 picolitros grabados en la superficie de la placa PTP proporcionan un panel único para la secuenciación de moldes cortos de ADN masivamente en paralelo de manera eficiente y económica. Sin embargo, lo anterior requiere cantidades bastante grandes (millones de copias) de moldes clonales en cada pocillo de reacción. Los métodos descritos en la presente invención permiten al usuario amplificar clonalmente especies de molde genómico monocatenario mediante reacciones de PCR realizadas en tubos estándar o en placas de microtitulación. Pueden mezclarse copias individuales de la especie molde con perlas de captura, resuspenderse en solución de amplificación por PCR completa y emulsionarse en microrreactores (de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro), después de lo cual la amplificación por PCR genera una amplificación de 107 veces de la especie inicial de molde. Este procedimiento resulta mucho más simple y más eficiente en costes que los métodos anteriores.

#### *Unión del ácido nucleico molde a las perlas de captura*

El presente ejemplo describe la preparación de una población de perlas que preferentemente presenta un único ácido nucleico molde unido a las mismas. La amplificación clonal con éxito depende de la administración de un número controlado de especies de molde (0,5 a 1) en cada perla. La administración de un exceso de especies puede resultar en la amplificación por PCR de una población mixta de moldes, evitando la generación de datos de secuencia con significado, mientras que una deficiencia de especies resultará en menos pocillos que contengan molde para la secuenciación. Lo anterior puede reducir el grado de cobertura del genoma proporcionado por la etapa de secuenciación. En consecuencia, resulta preferible que la concentración de molde se determine con exactitud mediante cuantificación replicada y que se siga el protocolo de unión según se describe de manera general a continuación.

#### *Control de calidad del molde*

El éxito de la reacción de PCR en emulsión se relaciona con la calidad de las especies de molde. Con independencia del cuidado prestado a la etapa de amplificación, los moldes de calidad pobre impedirán la amplificación con éxito y la generación de datos de secuencia con significado. Para evitar la pérdida innecesaria de tiempo y dinero, resulta importante comprobar la calidad del material de molde antes de iniciar la etapa de PCR en emulsión del procedimiento. Preferentemente, la biblioteca debería pasar dos etapas de control de calidad antes de utilizarla en la PCR en emulsión. Debe determinarse la concentración de la misma y la distribución de productos que contiene. Idealmente, la biblioteca debe ser una población heterogénea de fragmentos con una cantidad reducida o visiblemente nula de adaptadores dímeros (por ejemplo  $\sim 90$  bases). Además, la amplificación con cebadores de PCR debería resultar en un rango de producto comprendido, por ejemplo, entre 300 y 500 pb. La ausencia de producto de amplificación podría indicar la ligación incorrecta de los adaptadores al molde, mientras que la presencia de una única banda de cualquier tamaño podría indicar la contaminación del molde.

## ES 2 330 339 T3

### Preparación de la solución de PCR

La consideración principal en esta etapa es la prevención de la contaminación de la mezcla de reacción de PCR con amplicones residuales. La contaminación de las reacciones de PCR con un amplicón residual es uno de los problemas críticos que puede provocar el fracaso de una secuenciación. Para reducir las posibilidades de contaminación, deben seguirse buenas prácticas de laboratorio y la preparación de la mezcla de reacción debe llevarse a cabo en una sala limpia bajo una campana de flujo laminar tratada con UV.

### Mezcla de reacción de PCR

Para los 200  $\mu$ l de mezcla de reacción de PCR (suficiente para amplificar 600.000 perlas), se agruparon los reactivos siguientes en un tubo de PCR de 0,2 ml:

TABLA 4

	Solución madre	Final	Microlitros
Tampón HIFI	10X	1X	20
Nucleótidos tratados	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	10%	0,1%	2
Tween 80	1%	0,01%	2
Ppasa	2 U	0,003 U	0,333333
Cebador MMP1a	100 $\mu$ M	0,625 $\mu$ M	1,25
Cebador MMP1b	10 $\mu$ M	0,078 $\mu$ M	1,56
Polimerasa Taq	5 U	0,2 U	8
Agua			136,6
Total			200

El tubo se agitó con vórtex uniformemente y se almacenó sobre hielo hasta la hibridación de las perlas con el molde.

### Perlas de captura de ADN

- Se transfirieron 600.000 perlas de captura de ADN del tubo de solución madre a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La cantidad exacta utilizada dependerá de la concentración de reactivo formalizado en las perlas.
- Las perlas se peletizaron en una minicentrífuga de laboratorio y se separó el sobrenadante.
- Se llevaron a cabo las etapas 4 a 11 en una sala limpia para PCR.
- Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de hibridación 1X.
- Las perlas de captura se peletizaron en la microcentrífuga. El tubo se hizo girar 180° y se centrifugó nuevamente.
- La totalidad, excepto aproximadamente 10  $\mu$ l del sobrenadante, se separaron del tubo que contenía las perlas. Las perlas no resultaron perturbadas.
- Se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X y esta mezcla se incubó durante 1 minuto. A continuación, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 5.
- Se extrajo la totalidad del material del tubo excepto aproximadamente 100  $\mu$ l.
- Las perlas y solución remanentes se transfirieron a un tubo para PCR.
- El tubo de 1,5 ml se lavó con 150  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X pipeteando varias veces. La solución se añadió al tubo para PCR que contenía las perlas.

## ES 2 330 339 T3

11. Las perlas se peletizaron tal como en la etapa 5 y se extrajo la totalidad excepto 10  $\mu$ l del sobrenadante, cuidando de no perturbar el pellet de perlas.
12. Se extrajo una alícuota de ADN molde monocatenario (ADNmmc) cuantificado. La concentración final era de 200.000 moléculas de ADNmmc/ $\mu$ l.
13. Se añadieron 3  $\mu$ l del ADNmmc diluido al tubo para PCR que contenía las perlas. El contenido era equivalente a 600.000 copias de ADNmmc.
14. El tubo se agitó con vórtex suavemente para mezclar el contenido.
15. Se hibridó el ADNmmc con las perlas de captura en un termociclador de PCR con el programa 80Anneal almacenado en la carpeta EPCR del termociclador MJ, aplicando el protocolo siguiente:
  - 5 minutos a 65°C,
  - reducción de 0,1°C/s hasta 60°C,
  - mantenimiento a 60°C durante 1 minuto,
  - reducción de 0,1°C/s hasta 50°C,
  - mantenimiento a 50°C durante 1 minuto,
  - reducción de 0,1°C/s hasta 40°C,
  - mantenimiento a 40°C durante 1 minuto,
  - reducción de 0,1°C/s hasta 20°C, y
  - mantenimiento a 10°C hasta encontrarse listo para la etapa siguiente.

En la mayoría de casos, las perlas se utilizaron para la amplificación inmediatamente después de la unión del molde. En el caso de que las perlas no se utilizasen inmediatamente, debían almacenarse en la solución para molde a 4°C hasta que se necesitasen. Tras el almacenamiento, las perlas se trataron de la manera siguiente:

16. Tal como en la etapa 6, las perlas se extrajeron del termociclador, se centrifugaron y se separó el tampón de hibridación sin perturbar las perlas.
17. Las perlas se almacenaron en un cubo de hielo hasta la emulsificación (Ejemplo 2).
18. Las perlas de captura incluían, de media, 0,5 a 1 copia de ADNmmc unida a cada perla y se encontraban listas para la emulsificación.

### Ejemplo 5

#### Emulsificación

A continuación se describe una solución para PCR adecuada para la utilización en la presente etapa. Para 200  $\mu$ l de mezcla de reacción de PCR (suficiente para amplificar perlas de 600K), se añadió a un tubo para PCR de 0,2 ml lo siguiente:

	Solución madre	Final	Microlitros
Tampón HIFI	10X	1X	20
Núcleos tratados	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	10%	0.1%	2
Tween 80	1%	0.01%	2
Ppasa	2 U	0.003 U	0,333333
Cebador MMP1a	100 $\mu$ M	0.625 $\mu$ M	1.25
Cebador MMP1b	10 $\mu$ M	0.078 $\mu$ M	1.56
Taq	5 U	0.2 U	8
Agua			136,6
Total			200

## ES 2 330 339 T3

El presente ejemplo describe cómo crear una emulsión de agua en aceite termoestable que contenga aproximadamente 3.000 microrreactores de PCR por microlitro. A continuación se describe generalmente un protocolo para preparar la emulsión.

1. Se añadieron 200  $\mu$ l de solución para PCR a las 600.000 perlas (ambos componentes del Ejemplo 1).
2. La solución se mezcló con una pipeta varias veces para resuspender las perlas.
3. La mezcla de perlas para PCR se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos para equilibrar las perlas con la solución para PCR.
4. Se añadieron 400  $\mu$ l de aceite de emulsión a un tubo de microcentrífuga de 2 ml irradiado con UV.
5. Se añadió una barra de agitación “libre de amplicones” de 1/4” al tubo con aceite de emulsión.  
Se preparó una barra de agitación libre de amplicones de la manera siguiente. Se utilizó una barra de agitación grande para sostener una barra de agitación de 1/4”, A continuación, la barra de agitación:
  - se lavó con solución descontaminante DNA-Off (por goteo o pulverización),
  - se enjuagó con agua picopura,
  - se secó con papel Kimwipe, y
  - se irradió con UV durante 5 minutos.
6. Se extrajo la inserción magnética de un soporte para tubos MPC-S de Dynal. El tubo de aceite de emulsión se introdujo en el soporte para tubos. El tubo se situó en el centro de una placa de agitación fijada a 600 rpm.
7. El tubo se agitó con vórtex extensivamente para resuspender las perlas. Esto garantizó que se producía un apelmazamiento mínimo de las perlas.
8. Utilizando una pipeta P-200, la mezcla de perlas para PCR se añadió gota a gota al aceite bajo agitación a una tasa de aproximadamente una gota cada 2 segundos, permitiendo que cada gota sedimentase hasta el nivel de la barra magnética de agitación y se emulsionase antes de añadir la siguiente gota. La solución se convirtió en un líquido blanco lechoso homogéneo con una viscosidad similar a la mayonesa.
9. Tras añadir la totalidad de la mezcla de perlas para PCR, el tubo de microcentrífuga se agitó con la mano unas cuantas veces para mezclar cualquier aceite en la superficie con la emulsión lechosa.
10. Se continuó con la agitación durante 5 minutos adicionales.
11. Se repitieron las etapas 9 y 10.
12. Se extrajo la barra de agitación del material emulsionado empujándola fuera del tubo con una barra de agitación más grande.
13. Se extrajeron 10  $\mu$ l de la emulsión y se colocaron sobre un portaobjetos de microscopía. La emulsión se cubrió con un cubreobjetos y la emulsión se inspeccionó a una magnificación de 50X (ocular de 10X y objetivo de 5X). Se esperaba que una emulsión “buena” incluyese principalmente perlas individuales en gotas aisladas (microrreactores) de solución para PCR en aceite.
14. Se preparó una mezcla adecuada de emulsión de aceite con estabilizadores de emulsión de la manera siguiente. Los componentes para la mezcla de emulsión se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

Ingrediente	Cantidad necesaria	Origen	Nº de referencia
Aceite mineral ligero Sigma	94,5 g	Sigma	M-5904
Atlox 4912	1 g	Uniqema	NA
Span 80	4,5 g	Uniqema	NA

## ES 2 330 339 T3

La mezcla de aceite de emulsión se preparó mediante precalentamiento de Atlox 4912 a 60°C en un baño de agua. A continuación, se añadieron 4,5 gramos de Span 80 a 94,5 gramos de aceite mineral para formar una mezcla. Seguidamente se añadió un gramo de Atlox 4912 precalentado a la mezcla. Las soluciones se introdujeron en un recipiente cerrado y se mezclaron mediante agitación e inversión. Cualquier indicio de que el Atlox estaba sedimentando o solidificándose se remedió mediante calentamiento de la mezcla a 60°C, seguido de agitación adicional.

### Ejemplo 6

#### *Amplificación*

El presente ejemplo describe la amplificación del ADN molde en la mezcla de perlas en emulsión. Según este protocolo, la etapa de amplificación del ADN del procedimiento dura 3 a 4 horas. Tras completar la amplificación, la emulsión puede dejarse en un termociclador durante 12 horas como máximo antes de iniciar el procedimiento de aislamiento de las perlas. El termociclado de PCR se llevó a cabo introduciendo 50 a 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción emulsionada en cámaras de reacción de PCR individuales (es decir, tubos para PCR). La PCR se llevó a cabo de la manera siguiente:

1. La emulsión se transfirió en cantidades de 50 a 100  $\mu$ l a aproximadamente 10 tubos para PCR separados o a una placa de 96 pocillos utilizando una única punta de pipeta. Para esta etapa, la emulsión de agua en aceite era altamente viscosa.
2. La placa se selló o las tapas de los tubos para PCR se cerraron y los recipientes se introdujeron en un termociclador de MJ con o sin un adaptador para placa de 96 pocillos.
3. El termociclador de PCR se programó para llevar a cabo el programa siguiente:
  - 1 ciclo (4 minutos a 94°C) - inicio Hotstart,
  - 40 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 90 segundos a 68°C),
  - 25 ciclos (30 segundos a 94°C, 6 minutos a 58°C), y
  - Almacenamiento a 14°C.
4. Tras completar la reacción de PCR, el material amplificado se extrajo con el fin de romper la emulsión y recuperar las perlas.

### Ejemplo 7

#### *Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas*

El presente ejemplo describe cómo romper la emulsión y recuperar las perlas con molde amplificado sobre las mismas. Preferentemente la emulsión posterior a la PCR debe seguir intacta. La fase inferior de la emulsión debería, según su apariencia, seguir siendo una suspensión blanca lechosa. Si la solución es transparente, la emulsión podría haberse resuelto parcialmente en sus fases acuosa y aceite, y es probable que muchas de las perlas presenten una mezcla de moldes. Si la emulsión se ha roto en uno o dos de los tubos, estas muestras no deberían agruparse con las demás. Si la emulsión se ha roto en todos los tubos, no debe continuarse con el procedimiento.

1. Todas las reacciones de PCR procedentes de la muestra original de 600  $\mu$ l se agruparon en un único tubo de microcentrífuga de 1,5 ml utilizando una única punta de pipeta. Tal como se ha indicado anteriormente, la emulsión era bastante viscosa. En algunos casos, el pipeteado se repitió varias veces para cada tubo. Se transfirió la máxima cantidad de material al tubo de 1,5 ml.
2. El material emulsionado remanente se recuperó de cada tubo para PCR mediante la adición de 50  $\mu$ l de aceite mineral Sigma en cada muestra. Utilizando una única punta de pipeta, se mezcló cada tubo utilizando la pipeta para resuspender el material remanente.
3. Este material se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía la mayor parte del material emulsionado.
4. La muestra se agitó con vórtex durante 30 segundos.
5. La muestra se centrifugó durante 20 minutos en un tubo de microcentrífuga de laboratorio a 13,2 K rpm en la microcentrífuga Eppendorf.
6. La emulsión se separó en dos fases con una gran interfaz blanca. Se extrajo la máxima cantidad posible de la fase aceite transparente superior. El material turbio se dejó en el tubo. Con frecuencia, una capa blanca separaba las capas aceitosa y acuosa. Las perlas con frecuencia se observaron peletizadas en el fondo del tubo.

## ES 2 330 339 T3

7. La capa acuosa en la parte superior de las perlas se extrajo y se reservó para el análisis (análisis del gel, Agilent 2100 y Taqman): en el caso de que persistiese una interfaz de material blanco en la parte superior de la capa acuosa, se extraían 20 microlitros de la capa acuosa subyacente. Lo anterior se llevó a cabo atravesando el material de la interfaz con una punta de pipeta y extrayendo la solución subyacente.
8. En la campana de humos de la sala de fabricación de PTP y de química superficial, se añadió 1 ml de hexanos al remanente de emulsión.
9. La muestra se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
10. En la campana de humos de la sala de fabricación de PTP y de química superficial, se extrajo la fase superior de aceite/hexano y se introdujo en el recipiente de residuos orgánicos.
11. Se añadieron - ml de tampón de hibridación 1X en etanol al 80% en la fase acuosa remanente, interfaz y perlas.
12. La muestra se agitó con vórtex durante 1 minuto o hasta la disolución de la sustancia blanca.
13. La muestra se centrifugó durante 1 minuto a alta velocidad. El tubo se hizo girar 180 grados y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto. Se extrajo el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas.
14. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de hibridación 1X que contenía Tween 20 al 0,1% y se repitió esta etapa.

### Ejemplo 8

#### *Extracción de cadenas únicas e hibridación de cebadores*

En caso de que las perlas deban utilizarse en una reacción de secuenciación basada en el pirofosfato, resulta necesario extraer la segunda cadena del producto de la PCR e hibridar un cebador de secuenciación al molde monocatenario que se encuentra unido a la perla. El presente ejemplo describe un protocolo para llevar a cabo lo anterior.

1. Se lavaron las perlas con 1 ml de agua y se centrifugaron dos veces durante 1 minuto. El tubo se hizo girar 180° entre centrifugaciones. Tras las centrifugaciones, se extrajo la fase acuosa.
2. Las perlas se lavaron con 1 ml de EDTA 1 mM. El tubo se centrifugó tal como en la etapa 1 y se extrajo la fase acuosa.
3. Se añadió 1 ml de NaOH 0,125 M y la muestra se incubó durante 8 minutos.
4. La muestra se agitó con vórtex brevemente y se introdujo en una microcentrífuga.
5. Tras 6 minutos, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1 y se extrajo la máxima cantidad posible de solución.
6. Tras completar la incubación de 8 minutos en NaOH, se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X.
7. La muestra se agitó con vórtex brevemente y las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1. Se extrajo la máxima cantidad posible de sobrenadante y se añadió 1 ml adicional de tampón de hibridación 1X.
8. La muestra se agitó con vórtex brevemente, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1 y se extrajeron 800  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X.
9. Las perlas se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml.
10. Las perlas se transfirieron y se extrajo la máxima cantidad posible de tampón de hibridación sin perturbar las perlas.
11. Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X.
12. Se añadieron 4  $\mu$ l de cebador de secuenciación 100  $\mu$ M. La muestra se agitó con vórtex inmediatamente antes de la hibridación.
13. Se llevó a cabo la hibridación en un termociclador de MJ utilizando el programa “80Anneal”.
14. Las perlas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X y se resuspendieron con 100  $\mu$ l de tampón de hibridación 1X.

## ES 2 330 339 T3

15. Las perlas se contaron en un hemocitómetro Hausser. Típicamente se recuperan 300.000 a 500.000 perlas (3.000 a 5.000 perlas/ $\mu$ l).

16. Las perlas se almacenaron a 4°C y pudieron utilizarse para secuenciar durante 1 semana.

### Ejemplo 9

#### *Etapas opcionales de enriquecimiento*

Las perlas pueden enriquecerse para las perlas que contienen amplicón utilizando el procedimiento siguiente. El enriquecimiento no resulta necesario pero podría utilizarse para incrementar la eficiencia de técnicas de biología molecular posteriores, tales como la secuenciación de ADN.

Se añadieron cincuenta microlitros de biotina-cebador de secuenciación 10  $\mu$ M (en total 500 pmoles) a las perlas de sefarosa que contenían amplicones del Ejemplo 5. Las perlas se introdujeron en un termociclador. El programa de hibridación del termociclador del Ejemplo 2 hibridó el cebador con el ADN sobre la perla.

Tras la hibridación, las perlas de sefarosa se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. Las perlas, que ahora contenían fragmentos de ADNmc hibridados con biotina-cebadores de secuenciación, se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de tampón de unión BST. Se añadieron diez microlitros de polimerasa Bst a una concentración de 50.000 unidades/ml a las perlas resuspendidas y el recipiente con las perlas se dejó en un agitador durante cinco minutos. Se añadieron dos microlitros de mezcla de dNTPs 10 mM (es decir, 2,5  $\mu$ l de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP 10 mM) y la mezcla se incubó durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación.

Cincuenta microlitros de perlas con estreptavidina Dynal (Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY; M270 o perlas MyOne™ a una concentración de 10 mg/ml) se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. A continuación, se añadió la mezcla de perlas Dynal a las perlas de sefarosa resuspendidas. La mezcla se agitó con vórtex y se introdujo en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Las perlas se recogieron del fondo de la probeta mediante centrifugación a 2.300 g (500 rpm para la centrífuga Eppendorf 5415D). Las perlas se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. La mezcla, en una probeta, se introdujo en un separador magnético (Dynal). Las perlas se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original en el mismo tampón. Las perlas sin amplicones se eliminaron mediante etapas de lavado, tal como se ha descrito anteriormente. Se retuvieron únicamente las perlas de sefarosa que contenían los fragmentos de ADN apropiados.

Las perlas magnéticas se separaron de las perlas de sefarosa mediante la adición de 500  $\mu$ l de NaOH 0,125 M. La mezcla se agitó con vórtex y las perlas magnéticas se extrajeron mediante separación magnética. Las perlas de sefarosa remanente en solución se transfirieron a otro tubo y se lavaron con 400  $\mu$ l de Tris-acetato 50 mM hasta estabilizar el pH a 7,6.

### Ejemplo 10

#### *Secuenciación de ácidos nucleicos utilizando PCR en emulsión de perlas*

El experimento siguiente se llevó a cabo para someter a ensayo la eficacia de la PCR en emulsión de perlas. Para este protocolo, se unieron a cebadores de captura 600.000 perlas de sefarosa, con un diámetro medio de 25 a 35  $\mu$ m (tal como las suministra el fabricante) en una proporción de 30 a 50 millones de copias por perla. Las perlas con cebadores de captura unidos covalentemente se mezclaron con 1,2 millones de copias de biblioteca de adenovirus monocatenario. Los constructos de biblioteca incluían una secuencia que era complementaria al cebador de captura sobre las perlas.

La biblioteca de adenovirus se hibridó con las perlas utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. A continuación, las perlas se resuspendieron en solución para PCR completa. La solución para PCR y las perlas se emulsionaron en 2 volúmenes de aceite de emulsificación para centrifugación utilizando el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las perlas emulsionadas (encapsuladas) se sometieron a amplificación mediante PCR tal como se describe de manera general en el Ejemplo 3. La emulsión se rompió tal como se describe de manera general en el Ejemplo 4. El ADN sobre las perlas se convirtió en monocatenario y el cebador de secuenciación se hibridó utilizando el procedimiento del Ejemplo 5.

A continuación, se secuenciaron simultáneamente 70.000 perlas mediante secuenciación a partir de pirofosfato utilizando un secuenciador pirofosfato de 454 Life Sciences (New Haven, CT) (ver la solicitud copendiente de Lohman *et al.*, presentada concurrentemente con la presente invención, titulada "Methods of Amplifying and Sequencing Nucleic Acids", USSN 60/476.592, presentada el 6 de junio de 2003). Se secuenciaron múltiples lotes de 70.000 perlas y los datos se proporcionan en la Tabla 6, a continuación.

TABLA 6

Tolerancia del error de alineación	Alineaciones				Cobertura	Error de lectura inferido
	Ninguna	Única	Múltiples	Única		
0%	47916	1560		1110	54,98%	0,00%
5%	46026	3450		2357	83,16%	1,88%
10%	43474	6001	1	3742	95,64%	4,36%

Esta tabla muestra los resultados obtenidos del análisis de BLAST de comparación de las secuencias obtenidas del secuenciador de pirofosfato con la secuencia de adenovirus. La primera columna muestra la tolerancia de error utilizada en el programa BLAST. La última columna muestra el error real según se determinó mediante comparación directa con la secuencia conocida.

#### *PCR en emulsión de perlas para la secuenciación desde dos extremos*

##### *Ejemplo 11*

##### *Control de calidad de los moldes*

Tal como se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que el éxito de la reacción de PCR en emulsión se relaciona con la calidad de las especies de molde monocatenario. De acuerdo con lo anterior, se evaluó la calidad del material de molde con dos controles de calidad independientes antes de iniciar el protocolo de PCR en emulsión. En primer lugar, se analizó una alícuota del molde monocatenario en el 2100 BioAnalyzer (Agilent). Se utilizó un PicoChip de ARN para verificar que la muestra incluía una población heterogénea de fragmentos, de tamaños comprendidos entre aproximadamente 200 y 500 bases. En segundo lugar, la biblioteca se cuantificó utilizando el ensayo de fluorescencia RiboGreen en un fluorímetro de placa Bio-Tek FL600. Las muestras que se determinó que presentaban concentraciones de ADN inferiores a 5 ng/μl se consideraron excesivamente diluidas para ser utilizadas.

##### *Ejemplo 12*

##### *Síntesis de perlas de captura de ADN*

Las perlas empaquetadas procedentes de una columna HP de afinidad de sefarosa activada con 1 ml de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) se extrajeron de la columna. Se seleccionaron las perlas de entre 30 y 25 μm mediante el pase en serie a través de secciones de malla de filtro de 30 y 25 μm de poro (Sefar America, Depew, NY, USA). Las perlas que pasaban a través del primer filtro pero que resultaban retenidas por el segundo se recogían y se activaban tal como se describe en la literatura del producto (protocolo de Amersham Pharmacia No. 71700600AP). Se obtuvieron dos cebadores de captura largos diferentes marcados con amina HEG, correspondientes al extremo 5' de las cadenas sentido y antisentido del molde que debía amplificarse (5'-amina-3 espaciadores HEG gcttacctgaccgacctgtgctatcccctgttgctgtc-3', SEC ID NO:12 y 5'-amina-3 espaciadores HEG ccattcccagctcgtctgtccatctgttcctccctgtc-3', SEC ID NO:13) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA). Los cebadores se diseñaron para capturar ambas cadenas de los productos de amplificación, permitiendo la secuenciación desde dos extremos, es decir, la secuenciación de la primera y segunda cadenas de los productos de amplificación. Los cebadores de captura se disolvieron en tampón fosfato 20 mM, pH 8,0, obteniendo una concentración final de 1 mM. Se unieron tres microlitros de cada cebador a las perlas tamizadas de entre 30 μm y 25 μm. A continuación, se almacenaron las perlas en un tampón de almacenamiento de perlas (Tris 50 mM, Tween al 0,02% y azida sódica al 0,02%, pH 8). Las perlas se cuantificaron con un hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y se almacenaron a 4°C hasta la utilización.

##### *Ejemplo 13*

##### *Preparación y formulación de mezcla de reacción de PCR*

Al igual que con cualquier técnica de amplificación de moléculas individuales, la contaminación de las reacciones con amplicones foráneos o residuales de otros experimentos podría interferir con una operación de secuenciación. Para reducir la probabilidad de contaminación, se preparó la mezcla de reacción de PCR en una campana de flujo lamina tratada con UV en una sala limpia para PCR. Por cada reacción de PCR en emulsión de 600.000 perlas, se mezclaron los reactivos siguientes en un tubo de 1,5 ml: 225 μl de mezcla de reacción (tampón 1X Platinum HiFi (Invitrogen)), dNTPs 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM (Invitrogen), BSA al 0,1%, Tween al 0,1%, Ppi-asa termoestable 0,003 U/μl (NEB), cebador directo 0,125 μM (5'-gcttacctgaccgacctgtg-3', SEC ID NO:14) y cebador inverso 0,125 μM (5'-ccattcccagctcgtctgtg-3', SEC ID NO:15) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA) y polimerasa Taq Platinum Hi-



## ES 2 330 339 T3

Fi 0,2 U/ $\mu$ l (Invitrogen). Se extrajeron veinticinco microlitros de la mezcla de reacción y se almacenaron en un tubo para PCR individual de 200  $\mu$ l para la utilización como control negativo. Se almacenó tanto la mezcla de reacción como los controles negativos sobre hielo hasta la utilización.

5

### Ejemplo 14

#### *Unión de las especies de molde a las perlas de captura de ADN*

10 La amplificación de ADN clonal con éxito para la secuenciación se relaciona con la administración de un número controlado de especies de molde en cada perla. Para los experimentos descritos posteriormente en la presente memoria, la concentración de molde típica se determinó que era de 0,5 copias de molde por perla de captura. A esta concentración, la distribución de Poisson dicta que 61% de las perlas no presentan molde asociado, 30% presentan una especie de molde y 9% presentan dos o más especies de molde. La administración de un exceso de especies puede resultar en la  
15 unión y posterior amplificación de una población mixta (2 ó más especies) en una sola perla, impidiendo la generación de datos de secuencia con sentido. Sin embargo, la administración de un número insuficiente de especies resultará en menos pocillos que contengan molde (una especie por perla), reduciendo el grado de cobertura de la secuenciación. En consecuencia, se consideró que la concentración de molde monocatenario de biblioteca era importante.

20 Se hibridaron moléculas de ácido nucleico de molde con cebadores complementarios en las perlas de captura de ADN mediante el método siguiente, llevado a cabo en una campana de flujo laminar tratada con UV. Se transfirieron seiscientos mil perlas de captura de ADN suspendidas en tampón de almacenamiento de perlas (ver el Ejemplo 9, anteriormente) a un tubo para PCR de 200  $\mu$ l. El tubo se centrifugó en una minicentrífuga de laboratorio durante 10 segundos, se hizo girar 180° y se centrifugó durante 10 segundos adicionales para garantizar la formación uniforme de  
25 pellet. Se extrajo el sobrenadante y las perlas se lavaron con 200  $\mu$ l de tampón de hibridación (Tris 20 mM, pH 7,5 y acetato de magnesio 5 mM). El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos para resuspender las perlas y las perlas se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se extrajo la totalidad del sobrenadante en la parte superior de las perlas excepto 10  $\mu$ l, y se añadieron 200  $\mu$ l adicionales de tampón de hibridación. Las perlas se agitaron nuevamente con vórtex durante 5 segundos, se dejaron reposar durante 1 minuto y después se peletizaron tal como se ha indicado  
30 anteriormente. Se descartó la totalidad excepto 10  $\mu$ l del sobrenadante.

A continuación, se añadieron a las perlas 1,5  $\mu$ l de biblioteca de molde a una concentración de 300.000 moléculas/ $\mu$ l. El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos para mezclar el contenido y los moldes se hibridaron con las perlas en un programa de desnaturalización/hibridación controladas en un termociclador de MJ. El programa permitía la incubación durante 5 minutos a 80°C, seguido de una reducción de 0,1°C/s hasta 70°C, incubación durante  
35 1 minuto a 70°C, reducción de 0,1°C/s hasta 60°C, mantenimiento a 60°C durante 1 minuto, reducción de 0,1°C/s hasta 50°C, mantenimiento a 50°C durante 1 minuto, reducción de 0,1°C/s hasta 20°C y mantenimiento a 20°C. Tras completar el procedimiento de hibridación, se extrajeron las perlas del termociclador, se centrifugaron tal como se ha indicado anteriormente, y se decantó cuidadosamente el tampón de hibridación. Las perlas de captura incluían una media de  
40 0,5 copias de ADN monocatenario de molde unido a cada perla, y se almacenaron en hielo hasta la utilización.

### Ejemplo 15

#### 45 *Emulsificación*

El procedimiento de emulsificación crea una emulsión de agua en aceite termoestable que contiene 10.000 microrreactores de PCR discretos por microlitro. Lo anterior sirve como matriz para la amplificación clonal de moléculas individuales de la biblioteca diana. La mezcla de reacción y las perlas de captura de ADN para una reacción  
50 individual se emulsionaron de la manera siguiente. En una campana de flujo lamina tratada con UV, se añadieron 200  $\mu$ l de solución para PCR (del Ejemplo 10) al tubo que contenía las 600.000 perlas de captura de ADN (del Ejemplo 11). Las perlas se resuspendieron mediante pipeteado repetido. Después, la mezcla de perlas para PCR se incubaron a temperatura ambiente durante por lo menos 2 minutos, dejando que las perlas se equilibrasen con la solución para PCR. Simultáneamente, se introdujeron 450  $\mu$ l de aceite de emulsión (Span 80 al 4,5% (p/p), Atlox 4912 al 1% (p/p)  
55 (Uniqema, Delaware) en aceite mineral ligero (Sigma)) en un tubo de centrifuga de 2 ml de tapa plana (Dot Scientific) que contenía una barra de agitación magnética estéril de 1/4 de pulgada (Fischer). Este tubo se introdujo seguidamente en un dispositivo de soporte para tubos de plástico realizado al efecto, que seguidamente se centró sobre una placa calefactora digital Fisher Isotemp (Fisher Scientific) fijada a 450 rpm.

60 La solución de perlas para PCR se agitó con vórtex durante 15 segundos para resuspender las perlas. A continuación, se aspiró la solución en una jeringa de plástico desechable de 1 ml (Benton-Dickenson) con una aguja para jeringa de plástico de seguridad (Henry Schein). La jeringa se introdujo en una bomba de jeringa (Cole-Parmer) modificada con una unidad de base de aluminio que orientaba la bomba verticalmente y no horizontalmente (figura 30). El tubo con el aceite de emulsión se alineó sobre la placa calefactora de manera que se encontrase centrada bajo la aguja de  
65 jeringa de plástico y la barra de agitación magnética girase correctamente. Se fijó que la bomba de jeringa dispensase 0,6 ml a una tasa de 5,5 ml/h. La solución de perlas para PCR se añadió al aceite de emulsión gota a gota. Se procuró que las gotas no entrasen en contacto con las paredes del tubo a medida que caían en el aceite bajo centrifugación.

## ES 2 330 339 T3

Tras formar la emulsión, se tuvo gran cuidado en minimizar la agitación de la emulsión durante el procedimiento de emulsificación y durante la etapa de dispensación de alícuotas posterior a la emulsificación. Se encontró que la agitación con vórtex, el pipeteado rápido o la mezcla excesiva podían provocar la rotura de la emulsión, destruyendo los microrreactores discretos. Durante la formación de la emulsión, las dos soluciones se convirtieron en una mezcla blanca lechosa homogénea con la viscosidad de la mayonesa. Se vació el contenido de la jeringa en el aceite bajo centrifugación. A continuación, se retiró el tubo con emulsión del dispositivo de soporte y se agitó suavemente con un dedo hasta hacer desaparecer cualquier capa residual de aceite en la parte superior de la emulsión. Se colocó nuevamente el tubo en el dispositivo de soporte y se agitó con la barra de agitación magnética durante un minuto adicional. Se retiró la barra de agitación de la emulsión haciendo correr una herramienta de extracción magnética a lo largo del exterior del tubo y se descartó la barra de agitación.

Se extrajeron veinte microlitros de la emulsión procedentes del centro del tubo utilizando un pipeteador P100 y se colocaron sobre un portaobjetos de microscopía. Se utilizaron las puntas de pipeta más grandes para minimizar las fuerzas de cizalla. Se inspeccionó la emulsión a una magnificación de 50X para garantizar que estaba comprendida predominantemente de perlas individuales en microrreactores de 30 a 150 micrómetros de diámetro de solución para PCR en aceite (figura 33). Tras el examen visual, se amplificaron inmediatamente las emulsiones.

### Ejemplo 16

#### Amplificación

Se dividió la emulsión en alícuotas en 7-8 tubos para PCR separados. Cada tubo incluía aproximadamente 75  $\mu$ l de la emulsión. Los tubos se sellaron y se introdujeron en un termociclador de MJ conjuntamente con los 25  $\mu$ l de control negativo indicado anteriormente. Se aplicaron los tiempos de ciclado siguientes: 1 ciclo de incubación durante 4 minutos a 94°C (inicio en caliente), 30 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C, y 150 segundos a 68°C (amplificación) y 40 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C, y 360 segundos a 68°C (hibridación y extensión). Tras completar el programa de PCR, se extrajeron los tubos y se rompieron las emulsiones inmediatamente o se almacenaron las reacciones a 10°C durante un máximo de 16 horas antes de iniciar el procedimiento de rotura.

### Ejemplo 17

#### Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

Tras la amplificación, se examinaron las emulsiones para identificar roturas (separación de las fases de aceite y agua). Las emulsiones no rotas se agruparon en un único tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, mientras que la ocasional emulsión rota se descartó. Debido a que las muestras de emulsión eran bastante viscosas, quedaron cantidades significativas en cada tubo para PCR. La emulsión remanente en los tubos se recuperó mediante la adición de 75  $\mu$ l de aceite mineral en cada tubo para PCR y pipeteando la mezcla. Esta mezcla se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía la mayor parte del material emulsionado. El tubo de 1,5 ml seguidamente se agitó con vórtex durante 30 segundos. A continuación, el tubo se centrifugó durante 20 minutos en la microcentrífuga de laboratorio a 13,2 Krpm (velocidad máxima).

Tras la centrifugación, la emulsión se separó en dos fases con una gran interfaz blanca. La fase superior aceitosa transparente se descartó, mientras que el material turbio del interfaz se dejó en el tubo. En una campana de humos química se añadió 1 ml de hexanos a la fase inferior y a la capa de interfaz. La mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto en una microcentrífuga de laboratorio. Se separó la fase superior de aceite/hexano y se descartó. A continuación, se añadió 1 ml de etanol al 80%/tampón de hibridación 1X a la fase acuosa remanente, al interfaz y a las perlas. Esta mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto o hasta disolver el material blanco del interfaz. Seguidamente la muestra se centrifugó en una microcentrífuga de laboratorio durante 1 minuto a velocidad máxima. El tubo se hizo girar 180 grados y se centrifugó nuevamente durante un minuto adicional. A continuación, el sobrenadante se separó cuidadosamente sin perturbar el pellet de perlas.

El pellet blanco de perlas se lavó dos veces con 1 ml de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. Se descartó la solución de lavado y las perlas se peletizaron tras cada lavado tal como se ha descrito anteriormente. El pellet se lavó con 1 ml de agua picopura. Las perlas se peletizaron con el método de centrifugación-giro-centrifugación utilizado anteriormente. Se separó cuidadosamente la fase acuosa. Seguidamente se lavaron las perlas con 1 ml de EDTA 1 mM tal como anteriormente, excepto en que las perlas se agitaron con vórtex brevemente a un ajuste intermedio durante 2 segundos antes de peletizar y separar el sobrenadante.

El ADN amplificado, inmovilizado sobre las perlas de captura, se trató para obtener ADN monocatenario. Se separó la segunda cadena mediante incubación en una solución de fusión básica. Un ml de la solución de fusión (NaOH 0,125 M, NaCl 0,2 M) se añadió seguidamente a las perlas. El pellet se resuspendió mediante agitación con vórtex a un ajuste intermedio durante 2 segundos y el tubo se introdujo en un agitador de tubos Thermolyne LabQuake durante 3 minutos. A continuación, las perlas se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente, y el sobrenadante se separó cuidadosamente y se descartó. La solución de fusión residual se neutralizó mediante la adición de 1 ml de tampón de hibridación. A continuación, las perlas se agitaron con vórtex a un ajuste intermedio durante 2 segundos. Las perlas se peletizaron y se separó el sobrenadante tal como se ha indicado anteriormente. Se repitió el lavado con tampón

## ES 2 330 339 T3

de hibridación, excepto en que únicamente se separaron 800  $\mu$ l del tampón de hibridación tras la centrifugación. Las perlas y el tampón de hibridación remanente se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml. Las perlas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C durante como máximo 4 horas antes de continuar con el procedimiento de enriquecimiento.

### Ejemplo 18

#### *Enriquecimiento opcional en perlas*

La masa de perlas incluía perlas con cadenas de ADN inmovilizadas amplificadas y perlas vacías o nulas. Tal como se ha indicado anteriormente, se calculó que 61% de las perlas no presentaba ADN de molde durante el procedimiento de amplificación. El enriquecimiento sirvió para aislar selectivamente las perlas que presentaban ADN de molde, maximizando de esta manera la eficiencia de la secuenciación. El procedimiento de enriquecimiento se describe en detalle a continuación.

Las perlas con cadenas únicas del Ejemplo 14 se peletizaron con el método de centrifugación-giro-centrifugación y se separó la máxima cantidad posible de sobrenadante sin perturbar las perlas. Se añadieron quince microlitros de tampón de hibridación a las perlas, seguido de 2  $\mu$ l de cebador de enriquecimiento de 40 bases biotinilado 100  $\mu$ M (espaciadores 5'-biotín-tetraetilenglicol ccattcccccagctcgtcttgccatctgttcctccctgtctcag-3', SEC ID NO:16). El cebador era complementario a los sitios de amplificación y secuenciación combinada (cada uno de longitud igual a 20 bases) en el extremo 3' del molde inmovilizado en perlas. La solución se mezcló con vórtex a un ajuste intermedio durante 2 segundos, y los cebadores de enriquecimiento se hibridaron con las cadenas de ADN inmovilizadas utilizando un programa de desnaturalización controlada/hibridación en un termociclador de MJ. El programa consistía de los tiempos de ciclado y temperaturas siguientes: incubación durante 30 segundos a 65°C, reducción a 0,1°C/s hasta 58°C, incubación durante 90 segundos a 58°C, y mantenimiento a 10°C.

Mientras se hibridaban los cebadores, las perlas con estreptavidina MyOne™ de Dynal se resuspendieron con un movimiento suave de giro. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ l de las perlas MyOne™ a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenía 1 ml de potenciador líquido (NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La mezcla de perlas MyOne se agitó con vórtex durante 5 segundos y el tubo se introdujo en un agitador magnético MPC-S de Dynal. Las perlas paramagnéticas se peletizaron contra un lado del tubo de microcentrífuga. Se separó cuidadosamente el sobrenadante y se descartó sin perturbar las perlas MyOne™. Se extrajo el tubo del agitador magnético y se añadieron 100  $\mu$ l del potenciador líquido. El tubo se agitó con vórtex durante 3 segundos para resuspender las perlas y se almacenaron sobre hielo hasta la utilización.

Tras completar el programa de hibridación, se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de hibridación al tubo para PCR que contenía las perlas de captura de ADN y el cebador de enriquecimiento. El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos, y se transfirió el contenido a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1,5 ml. El tubo para PCR en el que se hibridó el cebador de enriquecimiento con las perlas de captura se lavó una vez con 200  $\mu$ l de tampón de hibridación y la solución de lavado se añadió al tubo de 1,5 ml. Las perlas se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de hibridación, se agitaron con vórtex durante 2 segundos y se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se separó cuidadosamente el sobrenadante. Tras el tercer lavado, las perlas se lavaron dos veces con 1 ml de potenciador líquido helado. Las perlas se agitaron con vórtex, se peletizaron y el sobrenadante se separó tal como se ha indicado anteriormente. Las perlas se resuspendieron en 150  $\mu$ l de potenciador líquido helado y la solución de perlas se añadió a las perlas MyOne™ lavadas.

La mezcla de perlas se agitó con vórtex durante 3 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos en un agitador de tubos LabQuake. Las perlas MyOne™ recubiertas de estreptavidina se unieron a los cebadores de enriquecimiento biotinilados hibridados con moldes inmovilizados en las perlas de captura de ADN. A continuación, las perlas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos, agitando seguidamente con vórtex en pulsos de 2 segundos hasta su resuspensión. Las perlas resuspendidas se reservaron sobre hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 500  $\mu$ l de potenciador líquido helado a las perlas y el tubo se insertó en un agitador magnético MPC-S de Dynal. Las perlas se dejaron reposar durante 60 segundos para permitir la peletización contra el imán. Después, se separó cuidadosamente y se descartó el sobrenadante, con exceso de MyOne™ y perlas de captura de ADN nulas.

Se extrajo el tubo del agitador magnético MPC-S y se añadió 1 ml de potenciador líquido frío a las perlas. Éstas se resuspendieron con golpecitos suaves con los dedos. Resultaba importante no agitar con vórtex las perlas en este momento, debido a que una agitación vigorosa podría romper la unión entre MyOne™ y las perlas de captura de ADN. Se devolvieron las perlas al agitador magnético y se extrajo el sobrenadante. Se repitió este lavado tres veces más para garantizar la eliminación de todas las perlas de captura nulas. Para separar los cebadores de enriquecimiento hibridados y las perlas MyOne™, las perlas de captura de ADN se resuspendieron en 400  $\mu$ l de solución de fusión, se agitaron con vórtex durante 5 segundos y se peletizaron con el agitador magnético. El sobrenadante con las perlas enriquecidas se transfirió a un tubo de microcentrífuga separado de 1,5 ml. Para la máxima recuperación de perlas enriquecidas, se añadió una segunda alícuota de 400  $\mu$ l de solución de fusión al tubo que contenía las perlas MyOne™. Las perlas se agitaron con vórtex y se peletizaron tal como anteriormente. El sobrenadante del segundo lavado se separó y se agrupó con el primer bolo de perlas enriquecidas. El tubo de perlas MyOne™ utilizadas se descartó.

## ES 2 330 339 T3

El tubo de microcentrífuga de perlas de captura de ADN enriquecidas se introdujo en el agitador magnético MPC-S de Dynal para peletizar cualquier perla MyOne™ residual. Las perlas enriquecidas en el sobrenadante se transfirieron a un segundo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifugaron. Se separó el sobrenadante y las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón de hibridación para neutralizar la solución de fusión residual. Tras el tercer lavado, se extrajeron 800 µl del sobrenadante, y las perlas y solución restantes se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml. Las perlas enriquecidas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 20 µl de tampón de hibridación y 3 µl de dos cebadores de secuenciación 100 µM diferentes (5'-ccatctgttccctccctgtc-3', SEC ID NO:17, y 5'-ccatccctgttgcgtgtc-3' fosfato, SEC ID NO:18). El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos y se introdujo en un termociclador MJ para el programa de hibridación en 4 etapas siguientes: incubación durante 5 minutos a 65°C, reducción a 0,1°C/s hasta 50°C, incubación durante 1 minuto a 50°C, reducción a 0,1°C/s hasta 40°C, mantenimiento a 40°C durante 1 minuto, reducción a 0,1°C/s hasta 15°C y mantenimiento a 15°C.

Tras completar el programa de hibridación, se extrajeron las perlas del termociclador y se peletizaron mediante centrifugación durante 10 segundos. El tubo se hizo girar 180° y se centrifugó durante 10 segundos adicionales. El sobrenadante se decantó y se descartó y se añadieron 200 µl de tampón de hibridación al tubo. Las perlas se resuspendieron con una agitación de 5 segundos con vórtex y se peletizaron tal como anteriormente. Se extrajo el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 100 µl de tampón de hibridación. En este punto se cuantificaron las perlas con un contador Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter). Las perlas se almacenaron a 4°C y se mantuvieron estables durante por lo menos 1 semana.

### Ejemplo 19

#### *Secuenciación de doble cadena*

Para la secuenciación de doble cadena, se utilizaron dos cebadores de secuenciación diferentes: un cebador MMP7A no modificado y un cebador 3'-fosforilado MMP2Bp. El procedimiento presenta múltiples etapas. Este procedimiento se muestra esquemáticamente en la figura 38.

1. Secuenciación de la primera cadena. La secuenciación de la primera cadena implica la extensión del cebador no modificado por una ADN polimerasa mediante la adición secuencial de nucleótidos durante un número predeterminado de ciclos.
2. ADICIÓN DE CAPERUZA: se terminó la secuenciación de la primera cadena haciendo fluir un tampón de adición de caperuza que contenía tricina 25 mM, acetato de magnesio 5 mM, DTT 1 mM, PVP 0,4 mg/ml, BSA 0,1 mg/ml, Tween al 0,01% y 2 µM de cada dideoxinucleótido y 2 µM de cada desoxinucleótido.
3. LAVADO: se eliminaron los desoxinucleótidos y dideoxinucleótidos residuales mediante flujo en tampón apirasa que contenía tricina 25 mM, acetato de magnesio 5 mM, DTT 1 mM, PVP 0,4 mg/ml, BSA 0,1 mg/ml, Tween al 0,01% y 8,5 unidades/l de apirasa.
4. CORTE: el segundo cebador bloqueado se desbloqueó eliminando el grupo fosfato del extremo 3' del cebador 3' fosforilado modificado haciendo fluir un tampón de corte que contenía 5 unidades/ml de fosfatasas intestinales bovinas.
5. CONTINUACIÓN: el segundo cebador desbloqueado se activó mediante la adición de polimerasa haciendo fluir 1.000 unidades/ml de ADN polimerasas para capturar todos los sitios de cebador disponibles.
6. Secuenciación de la segunda cadena: secuenciación de la segunda cadena por una ADN polimerasa mediante la adición secuencial de nucleótidos durante un número predeterminado de ciclos.

Utilizando los métodos indicados anteriormente, se secuenció el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Los resultados se presentan en la figura 39. Se obtuvo un total de 31.785 lecturas basadas en 15.770 lecturas de la primera cadena y 16.015 lecturas de la segunda cadena. De éstas, un total de 11.799 lecturas se encontraban apareadas y 8.187 lecturas se encontraban desapareadas, obteniendo una cobertura total de 38%.

Las longitudes de lectura se encontraban comprendidas entre 60 y 130, con una media de  $95 \pm 9$  bases (figura 40). La distribución de tamaños de fragmentos genómicos y el número de pocillos correspondiente a cada tamaño se muestran en la figura 41. Los tramos alineados representativos, procedentes de dicha secuenciación genómica, se muestran en la figura 42.

## ES 2 330 339 T3

### Ejemplo 20

#### PCR de moldes

5 Se acoplaron perlas de NHS-sefarosa de 30 micrómetros a 1 mM de cada uno de los cebadores siguientes:

MMP1A: cgtttccctgtgtgccttg (SEC ID NO:19)

MMP1B: ccatctgttgcgtgcgtg (SEC ID NO:20)

10

Se llevó a cabo una PCR dirigida a perlas en un tubo en el termociclador MJ mediante la adición de 50  $\mu$ l de perlas acopladas a cebador y lavadas a una mezcla madre de PCR en una proporción de volumen-volumen de uno a uno. La mezcla madre de PCR incluía:

15

Tampón para PCR 1X;

1 mM de cada dNTP;

20

cebador MMP1A 0,625  $\mu$ M;

cebador MMP1B 0,625  $\mu$ M;

1  $\mu$ l de 1 unidad/ $\mu$ l HiFi Taq (Invitrogen, San Diego, CA); y

25

~5 a 10 ng de ADN molde (el ADN que debe secuenciarse).

30 Se llevó a cabo la reacción de PCR programando el termociclador MJ de la manera siguiente: incubación a 94°C durante 3 minutos, 39 ciclos de incubación a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos, seguido de incubación a 94°C durante 30 segundos y 58°C durante 10 minutos; 10 ciclos de incubación a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos y almacenamiento a 10°C.

### 35 Ejemplo 21

#### Preparación de ADN molde e hibridación del cebador de secuenciación

40 Las perlas del Ejemplo 1 se lavaron dos veces con agua destilada, se lavaron una vez con EDTA 1 mM y se incubaron con NaOH 0,125 M durante 5 minutos. Lo anterior eliminó las cadenas de ADN no unidas a perlas. A continuación, las perlas se lavaron una vez con tampón de Tris-acetato 50 mM y dos veces con tampón de hibridación: Tris-acetato 200 mM, acetato de magnesio 50 mM, pH 7,5. Seguidamente, se añadieron 500 pmoles de los cebadores de secuenciación MMP7A (ccatctgttcctcctg, SEC ID NO:21) y MMP2B-phos (cctatccctgttgctg, SEC ID NO:22) a las perlas. Los cebadores se hibridaron con el programa siguiente en el termociclador MJ: incubación a 60°C durante 5 minutos, caída de temperatura de 0,1 grados por segundo hasta 50°C, incubación a 50°C durante 5 minutos, caída de temperatura de 0,1 grados por segundo hasta 40°C, incubación a 40°C durante 5 minutos, caída de temperatura de 0,1 grados por segundo hasta 10°C. A continuación, se secuenció el molde utilizando secuenciación a partir de pirofosfato estándar.

50

### Ejemplo 22

#### Secuenciación y parada de la primera cadena

55 Las perlas se centrifugaron en una placa PicoTiter (PTP) de 55  $\mu$ m a 3.000 rpm durante 10 minutos. La PTP se colocó en un soporte y se realizó la secuenciación *de novo* durante un número predeterminado de ciclos. La secuenciación se detuvo añadiendo una caperuza a la primera cadena. Se añadió la caperuza a la primera cadena mediante la adición de 100  $\mu$ l de AB 1X (acetato de magnesio 50 mM, tricina 250 mM), polimerasa BST 1.000 unidades/ml, proteína ligante de ADN monocatenario 0,4 mg/ml, DTT 1 mM, PVP 0,4 mg/ml (polivinilpirrolidona), 10  $\mu$ M de cada ddNTP y 2,5  $\mu$ M de cada dNTP. A continuación, se hizo fluir apirasa sobre la placa para eliminar el exceso de nucleótidos mediante la adición de AB 1X, PVP 0,4 mg/ml, DTT 1 mM, BSA 0,1 mg/ml, 0,125 unidades/ml de apirasa y se incubó durante 20 minutos.

65

## ES 2 330 339 T3

### Ejemplo 23

#### *Preparación de la segunda cadena para la secuenciación*

5 Se desbloqueó la segunda cadena mediante la adición de 100  $\mu$ l de AB 1 X, 0,1 unidad por ml de polinucleótido quinasa, DTT 5 mM. El molde resultante se secuenció utilizando secuenciación a partir de pirofosfato estándar (descrita, por ejemplo, en las patentes US 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

10 Los resultados del método de secuenciación pueden observarse en la figura 10F, en la que se secuenció un fragmento de 174 pb en ambos extremos utilizando la secuenciación a partir de pirofosfato y los métodos descritos en los presentes ejemplos.

### Ejemplo 24

#### *Análisis de secuencia de ácidos nucleicos en una placa Picotiter*

La placa picotiter que contenía los ácidos nucleicos amplificados tal como se describe en el Ejemplo 2 se introdujo en una cámara de perfusión. A continuación, se administraron en la placa picotiter, sulfurilasa, apirasa y luciferasa.

20 El cebador de secuenciación ceba la síntesis de ADN que se extiende hacia el interior de la inserción que se sospecha que presenta un polimorfismo, tal como se muestra en las figuras 11A a 11D. En primer lugar se extiende el cebador de secuenciación introduciendo en la cámara de perfusión, sucesivamente, una solución de lavado, una ADN polimerasa, y un dTTP, un dGTP, un dCTP o  $\alpha$ -tio-dATP (un análogo de dATP). La sulfurilasa, luciferasa y apirasa, unidos a los extremos convierten en luz detectable cualquier PPi liberado como parte de la reacción de secuenciación. 25 La apirasa presente degrada cualquier dNTP no reaccionado. Típicamente se permite la acumulación de luz durante 3 segundos (aunque también resultan adecuados periodos de 1 a 100 segundos, por ejemplo 2 a 10 segundos) por parte de una cámara CCD conectada a un haz de fibras formador de imágenes, después de lo cual se añade solución de lavado adicional a la cámara de perfusión para eliminar el exceso de nucleótidos y de productos secundarios. Seguidamente se añade el siguiente nucleótido, conjuntamente con polimerasa, repitiendo de esta manera el ciclo.

30 Durante el lavado, se transfiere la imagen de luz recogida desde la cámara CCD hasta un ordenador. La emisión de luz se analiza con un ordenador y se utiliza para determinar si el dNTP correspondiente ha sido incorporado en el cebador de secuenciación extendido. La adición de dNTPs y reactivos de secuenciación a partir de pirofosfato se repite hasta obtener la secuencia de la región insertada que contiene el polimorfismo sospechado.

### Ejemplo 25

#### *Amplificación por PCR en placa picotiter*

40 Preparación de placa Picotiter: en una realización adicional, la biblioteca de cadenas únicas unidas a perlas se distribuye sobre la placa picotiter y después el ácido nucleico molde en cada perla se amplifica (utilizando PCR u otra tecnología de amplificación conocida) para generar un número de copia suficiente del molde que genere una señal detectable en los métodos de secuenciación basados en pirofosfato dados a conocer en la presente invención.

### Ejemplo 26

#### *Análisis de secuencia de ácidos nucleicos en una PTP*

50 Los reactivos utilizados para el análisis de secuencia y como controles fueron los cuatro nucleótidos y pirofosfato 0,1  $\mu$ M (PPi) preparados en solución de sustrato. La solución de sustrato se refiere a una mezcla de luciferina 300  $\mu$ M y adenosín-5'-fosfosulfato 4  $\mu$ M, APS, que son los sustratos para la cascada de reacciones que implica PPi, luciferasa y sulfurilasa. El sustrato se preparó en tampón de ensayo. La concentración de PPi utilizada para el ensayo de los enzimas y para determinar el nivel de fondo de reactivos que pasaba a través de la cámara era 0,1  $\mu$ M. La 55 concentración de los nucleótidos, dTTP, dGTP, dCTP era de 6,5  $\mu$ M y la de  $\alpha$ -dATP era de 50  $\mu$ M. Se mezcló cada uno de los nucleótidos con ADN polimerasa Klenow a una concentración de 100 U/ml.

60 La PTP se introdujo en la cámara de flujo del instrumento incorporado, y la cámara de flujo se unió a la placa frontal de la cámara CCD. La PTP se lavó haciendo fluir sustrato (3 ml por minuto, 2 minutos) a través de la cámara. A continuación, se hizo fluir una secuencia de reactivos a través de la cámara utilizando una bomba conectada a un accionador, el cual se había programado para modificar su posición, que presentaba tubos insertados en diferentes reactivos. Se determinó la secuencia de reactivos, los caudales y los tiempos de flujo. La cámara se ajustó en un modo de adquisición rápido, con un tiempo de exposición de 2,5 s.

65 Se determinó la señal de salida procedente del panel como la media de los recuentos en todos los píxeles dentro del panel. El número de imágenes era equivalente al tiempo transcurrido durante el experimento. Se utilizaron gráficos para representar el flujo de los diferentes reactivos.

## Ejemplo 27

*Plataforma de base placa para reacciones de PCR a escala de microlitro*5 *Materiales y métodos*

A menos que se indique lo contrario, se adquirieron todos los compuestos químicos de laboratorio comunes de Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MI) o de Fisher (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

- 10 Las placas PicoTiterPlate™ (25 x 75 x 2 mm) se fabricaron mediante grabado anisotrópico de placas frontales de fibra óptica de una manera similar a la descrita anteriormente (Pantano, P. Y Walt, D.R., Chemistry of Materials 8, 2832-2835, 1996). Las placas se grabaron en tres profundidades de micropocillo diferentes: 26, 50 y 76  $\mu\text{m}$ . La anchura centro a centro de los micropocillos era de 50  $\mu\text{m}$ , y los diámetros de pocillo estaban comprendidos entre 39 y 44  $\mu\text{m}$  (ver la figura 14), con una densidad calculada de pocillos de 480 pocillos/mm<sup>2</sup>.

- 15 Inmovilización en fase sólida de cebadores oligonucleótidos: se extrajeron perlas empaquetadas de una columna de afinidad HP de NHS-sefaroza activada de 1 ml (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se activaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia, protocolo n° 71700600AP). Se unieron a las perlas veinticinco microlitros de un cebador de captura HEG marcado con amina 1 mM (5'-amina-3-espaciadores de hexaetilenglicol ccactgttgctgcgtgctgc-3', SEC ID NO:23) (IDT Technologies, Coralville, IA) en tampón fosfato 20 mM, pH 8,0. A continuación, se seleccionaron perlas de 36 a 25  $\mu\text{m}$  mediante pase en serie a través de secciones de malla de filtro de tamaño de poro comprendido entre 36 y 25  $\mu\text{m}$  (Sefar America, Depew, NY). Las perlas de captura de ADN que pasaron a través del primer filtro, pero que resultaron retenidas por el segundo se recogieron en tampón de almacenamiento de perlas (Tris 50 mM, Tween al 0,02%, azida sódica al 0,02%, pH 8), se cuantificaron con un hemocitómetro 25 (Hausser Scientific, Horsham, PA) y se almacenaron a 4°C hasta la utilización.

- Generación de fragmentos de ADN de ensayo: se derivaron fragmentos de ensayo de amplificación a partir de un vector adenovirus de serotipo 5 disponible comercialmente, pAdEasy (Stratagene, La Jolla, CA). Los fragmentos se amplificaron utilizando cebadores para PCR bipartitos, el extremo 5' de los cuales contenía una región de amplifi- 30 cación de 20 bases y una sección 3' de 20 bases, complementaria a una región específica del genoma del adenovirus. Utilizando estos cebadores, se amplificaron dos fragmentos procedentes de las posiciones 12933-13070 y 5659-5767 del genoma del adenovirus y se asignaron los nombres Fragmento A y Fragmento B, respectivamente.

- Las secuencias de los cebadores directo e inverso para el Fragmento A se proporcionan a continuación. Una barra (/) indica la separación entre las dos regiones del cebador: directo (5'-cgtttccctgtgtgccttg/catctgtccactaggctct-3', SEC ID NO:24-SEC ID NO:25) e inverso (5'-ccatctgttgctgcgtgctc/cccgagcagacgcag-3', SEC ID NO:30-SEC ID NO:31).

- Entre las condiciones de reacción se incluían: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), Triton-X-100 al 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, 1  $\mu\text{M}$  de cada cebador directo e inverso, 0,1 U/ $\mu\text{l}$  de Taq (Promega, Madison, WI) y 50 40 nmol de ADN molde. Se amplificaron ambos moldes con un programa de PCR que incluía 35 ciclos de incubación a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos. Utilizando los cebadores de PCR, la longitud total de los fragmentos amplificados fue de 178 pb para el fragmento A y de 148 pb para el fragmento B.

- Para generar sondas fluorescentes, se prepararon sondas fluorescentes bicatenarias biotiniladas mediante amplifi- 45 cación por PCR a partir del vector pAdEasy tal como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, se modificaron las secuencias de cebador para impedir la hibridación entre el fragmento de ensayo y regiones de cebador de la sonda. Además, los cebadores inversos para ambos fragmentos utilizaban una biotina 5' seguida de 3X espaciadores hexaetilenglicol para permitir la inmovilización de producto en las perlas antes de la elución de la sonda monocatenaria.

- 50 La secuencia del cebador directo para la sonda fluorescente del Fragmento A se proporciona a continuación. Una barra (/) indica la separación entre las dos regiones del cebador (5'-atctctgcctactaaccatgaag/catctgtccactaggctct-3', SEC ID NO:32-SEC ID NO:33). La secuencia del cebador inverso era 5'-biotín-3X espaciadores hexaetilenglicol-gtttctccagcctctcaccga/accagcactgcaccacc-3', SEC ID NO:34-SEC ID NO:35. Los cebadores para el Fragmento B eran los siguientes: directo (5'-atctctgcctactaaccatgaag/tacctctcgcgtaggcg-3', SEC ID NO:36-SEC ID NO:37) e 55 inverso (5'-biotín-3X espaciadores hexaetilenglicol-gtttctccagcctctcaccga/cccgagcagacgcag-3', SEC ID NO:38-SEC ID NO:39).

- Se incorporaron grupos fluorescentes en la mezcla de nucleótidos. Ésta incluía: dATP/dGTP/dCTP 0,2 mM, TTP 0,15 mM y Alexa Fluor 488-dUTP 0,05 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) para el Fragmento A. Alternativa- 60 mente se utilizó dATP/dGTP/TTP 0,2 mM, dCTP 0,15 mM y Alexa Fluor 647-dCTP 0,05 mM (Molecular Probes, Eugene, OR) para amplificar el Fragmento B. Los productos fluorescentes se purificaron con un kit de purificación QIAquick para PCR (Qiagen, Valencia, CA). El ADN biotinilado posteriormente se unió a 100  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 8,1 millones) de perlas de alto rendimiento de sefaroza con estreptavidina (Amersham Biosciences) en tampón 1X de unión/lavado (Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 0,5 mM, Tween-20 al 0,05%) durante 2 horas a temperatura 65 ambiente. Tras la incubación, las perlas se lavaron tres veces en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se incubaron con 250  $\mu\text{l}$  de solución de fusión (NaOH 0,125 N/NaCl 0,1 M) durante 2 minutos, liberando la sonda monocatenaria de las perlas.

## ES 2 330 339 T3

Las perlas se peletizaron con una centrifugación breve en una centrífuga de laboratorio y el sobrenadante se neutralizó en 1,25 ml de tampón PB (Qiagen) con 1,9  $\mu$ l de ácido acético glacial. Esta mezcla se purificó nuevamente en una columna QiaQuick (Qiagen) y se determinó la concentración de la sonda purificada mediante cuantificación TaqMan utilizando el termociclador iCycler de BioRad (BioRad, Hercules, CA).

Se llevó a cabo la PCR-PT en fase solución de la manera siguiente. La mezcla de reacción de PCR se cargó en pocillos individuales de una única placa PicoTiterPlate™ de 14 mm x 43 mm. Para ello, se agruparon en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, 500  $\mu$ l de mezcla de reacción de PCR (tampón HiFi Platinum 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA), MgSO<sub>4</sub> 2, 5 mM, BSA al 0,5%, dNTPs 1 mM (MBI Fermentas, Hanover, MD), cebadores directo (5'-cgtttccctgtgtgccttg-3', SEC ID NO:40) e inverso (5'-ccatctgttgctgcgtgctc-3', SEC ID NO:41) 1  $\mu$ M, Tween-80 al 0,05%, ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum 1 U/ $\mu$ l (Invitrogen), pirofosfatasa termoestable 0,003 U/ $\mu$ l (USB, Cleveland, OH) y 5 copias de Fragmento B de molde calculadas para cada pocillo). El tubo se agitó con vórtex uniformemente y se almacenó en hielo hasta el ensamblaje del cartucho de carga PicoTiterPlate™.

El cartucho de carga PicoTiterPlate™ propio se incorporó en la placa PicoTiterPlate™ con dos clips de plástico, asentando firmemente la junta del cartucho de silicio sobre la superficie de la placa PicoTiterPlate™ (ver la figura 20). Se aspiró la mezcla de reacción de PCR en una jeringa desechable de 1 ml y se insertó la punta de la jeringa en el tubo de introducción del cartucho de carga. Se situó el cartucho de carga en posición vertical, de manera que la abertura de introducción se encontrase orientada hacia el fondo del cartucho, y se cargó lentamente la mezcla para PCR en la cámara. Se controló visualmente la carga, a través de la parte posterior transparente de la placa PicoTiterPlate™, para garantizar la administración uniforme y libre de burbujas.

Tras la carga, se dejó que la mezcla para PCR incubase durante 5 minutos, después de lo cual se extrajo la mezcla de reacción del cartucho de carga PicoTiterPlate™. Se extrajo la placa PicoTiterPlate™ del cartucho de carga y se introdujo inmediatamente en la cámara de amplificación (ver la figura 21). La superficie de la placa PicoTiterPlate™ se recubrió con una película de silicio Silpad A-2000 de 0,25 mm de grosor (The Bergquist Company, Chanhassen, MN). En la parte superior de la película se colocó un portaobjetos de vidrio estándar de microscopía de 25 mm x 75 mm (Fisher). Sobre el portaobjetos de microscopía se colocó una almohadilla aislante de espuma de celda cerrada (Wicks Aircraft Supply, Highland, IL). Se fijó una tapa de aluminio a la base de la cámara con 6 garras de 25 mm, sellando la cámara de amplificación.

Tras el sellado, la cámara de amplificación se introdujo en un termociclador MJ PTC 225 Tetrad (MJ Research, Waltham, MA) dotado de unidades Alfa Flat Block. El programa de amplificación incluía la incubación durante 3 minutos a 94°C (inicio en caliente), seguido de 40 ciclos de incubación de 12 segundos a 94°C, 12 segundos a 58°C, 12 segundos a 68°C, con un periodo de mantenimiento final a 10°C. Tras completar el programa de PCR, se extrajo la placa PicoTiterPlate™ de la cámara de amplificación y se conectó nuevamente el cartucho de carga. Se utilizó una jeringa desechable para rellenar la cámara del cartucho con 1 ml de H<sub>2</sub>O y se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Tras completar la incubación, se extrajo la solución de recuperación del cartucho de carga y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El producto de PCR se cuantificó utilizando una unidad de PCR iCycler en tiempo real (BioRad) y sondas informadoras marcadas con FAM (Epoch Biosciences, Bothell, WA). La mezcla madre para PCR universal TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) se combinó con cebadores directo e inverso 0,3  $\mu$ M, sonda marcada con FAM 0,15  $\mu$ M y se añadieron 27  $\mu$ l de la mezcla de reacción a cada pocillo de una placa para PCR de 96 pocillos.

Se utilizaron fragmentos purificados para crear una curva de estándares (seis estándares comprendidos entre 1X10<sup>9</sup> y 1x10<sup>14</sup> moléculas por pocillo), que se corrió por triplicado. La amplificación por PCR se corrió con los parámetros siguientes: incubación durante 5 minutos a 94°C (inicio en caliente), 60 ciclos de incubación durante 15 segundos a 94°C, 45 segundos a 68°C, con un periodo de mantenimiento final a 4°C. Los datos se analizaron utilizando el software iCycler Optical Systems versión 2.3 (BioRad) y el rendimiento de la PCR se cuantificó utilizando los datos del iCycler y Excel de Microsoft (Microsoft, Redmond, WA).

Se llevó a cabo PCR-PT en fase sólida de manera similar a la PCR-PT en fase solución, excepto en que las perlas de captura de ADN se cargaron en los pocillos de la placa PicoTiterPlate™ antes de la amplificación mediante centrifugación tal como se indica posteriormente. Además, la mezcla para PCR se cargó en los micropocillos tras completar la deposición sobre las perlas. Para facilitar la retención de las perlas de captura durante las etapas de lavado, los experimentos en fase sólida utilizaron placas PicoTiterPlate™ de 50  $\mu$ m de profundidad. La placa PicoTiterPlate™ se introdujo en un dispositivo de carga de perlas de plexiglas construida por los presentes inventores. Este dispositivo era similar al dispositivo de carga de la placa PicoTiterPlate™ descrita en la figura 20, excepto en que la placa PicoTiterPlate™ se interpuso entre una placa de fondo de plexiglass y una placa superior del dispositivo, que contenía aberturas de introducción y de salida, y sellada mediante una junta de silicona con tornillos de plástico.

Se pre-hibridó ADN de molde con las perlas de captura de ADN a razón de 5 copias de molde por perla mediante incubación a 80°C durante 3 minutos, después de lo cual las perlas se dejaron enfriar hasta la temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las perlas se centrifugaron introduciéndolas en los pocillos de la placa PicoTiterPlate™ antes de la carga de la mezcla de reacción de PCR. Un tampón de carga de perlas (450  $\mu$ l, tampón 1X para PCR Platinum HiFi (Invitrogen), Tween-80 al 0,02%) que contenía cien mil perlas de captura de ADN de



sefarosa (aproximadamente 1 perla por cada 3 pocillos de la placa PicoTiterPlate™) se inyectó, utilizando una pipeta, en el dispositivo a través de una de las aberturas de introducción. A continuación, se selló cada orificio de entrada con una almohadilla adhesiva circular (3M VHS, St. Paul, MN). El dispositivo sostenía la placa PicoTiterPlate™ con los pocillos de la misma encarados hacia arriba y cubiertos con la suspensión de perlas. Ésta se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Allegra 6 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) utilizando una centrífuga de placas de microtitulación.

Tras la centrifugación, se extrajo la placa PicoTiterPlate™ del dispositivo. Se cargó la mezcla de reacción de PCR sobre la placa PicoTiterPlate™ tal como se ha descrito para la PCR en fase solución. Sin embargo, la mezcla para PCR en fase sólida omitía el molde, debido a que el molde se había prehibridado con las perlas de captura de ADN. El programa de amplificación por PCR en fase sólida incluía ciclos adicionales de hibridación/extensión para compensar la cinética más lenta del cebador inmovilizado. El programa incluía la incubación durante 3 minutos a 94°C para el inicio en caliente, 40 ciclos de incubación durante 12 segundos a 94°C, 12 segundos a 58°C, 12 segundos a 68°C, seguido de 10 ciclos de incubación durante 12 segundos a 94°C, 10 minutos a 68°C para la hibridación y extensión, con un periodo de mantenimiento final a 10°C.

Tras completar el programa de la PCR, se extrajeron las placas PicoTiterPlate™ de la cámara de amplificación y se lavaron con 1 ml de H<sub>2</sub>O tal como se ha descrito para la PCR en fase solución. A continuación, se preparó la placa PicoTiterPlate™ para la detección de hibridación del producto de PCR inmovilizado.

Se llevó a cabo la hibridación con sondas marcadas fluorescentemente de la manera siguiente. Tras completar la PCR-PT, se extrajo la cadena que era complementaria a la cadena inmovilizada. Para ello, la placa PicoTiterPlate™ completa se incubó en NaOH 0,125 M durante 8 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se neutralizó con dos lavados de 5 minutos en 50 ml de Tris-acetato 20 mM, pH 7,5. A continuación, se introdujo la placa PicoTiterPlate™ en una cámara de hibridación de 800 µl construida al efecto, y se bloqueó con tampón de hibridación (3,5XSSC, SDS al 3,0%, el tampón 20X SSC era NaCl 3 M; Na<sub>3</sub>-citrato 0,3 M) a 65°C durante 30 minutos. Se sustituyó el contenido de la cámara por tampón de hibridación fresco que contenía las sondas: Fragmento A fluorescente 20 nM (Alexa-488) y Fragmento B (Alexa-647). Se dejó que las sondas se hibridasen a sus dianas. Se llevó a cabo la incubación a 65°C durante 4 horas bajo agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Barnstead International, Dubuque, IA).

Tras la hibridación, la placa PicoTiterPlate™ se lavó con 2XSSC, SDS al 0,1% durante 15 minutos a 37°C, seguido de un lavado de 15 minutos en 1XSSC a 37°C, con dos lavados finales de 15 minutos en 0,2XSSC a 37°C. Tras el lavado post-hibridación, las placas PicoTiterPlate™ se secaron al aire y se introdujeron en un analizador de imágenes fluorescentes FLA-8000 (Fujifilm Medical Systems USA, Stamford, CT) y se escanearon a longitudes de onda de 635 y 473 nm. Las imágenes tiff de 16-bit resultantes se importaron en Genepix 4.0 (Axon Instruments, Union City, CA). Se extrajo un bloque de 100 puntos de análisis en el área de interés y se registraron las intensidades de fluorescencia a 635 nm y a 473 nm en cada uno de dichos puntos. A continuación, los datos se exportaron a Excel de Microsoft para el análisis posterior.

Se prepararon perlas de control de la manera siguiente. Se prepararon moldes A y B de ensayo biotinilados mediante amplificación por PCR a partir del vector pAdEasy, se purificaron y se inmovilizaron sobre perlas de alto rendimiento de sefarosa con estreptavidina y se separaron las cadenas tal como se ha descrito en la sección titulada "Preparación de sondas fluorescentes". Sin embargo, los dNTPs marcados fluorescentemente se omitieron en la reacción de PCR. Las perlas peletizadas se lavaron 3 veces con tampón TE y se almacenaron a 4°C en TE hasta la deposición sobre la placa PicoTiterPlate™.

## Resultados

Se demostró la amplificación en fase solución mediante la carga de placas PicoTiterPlate con mezcla madre para PCR que contenía 5 copias de molde calculadas para cada pocillo de la placa PicoTiterPlate™. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en placas PicoTiterPlate con pocillos de 26, 50 y 76 µm de profundidad. Se llevaron a cabo cuarenta ciclos de amplificación por PCR-PT tal como se ha descrito en Materiales y métodos. Se incorporaron aditivos para evitar los efectos deletéreos en superficie informados rutinariamente con los recipientes de reacción de sílice (Kalinina O. *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:1999-2004, 1997, Wittwer C.T. y Garling D.J., Biotechniques 10:76-83, 1991, Taylor T.B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3164-3168, 1997).

La inclusión de BSA al 0,5% y Tween-80 al 0,05% en la mezcla de reacción no sólo resultó efectiva para reducir los efectos en superficie, sino que también facilitó la amplificación. La reducción de las concentraciones relativas de cualquiera de los reactivos presentó un efecto negativo sobre la amplificación. Además, debido a las propiedades inactivadoras de polimerasa de las superficies de sílice (Taylor T.B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3164-3168, 1997; Shoffner M.A., Cheng J., Hvieh G.E., Kricka L.J. y Wilding, P., Nucleic Acids Res. 24:375-379, 1996), las concentraciones elevadas de Taq demostraron ser beneficiosas. Las concentraciones superiores a 1 U/µl resultaron óptimas para incrementar el rendimiento de amplificación.

Tras la PCR-PT, la solución de cada placa PicoTiterPlate™ se recuperó y se cuantificaron muestras por triplicado de cada solución mediante un ensayo TaqMan. Se utilizó una curva de estándares de diluciones de molde (lineal de 1x10<sup>9</sup> a 10<sup>4</sup> moléculas, r<sup>2</sup>=0,995) para determinar la concentración del producto amplificado. Se obtuvo el número de

## ES 2 330 339 T3

moléculas amplificadas por pocillo dividiendo la cantidad de producto amplificado por el número total de pocillos en una placa PicoTiterPlate™ (372.380). Se calculó la cantidad de amplificación por pocillo dividiendo dicho número por la concentración inicial de molde por pocillo. La amplificación por PCR-PT resultó exitosa en todas las placas PicoTiterPlate™, con rendimientos comprendidos entre  $2,36 \times 10^6$  veces en los pocillos de 39,5 pL y  $1,28 \times 10^9$  veces en los pocillos de 50 pL (ver la Tabla, a continuación).

Profundidad de la placa PicoTiterPlate [pm]	Volumen de pocillo [pL]	Factor de amplificación medio (N=6)	SD del factor de amplificación	Concentración del producto final [M]
26	39,5	$2,36 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$	$4,96 \times 10^{-7}$
50	76,0	$1,28 \times 10^9$	$1,03 \times 10^8$	$1,40 \times 10^{-4}$
76	115,6	$9,10 \times 10^8$	$4,95 \times 10^8$	$6,54 \times 10^{-5}$

La tabla muestra la amplificación por PCR de placas PicoTiterPlate™ según se determinó mediante ensayo Taq-Man. Los valores son de mediciones por triplicado obtenidas de placas PicoTiterPlate por duplicado (N=6); SD=desviación estándar.

El rendimiento se vio influido por el volumen de pocillo. La concentración de producto final obtenido para los pocillos de 50  $\mu\text{m}$  de profundidad ( $1,4 \times 10^{-4}$  M) fue significativamente mayor (valor de p para la ANOVA=0,023) que la obtenida en los pocillos de 76  $\mu\text{m}$  de profundidad ( $6,54 \times 10^{-5}$  M); ambos eran dos órdenes de magnitud superiores al rendimiento conseguido en los pocillos de 26  $\mu\text{m}$  de profundidad ( $4,96 \times 10^{-7}$  M). El rendimiento de los micropocillos de 50  $\mu\text{m}$  de profundidad representaba el equilibrio óptimo entre los costes y los beneficios asociados a la PCR de volumen bajo. En este caso, se obtuvo una elevación máxima de las concentraciones efectivas y una masa térmica reducida de los reactivos, aunque la proporción de superficie a volumen todavía era suficientemente reducida para evitar que los efectos perjudiciales en superficie redujesen significativamente la eficiencia de amplificación.

La concentración de producto de PCR-PT obtenida en cada una de las diferentes profundidades de pocillos ( $4,96 \times 10^{-7}$  a  $1,4 \times 10^{-4}$  M) superaba la concentración de  $10^{-8}$  M informada típicamente como la máxima alcanzable antes de producirse el efecto de saturación de la PCR (Sardelli A., Amplifications 9:1-5, 1993). Las concentraciones efectivas más altas de cebadores y moléculas de molde resultantes del reducido volumen de micropocillo incrementaron la eficiencia global de la reacción y retrasaron la aparición de la fase de saturación hasta conseguir un rendimiento molar más alto. Alternativamente, este efecto estaba provocado por la concentración elevada de Taq utilizada en las reacciones de PCR-PT, debido a que la concentración elevada de polimerasa también se ha demostrado que resulta efectiva para retrasar el efecto de saturación (Kainz P., Biochim. Biophys. Acta 1494:23-27, 2000; Collins F.S. *et al.*, Science 300:286-290, 2003). La eficiencia de amplificación durante 40 ciclos fue de 44,3%, 68,9% y 67,5% para los pocillos de 26, 50 y 76  $\mu\text{m}$  de profundidad, respectivamente, proporcionando una concentración final elevada de amplicones. El rendimiento más alto se observó en los pocillos de 50  $\mu\text{m}$  de profundidad. Sin embargo, debe reconocerse que no se llevó a cabo una optimización del número de ciclos; probablemente podrían haberse conseguido rendimientos de amplificación similares con muchos menos ciclos, incrementando de esta manera la eficiencia de la amplificación por PCR-PT.

La estrategia experimental para la PCR-PT en fase sólida clonal, partiendo de una única copia efectiva de un fragmento de ADN monocatenario, y acabando con un amplicón de ADN específico inmovilizado en una perla detectada mediante hibridación con sonda fluorescente, se ilustra en la figura 22 y se describe en detalle a continuación:

- Etapa 1: cada pocillo de placa PicoTiterPlate™ contiene una mezcla de reacción de PCR que consiste de una molécula de molde monocatenario (monocatenario e hibridado a las perlas de captura de ADN, tal como se muestra en la presente memoria, o flotando libremente en solución), cebadores directo "F" (rojo) e inverso "R" (azul) en solución, así como cebadores R unidos a una perla de captura de ADN. Los cebadores en fase solución se encuentran presentes en una proporción molar de 8:1, con el cebador F en exceso. Las flechas indican la orientación 5'  $\rightarrow$  3' del ADN.
- Etapa 2: el ciclo térmico inicial desnatura el ADN molde, permitiendo que los cebadores R en solución se unan a la región complementaria en la molécula de molde. Las polimerasas termoestables inician la elongación en el sitio del cebador (línea discontinua) y en ciclos posteriores se produce la amplificación exponencial en fase solución. Los cebadores inmovilizados en perlas no se cree que sean los contribuyentes principales de la amplificación en esta etapa.
- Etapa 3: PCR de fase temprana durante la amplificación exponencial temprana (1 a 10 ciclos). Los cebadores tanto F como R amplifican el molde igualmente, a pesar del exceso de cebadores F en solución.
- Etapa 4: PCR de fase intermedia. Entre los ciclos 10 y 30, se han agotado los cebadores R, deteniendo la amplificación exponencial. A continuación, la reacción entra en una etapa de amplificación asimétrica, y la población de amplicones se encuentra crecientemente dominada por cadenas F.

## ES 2 330 339 T3

Etapa 5: PCR de fase tardía. Tras 30 a 40 ciclos, la amplificación asimétrica continúa incrementando la concentración de cadenas F en solución. El exceso de cadenas F, sin los complementos de cadena R, inician la hibridación con los cebadores R inmovilizados en perlas. Las polimerasas termoestables utilizan la cadena F como molde para sintetizar una cadena R inmovilizada del amplicón.

Etapa 6: PCR de fase final. El ciclado térmico continuo fuerza la hibridación adicional con cebadores unidos a perlas. La amplificación en fase solución puede ser mínima en esta etapa, pero la concentración de cadenas R inmovilizadas continúa incrementándose.

Etapa 7: la cadena F, no inmovilizada, complementaria a la cadena R inmovilizada, se elimina mediante desnaturalización alcalina. Las perlas de captura de ADN ahora presentan cadenas R separadas del amplicón.

Etapa 8: se hibridan con la cadena inmovilizada sondas marcadas fluorescentemente (columnas verdes) complementarias a la cadena R. Se marcan con fluoróforos únicos, sondas específicas para secuencias particulares de la cadena, resultando en un abanico de señales fluorescentes homogéneas y heterogéneas, dependiendo del número de moldes discretos amplificados dentro de un pocillo dado de la placa PicoTiterPlate™.

Inicialmente, se confirmó la especificidad de la sonda marcada fluorescentemente mediante la unión de fragmentos de ADN de ensayo de Fragmento A o de Fragmento B biotinilados a perlas de sefarosa con estreptavidina, cargando las perlas en una placa PicoTiterPlate™ de 50  $\mu\text{m}$  de profundidad mediante centrifugación e hibridando una población mixta de sondas marcadas fluorescentemente para los fragmentos de Fragmento A y de Fragmento B. No se observaron señales mixtas o hibridaciones no específicas: las perlas con el producto del Fragmento A mostraron la señal de 488 nm, mientras que las perlas con Fragmento B mostraron la señal de 635 nm (ver las figuras 23A y 23B). El examen detallado de las figuras 23A y 23B revela unas cuantas perlas con Fragmento A en el panel de Fragmento B, y viceversa. Dada la pureza de la señal mostrada por estas perlas nómadas, resulta probable que sean el producto de cierta contaminación cruzada durante el procedimiento de carga, o que fueron lavadas de un panel a otro durante las etapas de lavado posteriores.

Tal como se indica en la figura 23C, las sondas fluorescentes detectaron la amplificación por PCR-PT en fase sólida exitosa de moldes tanto de Fragmento A como de Fragmento B. Las señales generadas por la sonda hibridada dependían de la eficiencia relativa de la incorporación del pigmento en las sondas, de la sensibilidad de las reacciones a cantidades desiguales de ADN molde, así como de las cantidades total y relativa de producto amplificado presente sobre cada perla. Además, resulta probable que la cantidad de molde generado y retenido sobre las perlas de captura de ADN variase de pocillo a pocillo, y el número de cebadores de captura unido a cada perla también es probable que variase debido a la distribución de tamaños de las perlas. Como resultado, las proporciones no normalizadas generadas por la hibridación de la sonda deben interpretarse como semicualitativas y no como datos cuantitativos. Sin embargo, las señales fluorescentes generadas por las sondas hibridadas se encontraban comprendidas entre una señal homogénea de Fragmento B (roja) y una señal igualmente homogénea de Fragmento A (verde), asimismo siendo evidentes las mezclas heterogéneas de las dos señales (grados de amarillo).

Debido a la especificidad de sonda mostrada por los controles, así como el considerable número de perlas rojas y verdes homogéneas sobre la placa PicoTiterPlate™, resulta improbable que la hibridación no específica de la sonda cause las señales heterogéneas. La estrecha proximidad de las perlas homogéneas de ambos tipos de molde sugiere que resulta improbable que las perlas heterogéneas sean la consecuencia de la fuga de amplicones entre pocillos durante la amplificación; si la comunicación entre tipos de perla dentro de cada pocillo fuera responsable, previsiblemente se observarían perlas heterogéneas localizadas entre perlas homogéneas de ambos moldes y una distribución generalmente irregular de señales homogéneas. Por el contrario, resulta probable que las moléculas de molde se disociasen de su perla original y se hibridasen nuevamente con otras perlas en la mezcla de carga de la placa PicoTiterPlate™ antes de la centrifugación para introducir las en los micropocillos, o que se lavasen de una perla a otra al aplicar la mezcla para PCR en la placa PicoTiterPlate™. Con independencia de la causa de la mezcla de tipos de molde en las perlas, los resultados de la hibridación demuestran que la amplificación por PCR en los micropocillos de la placa PicoTiterPlate™ pueden dirigir suficiente producto a las perlas de captura de ADN para permitir la hibridación y detección de la sonda fluorescente.

### Comentario

Los resultados en el presente ejemplo demuestran que la PCR basada en una placa PicoTiterPlate™ alivia muchos factores asociados al procedimiento de amplificación de ADN, tales como costes elevados de reactivos, un gran número de reacciones y tiempos de reacción prolongados, proporcionando otro “salto evolutivo” en la tecnología de PCR. Los micropocillos en una única placa PicoTiterPlate™ pueden funcionar igual que 370.000 recipientes de reacción discretos, consiguiendo una amplificación de alto rendimiento ( $2,3 \times 10^6$  a  $1,2 \times 10^9$  veces) incluso con volúmenes de reacción de tan sólo 39,5 picolitros. Como resultado, se incrementa la salida de producto y se reduce el coste total de los reactivos para la PCR-PT; el volumen de reacción contenido en una placa entera PicoTiterPlate™ de 26 ó 76  $\mu\text{m}$  de profundidad es de 15,3 y 43  $\mu\text{l}$ , respectivamente. Los incrementos del tamaño de la placa PicoTiterPlate™

pueden incrementar adicionalmente la salida máxima de producto. Por ejemplo, el incremento de las dimensiones de la placa PicoTiterPlate™ a 40 mm x 75 mm proporciona aproximadamente  $1,4 \times 10^6$  recipientes de reacción discretos, y una placa PicoTiterPlate™ que presente las mismas dimensiones de perímetro que la placa para PCR de 96 pocillos disponible comercialmente (85,47 mm x 127,81 mm) podría contener hasta  $5,24 \times 10^6$  pocillos.

Las amplificaciones por PCR en fase solución, con independencia del número y volumen en el que se llevan a cabo, resultan de utilidad limitada a menos que pueda recuperarse el producto de manera fácil y eficiente. Los esfuerzos anteriores en la PCR en paralelo (Nagai H. *Et al.*, Anal. Chem. 73:1043-1047, 2001) requieren la evaporación de la mezcla de reacción líquida, dejando el amplicón seco contra las paredes del microrreactor, después de lo cual puede recuperarse para manipulaciones posteriores. La metodología dada a conocer en la presente invención evita los problemas de recuperación del producto mediante la inclusión de la amplificación en fase sólida, inmovilizando el producto de PCR en perlas de captura de ADN. De esta manera, el producto de una reacción en micropocillo de placa PicoTiterPlate™ no son 370.000 pocillos que contienen producto de PCR en fase solución, sino hasta 370.000 perlas con producto PCR inmovilizado unido a las mismas. Estos productos de PCR resultan adecuados para numerosos métodos en fase sólida de interrogación de ácidos nucleicos, incluyendo la capacidad potencial de dar soporte a un enfoque masivamente en paralelo a la secuenciación de genomas completos que contienen hasta cientos de millones de bases. La simplicidad del método dado a conocer podría reducir drásticamente los costes de secuenciación y de otras aplicaciones que ahora requieren robótica para mantener la clonación y PCR a gran escala.

Las descripciones de una o más realizaciones de la invención se proporcionan en la descripción adjunta. Aunque pueden utilizarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes. Resultarán evidentes otras características, objetivos y ventajas de la invención a partir de la descripción y las reivindicaciones. En la especificación y reivindicaciones adjuntas, entre las formas singulares se incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, la totalidad de los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. A menos que se indique expresamente lo contrario, las técnicas utilizadas o contempladas en la presente invención son metodologías estándares bien conocidas por el experto ordinario en la materia. Los ejemplos de realizaciones se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

## Ejemplo 28

### *Método de secuenciación en soporte*

#### Etapa 1

#### *Preparación de perlas de ADN para PCR con pAdEasy*

Se utilizó el presente procedimiento para una placa de 384 pocillos para PCR de clones de adenovirus. Se prepararon perlas de estreptavidina-sefarosa (12 ml) para la unión de fragmentos para PCR mediante el lavado una vez con solución de NaCl 2 M y la resuspensión en 288 ml de NaCl 2 M. Las perlas lavadas se transfirieron a quince placas de 96 pocillos a razón de 200  $\mu$ l de suspensión de perlas/pocillo. Los productos de PCR (25  $\mu$ l) se transfirieron a una placa de 384 pocillos profundos utilizando un robot Tecan TeMo. Para unir el ADN a los soportes sólidos, se añadieron 25  $\mu$ l de suspensión de perlas (15.000 perlas) a cada pocillo de cada placa de 384 pocillos profundos utilizando un robot Tecan TeMo y se mezclaron. La concentración final de NaCl en la reacción de unión era de 1 M. Se incubó la reacción de unión bajo agitación a temperatura ambiente durante 3 horas en un agitador. Se agrupó el contenido de las placas de microtitulación mediante inversión de las placas de 384 pocillos sobre un reservorio y se centrifugó a 1.000g en una centrifuga de laboratorio Beckman Allegra. Las perlas agrupadas se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml, se centrifugaron a 1.000g y se separó el sobrenadante.

Aproximadamente un millón de perlas (soporte sólido móvil) se lavaron una vez con 100  $\mu$ l de NaCl 2 M, seguido de dos lavados con agua destilada (100  $\mu$ l cada lavado). Las perlas lavadas se incubaron en 300  $\mu$ l de reactivo de fusión (NaCl 0,1 M y NaOH 0,125 M) durante 10 minutos en un agitador giratorio para eliminar las cadenas de ADN no biotiniladas. El tubo se centrifugó a velocidad máxima para peletizar las perlas y la solución de fusión se separó y se descartó. Las perlas se lavaron con 100  $\mu$ l de solución de fusión, seguido de tres lavados más con tampón 1X de hibridación. Tras los lavados, las perlas se resuspendieron en 25  $\mu$ l de tampón 1X de hibridación.

Se añadió cebador P2 (500 pmoles) a la mezcla de perlas y se mezcló. La mezcla de perlas, en los tubos, se introdujo en un incubador automático (termociclador PCR en este caso) con los perfiles de temperatura siguientes: incubación a 60°C durante 5 minutos, reducción a 0,1°C/s hasta 50°C, incubación a 50°C durante 5 minutos, reducción a 0,1°C/s hasta 40°C, incubación a 40°C durante 5 minutos, reducción a 0,1°C/s hasta 4°C, incubación a 4°C por tiempo indefinido.

Tras la hibridación, las perlas se lavaron cuidadosamente y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de solución de unión de ADN polimerasa *Bst*. A continuación, se procesaron alícuotas de 10  $\mu$ l (50.000 perlas) de la suspensión de perlas para la secuenciación en el instrumento descrito a continuación.

## ES 2 330 339 T3

### Etapa 2

#### Preparación de perlas con ADN de control

Se clonaron seis secuencias de ADN de control, TF 2, 7, 9, 10, 12 y 15, en vector pBluescript II KS+ y se utilizó plásmido de ADN como molde para la PCR con un cebador biotinilado para la inmovilización en fase sólida de los amplicones.

Se añadieron los reactivos siguientes a un tubo de 1,7 ml para crear una mezcla para PCR.

Tampón 10X HiFi	100 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM	100 µl
MgSO4 50 mM	60 µl
5'-Bio-3HEG-MMP1B	10 µl
MMP1A	100 µl
Polimerasa Taq HIFI	10 µl
Agua de grado para biología molecular	690 µl

Se añadieron veinte microlitros de plásmido de ADN molde y la mezcla se dividió en alícuotas de 50 µl en tubos para PCR de 0,2 ml. Se utilizó el programa siguiente para el termociclado: incubación a 94°C durante 4 minutos, 39 ciclos de incubación a 94°C durante 15 segundos, 58°C durante 30 segundos, 68°C durante 90 segundos y 68°C durante 120 segundos; mantenimiento a 10°C.

Se purificó ADN amplificado para cada fragmento de ensayo utilizando el kit de lavado de PCR Qiagen MinElute siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la pureza y rendimiento de cada uno de los fragmentos de ADN de ensayo utilizando el analizador Agilent 2100 Bioanalyzer y el kit y chip de reactivos DNA 500. Se inmovilizaron los productos de PCR biotinilados en perlas de sefarosa-estreptavidina a razón de 10 millones de copias de ADN/perla.

Las perlas se lavaron una vez con solución de NaCl 2 M. Lo anterior se realizó mediante la adición de 100 µl, agitación breve con vórtex para resuspender las perlas, centrifugación durante 1 minuto a velocidad máxima para peletizar las perlas y después separación del sobrenadante. A continuación se llevó a cabo un segundo lavado con NaCl 2 M. Seguidamente las perlas se resuspendieron en 30 µl de NaCl 2 M. Se añadió el producto de PCR a las perlas. La mezcla se agitó con vórtex para resuspender las perlas en solución y después se introdujo en un rack, en un agitador de placas de titulación, a velocidad 7, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se extrajo la segunda cadena no biotinilada mediante incubación con la solución de fusión alcalina (NaOH 0,1 M/NaCl 0,1 M) durante 10 minutos en un agitador de varilla a temperatura ambiente. A continuación se llevó a cabo un lavado de las perlas una vez con 100 µl de solución de fusión y tres veces con 100 µl de tampón 1X de hibridación (Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Se hibridó el cebador de secuenciación con el ADN monocatenario inmovilizado, mediante centrifugación durante un minuto a velocidad máxima. Se extrajo el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 25 µl de tampón 1X de hibridación. A continuación, se añadieron 5 µl de cebador de secuenciación MMP7A (100 pmoles/µl) a la suspensión de perlas y se utilizó el perfil de temperatura siguiente para hibridar el cebador de secuenciación:

- Incubación a 60°C durante 5 minutos,
- Reducción a 0,1°C/s hasta 50°C,
- Incubación a 50°C durante 5 minutos,
- Reducción a 0,1°C/s hasta 40°C,
- Incubación a 40°C durante 5 minutos,
- Reducción a 0,1°C/s hasta 4°C, y
- Mantenimiento a 4°C.

Las perlas se lavaron dos veces con 100 µl de tampón 1X de hibridación y después se resuspendieron a un volumen final de 200 µl con tampón 1X de hibridación y se almacenaron en alícuotas de 10 µl en tiras de tubos marcadas en una nevera a 4°C.

## ES 2 330 339 T3

### Etapa 3

#### Reacción de secuenciación

5 Se incubaron perlas de sefarosa que presentaban moldes de ADN monocatenario inmovilizado y cebadores de secuenciación hibridados con proteína monocatenaria de unión (pmu) de *E. coli* (Amersham Biosciences) (5  $\mu$ l de solución madre 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de pmu por cada 50.000 perlas) y 500 U (10  $\mu$ l de 50 U/ $\mu$ l) de ADN polimerasa *Bst* (NEB) en 200  $\mu$ l de solución de unión de polimerasa *Bst* (tricina 25 mM, pH 7,8; acetato de magnesio 5 mM; DTT 1 mM; PVP 0,4 mg/ml, de PM=360.000) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador giratorio. A continuación, las  
10 perlas con ADN se mezclaron con las perlas SL y se depositaron en los pocillos de la placa PicoTiterPlate de la manera siguiente. Entre los reactivos necesarios para una operación de secuenciación en un instrumento 454 se incluían: 1) solución de lavado de sustrato, 2) solución de lavado que contiene apirasa, 3) estándar de calibración de pirofosfato inorgánico 100 nM, 4) soluciones individuales de nucleótidos trifosfato.

15 Todas las soluciones se prepararon en un tampón de ensayo de sulfurilasa-luciferasa con sustratos enzimáticos (tricina 25 mM, pH 7,8; acetato de magnesio 5 mM, PVP 0,4 mg/ml de PM=360.000; Tween-20 al 0,01%; D-luciferina 300  $\mu$ M; APS 4  $\mu$ M). La solución de lavado de sustrato era idéntica al tampón de ensayo de luciferasa. La solución de lavado que contenía apirasa se basaba en el tampón de ensayo de luciferasa, excepto en que no se añadieron sustratos enzimáticos (APS y D-luciferina) y este lavado contenía apirasa (Sigma St. Louis, MO; Pyrosequencing AB, 20 Pyrosequencing, Inc., Westborough, MA) a una concentración final de 8,5 U/l.

Se preparó estándar de pirofosfato (PPi) sódico mediante la adición de decahidrato tetrabásico de pirofosfato sódico (Sigma, St. Louis, MO) al tampón de ensayo de luciferasa a una concentración final de 100 nM. Se diluyeron nucleótidos trifosfato (dCTP, dGTP, TTP, de grado difosfato mínimo) (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) a una concentración final de 6,5  $\mu$ M en el tampón de ensayo de luciferasa. Se diluyó el análogo de desoxiadenosina trifosfato, 2'-desoxiadenosina-5'-O-(1-tiotrifosfato), isómero Sp (Sp-dATP- $\alpha$ -S, Biolog Life Science Institute, Bremen, Alemania) a una concentración final de 50  $\mu$ M en el tampón de ensayo de luciferasa.

### 30 Etapa 4

#### Clonación de His6-BCCP-sulfurilasa y de His6-BCCP-luciferasa

Se clonó ATP sulfurilasa de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) (E.C. 2.7.7.4) y luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (E.C. 1.13.12.7) en el vector pRSET-A digerido con *NheI*-*BamHI* (Invitrogen). Se utilizó la secuencia codificante del gen BCCP (proteína portadora de biotina-carboxilo) (Alix J.H., DNA 8(10):779-789, 1989; Muramatsu S. y Mizuno T., Nucleic Acids Res. 17(10):3982, 1989; Jackowski S. y Alix J.H., J. Bacteriol. 172(7):3842-3848, 1990; Li S.J. y Cronan J.E. Jr., J. Biol. Chem. 267(2):855-863, 1992, número de acceso de Genbank M80458, para diseñar cebadores de PCR para la amplificación del fragmento correspondiente a los aminoácidos 87 a 165 de la proteína BCCP. El cebador directo era 5'-ctagctagcatggaagcgccagcagca-3', SEC ID NO:42, y el cebador inverso era 5'-ccgg-gatccctcgatgacgaccagcggc-3, SEC ID NO:43. El cóctel de PCR se preparó en forma de Mezcla 1 y Mezcla 2; 25  $\mu$ l de cada una. La Mezcla 1 incluía 75 pmoles de cebadores, 100 ng de ADN genómico de *E. coli* y 5  $\mu$ moles de dNTPs. La Mezcla 2 incluía 1 unidad de ADN polimerasa de alta fidelidad (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, n° de cat. 1 732 641) y 5  $\mu$ l de tampón 10X Fidelity Expand (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Para permitir la PCR de inicio en caliente, se calentaron separadamente las Mezclas 1 y 2 durante 20 segundos a 96°C antes de agruparlas. La reacción agrupada se sometió a termociclado de la manera siguiente: incubación a 96°C durante 3 minutos, 10 ciclos de incubación a 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos, después 20 ciclos de incubación a 96°C de 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos, seguido de una etapa de pulido mediante incubación a 72°C durante 7 minutos. Tras la PCR, se obtuvo un único fragmento de 250 pb. Se digirió el fragmento de BCCP con *NheI* y *BamHI* y se subclonó en pRSET-A digerido con *NheI*-*BamHI*.

### 55 Etapa 5

#### Expresión de sulfurilasa y de luciferasa

Se amplificaron por PCR los marcos de lectura abierta de la ATP sulfurilasa de *Bst* y la luciferasa de *P. pyralis* utilizando cebadores que contenían sitios *PstI*/*HindIII* y *BamHI*/*XhoI* (el primer enzima se encontraba en el extremo 5' y el segundo enzima se encontraba en el extremo 3'), respectivamente. Lo anterior produjo una fusión N-terminal de 6X His y dominio de BCCP con la ATP sulfurilasa y la luciferasa. Los enzimas se expresaron en *E. coli* utilizando medio de crecimiento suplementado con biotina para permitir la biotilación *in vivo* a través del dominio de BCCP. Los enzimas se purificaron hasta prácticamente la homogeneidad utilizando una combinación de IMAC y una cromatografía de columna de exclusión por tamaño. La purificación se evaluó mediante electroforesis utilizando el aparato Agilent 65 2100 Bioanalyzer en chips Protein 200 Plus.

## Etapa 6

*Inmovilización en fase sólida de luciferasa y sulfurilasa*

Los enzimas se inmovilizaron en micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina Dynal M-280 (Dynal, Oslo, Noruega) y microesferas Bangs (300 nm) mediante incubación de una mezcla 1:3 de ATP sulfurilasa y luciferasa, respectivamente. La unión se llevó a cabo mediante la mezcla de 50  $\mu$ g de ATP sulfurilasa y 150  $\mu$ g de luciferasa con 1 mg de perlas Dynal M-280 o con 0,6 mg de microesferas Bangs en tampón TAGE (Tris-acetato 25 mM, pH 7,8, sulfato amónico 200 mM, glicerol al 15% v/v y etilenglicol al 30% v/v). La mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C en un agitador giratorio. Tras la unión, las perlas pudieron almacenar a -20°C en la solución enzimática durante 3 meses. Antes de la utilización las perlas se lavaron uniformemente en tampón de ensayo de luciferasa que contenía 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma, St. Louis, MO). Se sometió a ensayo la actividad de enzima inmovilizado utilizando un luminómetro (Turner, Sunnyvale, California). Las perlas lavadas se almacenaron sobre hielo hasta la deposición sobre una placa PTP.

## Etapa 7

*Placas PicoTiterPlate™ (PTPs)*

Las placas PicoTiterPlate™ (25x75x2 mm) se fabricaron mediante grabado anisotrópico de placas frontales de fibra óptica de una manera similar a la descrita en la literatura. Las placas se grabaron en tres profundidades diferentes de micropocillo: 26, 50 y 76 mm. La profundidad de centro a centro de los micropocillos era de 50  $\mu$ m y los diámetros de pocillo se encontraban comprendidos entre 39 y 44  $\mu$ m, con una densidad calculada de pocillos de 480 pocillos/mm<sup>2</sup>.

## Etapa 8

*Carga de la PTP*

Las perlas de sefarosa que portaban moldes de ADN y la mezcla de perlas Dynal M-280/Bangs de 0,3  $\mu$ m con enzimas sulfurilasa y luciferasa inmovilizados se depositaron en pocillos individuales de una placa PicoTiter utilizando un método basado en la centrifugación. El procedimiento utilizó un soporte (dispositivo) de policarbonato fabricado al efecto que incluía una placa de fondo (con divisores de posicionamiento deslizantes), una junta sellante de elastómero y una placa superior con dos aberturas de carga. La placa PTP se situó sobre la placa de fondo con la cara grabada hacia arriba y se apretó con pinzas contra ella la placa superior, que presentaba la junta sellante ya colocada en la misma. El conjunto completo se apretó con cuatro tornillos de plástico con el fin de proporcionar un sellado hermético al agua. La junta de sellado se había diseñado para formar una máscara para la deposición de perlas, resultando en un área hexagonal (14x43 mm) que cubría aproximadamente 270.000 pocillos de la placa PTP.

Se depositaron las perlas en capas ordenadas. Se extrajo la PTP de la incubación en tampón de lavado de perlas. Se depositó la capa 1, una mezcla de ADN y perlas con enzima. Tras la centrifugación, se separó de la placa PTP mediante aspiración el sobrenadante de la Capa 1 y se depositó la Capa 2, perlas con enzima Dynal.

Se preparó una suspensión de perlas mediante la mezcla de 150.000 perlas de sefarosa que portaban ADN en 120  $\mu$ l de la mezcla de unión pmu/pol. *Bst* (ver anteriormente) con 270  $\mu$ l de perlas Dynal-SL y Bangs-SL (ambas a una concentración de 10 mg/ml) en un volumen total de 500  $\mu$ l de tampón de ensayo de luciferasa que contenía 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino. La suspensión de perlas se agitó con vórtex y se hizo fluir por el dispositivo de deposición de perlas a través de las aberturas de pipeteado. Se procuró evitar la introducción de burbujas de aire. Se centrifugó el conjunto de dispositivo/PTP a 2.000 rpm durante 8 minutos en una centrífuga Beckman Allegra 6 dotada de una centrífuga de cabezal oscilante con 4 posiciones de placa. Tras la centrifugación, se separó cuidadosamente el sobrenadante de la cámara del dispositivo utilizando una pipeta. Se depositó una segunda capa de únicamente perlas Dynal-SL. Esta capa incluía 125  $\mu$ l de perlas Dynal-SL (a una concentración de 10 mg/ml) y 375  $\mu$ l de tampón de lavado de perlas en un tubo de 1,5 ml (2,5 mg/ml de perlas Dynal). La mezcla de perlas Dynal se pipeteó en el área activa principal de la PTP y se centrifugó durante 8 minutos a 2.000 rpm. Se separó mediante aspiración la mezcla de la Capa 2 y nuevamente se introdujo la PTP en tampón de lavado de perlas (tampón de ensayo de luciferasa con albúmina de suero bovino 0,1 mg/ml y apirasa 8,5 U/l) hasta encontrarse preparada para la carga sobre el secuenciador.

## Etapa 9

*Instrumento de secuenciación*

El instrumento de secuenciación fabricado al efecto incluía tres conjuntos principales: un subsistema de fluidos, un cartucho de PTP/cámara de flujo y un subsistema de formación de imágenes. El subsistema de fluidos incluía reservorios de reactivos, líneas de introducción de reactivos, un distribuidor multiválvula y una bomba peristáltica. Dicho subsistema permitía la administración de reactivos en el interior de la cámara de flujo, un reactivo cada vez, a un caudal y durante un periodo preprogramados. El cartucho de PTP/cámara de flujo se diseñó de manera que, tras

la unión de la PTP, quedase un espacio de 300  $\mu\text{m}$  entre la parte superior de la PTP (la cara grabada) y el techo de la cámara. Dicho conjunto Incluye un medio para el control de la temperatura de los reactivos y de la PTP, así como una carcasa hermética a la luz. La cara pulida de una PTP se expuso a la cara posterior del cartucho de PTP y se puso directamente en contacto con el sistema de formación de imágenes. El sistema de formación de imágenes comprendía una cámara CCD con un haz de fibras formador de imágenes 1-1, así como un sistema de enfriamiento criogénico para la cámara y electrónica de control de la cámara. La cámara utilizada era una cámara serie 600 de Spectral Instruments (Tucson, AZ) con un CCD LM485 Fairchild Imaging (16 millones de píxels, 15  $\mu\text{m}$  de tamaño de píxel). Éste se unió directamente al haz de fibras formador de imágenes con un paso de fibra de 6  $\mu\text{m}$ . La cámara se enfrió a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se hizo funcionar en un modo de transferencia de imágenes. De esta manera, la parte central del CCD se utilizó para la formación de imágenes, mientras que la parte exterior del CCD se utilizó para el almacenamiento y lectura de las imágenes. La lectura se producía a través de 4 puertos, en cada esquina del CCD. La tasa de adquisición de datos se fijó en 1 imagen cada 30 segundos. El tiempo de transferencia de imagen era de aproximadamente 0,25 segundos. Todas las imágenes de la cámara se almacenaron en un formato UTIFF 16 en un disco duro de ordenador (IBM eServer xSeries 335, IBM, White Plains, NY).

## Etapas 10

### *Condiciones de la operación de secuenciación*

La administración cíclica de reactivos de secuenciación en los pocillos de la PTP y el lavado de los productos secundarios de la reacción de secuenciación de los pocillos se realizó mediante una operación preprogramada del sistema de fluidos. El programa se escribió en forma de script de Excel de Microsoft, especificando el nombre del reactivo (Wash, dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP, PPi estándar), el caudal y la duración de cada etapa del programa. Se fijó el caudal en 3 ml/min para todos los reactivos y la velocidad lineal dentro de la cámara de flujo fue aproximadamente. Tras una etapa inicial de lavado (5 minutos), se pasó un flujo estándar de PPi (2 minutos), seguido de 21 ó 42 ciclos de (lavado-C-lavado-A-lavado-G-lavado-T), en los que el flujo de cada nucleótido duraba 0,5 minutos y las etapas de lavado eran de 2 minutos. Después de todos los ciclos de adición de nucleótidos y de los lavados, se pasó un segundo flujo estándar de PPi (2 minutos), seguido de una etapa final de lavado de 5 minutos. El tiempo total de la operación fue de 4 horas. Los volúmenes de reactivo necesarios para completar este script de la operación fueron los siguientes: 300 ml de cada solución de lavado, 50 ml de cada nucleótido en solución, 20 ml de solución estándar de PPi. Durante la operación, todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente. Debido a que la cámara de flujo y el tubo de introducción a la cámara de flujo se mantuvieron a  $3^{\circ}\text{C}$ , todos los reactivos que entraron en la cámara de flujo se encontraban a  $30^{\circ}\text{C}$ .

## Referencias

**Hamilton, S.C., J.W. Farchaus and M.C. Davis. 2001.** DNA polymerases as engines for biotechnology. *BioTechniques* 31:370.

QiaQuick Spin Handbook (QIAGEN, 2001): hypertext transfer protocol: // world wide web.qiagen.com/literature/handbooks/qqspin/1016893HBQQSpin\_PCR\_mc\_prot.pdf.

Quick Ligation Kit (NEB): hypertext transfer protocol: // world wide web.neb.com/neb/products/mod\_enzymes/M2200.html.

MinElute kit (QIAGEN): hypertext transfer protocol: // world wide web.qiagen.com/literature/handbooks/minelute/1016839\_HBMinElute\_Prot\_GeLpdf.

Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, 3rd edition (DynaL, 1998): hypertext transfer protocol: // world wide web.dynal.no/kunder/dynal/DynaLPub36.nsf/cb9227fbab127a0ad4125683b004b011c/4908f5b1a665858a41266adf005779f2ISFILEI Dynabeads M-280 Streptavidin.pdf.

BioAnalyzer User Manual (Agilent): hypertext transfer protocol: // world wide web.chern.agilent.com/temp/rad31B29/00033620.pdf.

BioAnalyzer DNA and RNA LabChip Usage (Agilent): hypertext transfer protocol: // world wide web.agilent.com/chem/labonachip.

BioAnayzer RNA 6000 Ladder (Amblon): hypertext transfer protocol: // world wide web.amblon.com/techlib/spec/sp\_7162.pdf.



# REIVINDICACIONES

1. Método para la secuenciación de ácidos nucleicos, que comprende:

- (a) fragmentar moléculas grandes de ácido nucleico de molde para generar una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados;
- (b) administrar los ácidos nucleicos fragmentados en microrreactores acuosos en una emulsión de agua en aceite de manera que una pluralidad de microrreactores acuosos comprende una única copia de un ácido nucleico fragmentado, una única perla capaz de unirse al ácido nucleico fragmentado, y solución de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación del ácido nucleico;
- (c) amplificar los ácidos nucleicos fragmentados en los microrreactores, formando copias amplificadas de dichos ácidos nucleicos y la unión de las copias amplificadas a las perlas en los microrreactores;
- (d) administrar las perlas en una serie de por lo menos 10.000 cámaras de reacción sobre una superficie plana, en la que una pluralidad de las cámaras de reacción comprende no más de una única perla; y
- (e) llevar a cabo una reacción de secuenciación simultáneamente en una pluralidad de las cámaras de reacción.

2. Método según la reivindicación 1, en el que las cámaras de reacción presentan un espaciado de centro a centro de entre 20 y 100  $\mu\text{m}$ .

3. Método según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos fragmentados presentan entre 30 y 500 bases.

4. Método según la reivindicación 1, en el que una pluralidad de las perlas se unen a por lo menos 10.000 copias amplificadas.

5. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) se lleva a cabo utilizando una reacción en cadena de la polimerasa.

6. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de secuenciación es una reacción de secuenciación basada en el pirofosfato.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de secuenciación comprende las etapas siguientes:

- (a) hibridar una cantidad efectiva de un cebador de secuenciación con las copias amplificadas del ácido nucleico y extender el cebador de secuenciación con una polimerasa y un nucleótido trifosfato predeterminado, rindiendo un producto de secuenciación y, en el caso de que el nucleótido trifosfato predeterminado se incorpore en el extremo 3' de dicho cebador de secuenciación, un producto secundario de la reacción de secuenciación; y
- (b) identificar el producto secundario de la reacción de secuenciación, determinando de esta manera la secuencia del ácido nucleico en una pluralidad de las cámaras de reacción.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de secuenciación comprende las etapas siguientes:

- (a) hibridar dos o más cebadores de secuenciación con una o una pluralidad de cadenas individuales de la molécula de ácido nucleico, en la que la totalidad de los cebadores excepto uno son cebadores reversiblemente bloqueados;
- (b) incorporar por lo menos una base en la molécula de ácido nucleico mediante elongación por la polimerasa a partir de un cebador no bloqueado,
- (c) impedir la elongación posterior de dicho cebador no bloqueado,
- (d) desbloquear uno de los cebadores reversiblemente bloqueados formando un cebador no bloqueado, y
- (e) repetir las etapas (b) a (d) hasta que por lo menos uno de los cebadores reversiblemente bloqueado haya sido desbloqueado y utilizado para la determinación de una secuencia.

9. Método según la reivindicación 1, en el que las cámaras de reacción son cavidades formadas mediante grabado de un extremo de un haz de fibras ópticas.

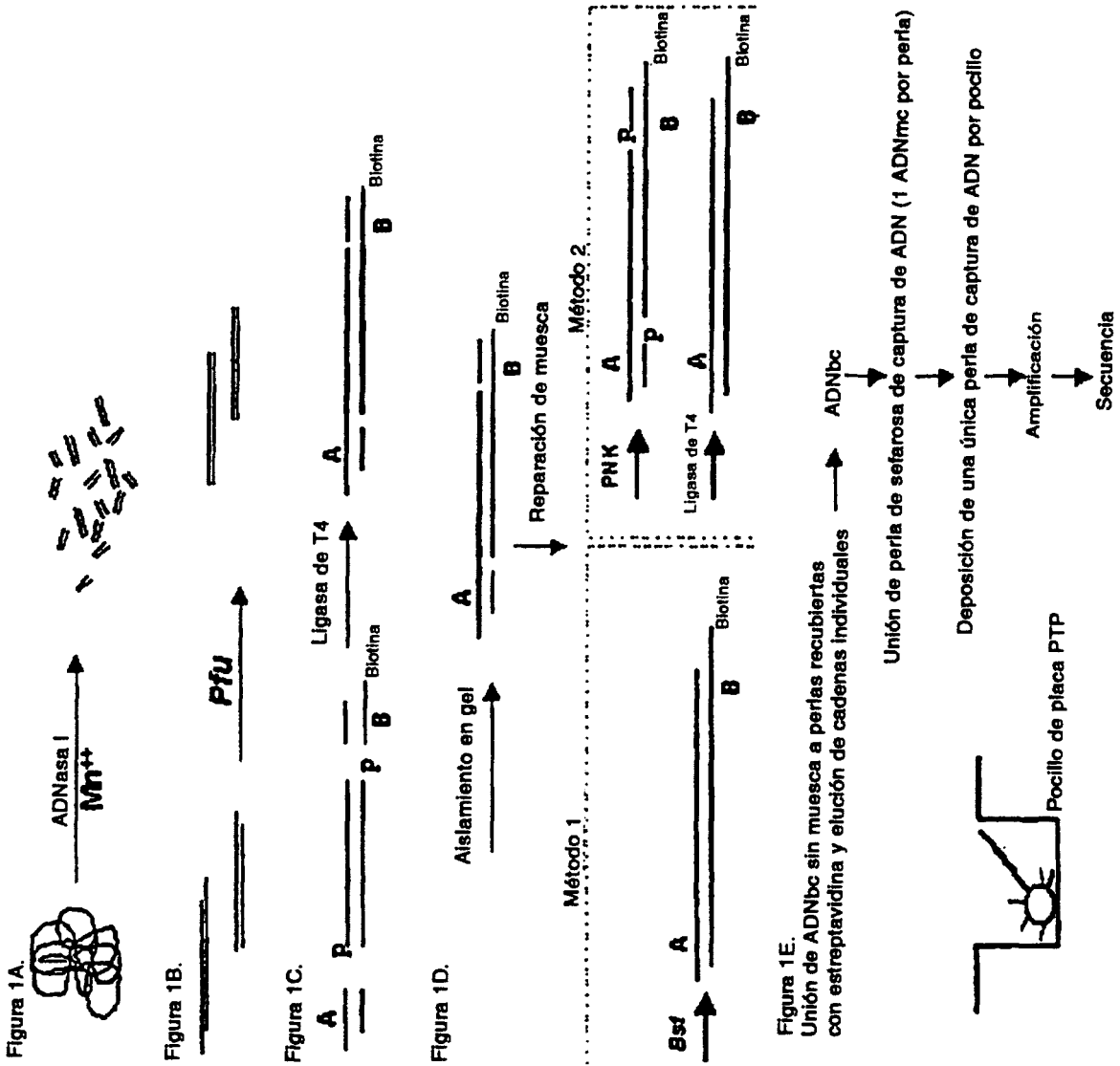
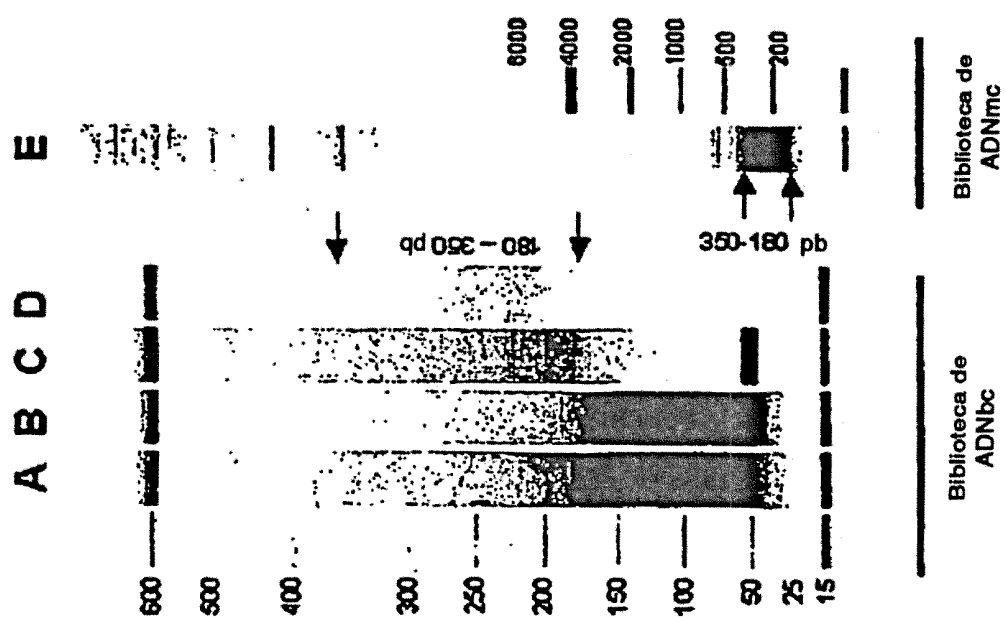


Figura 1F



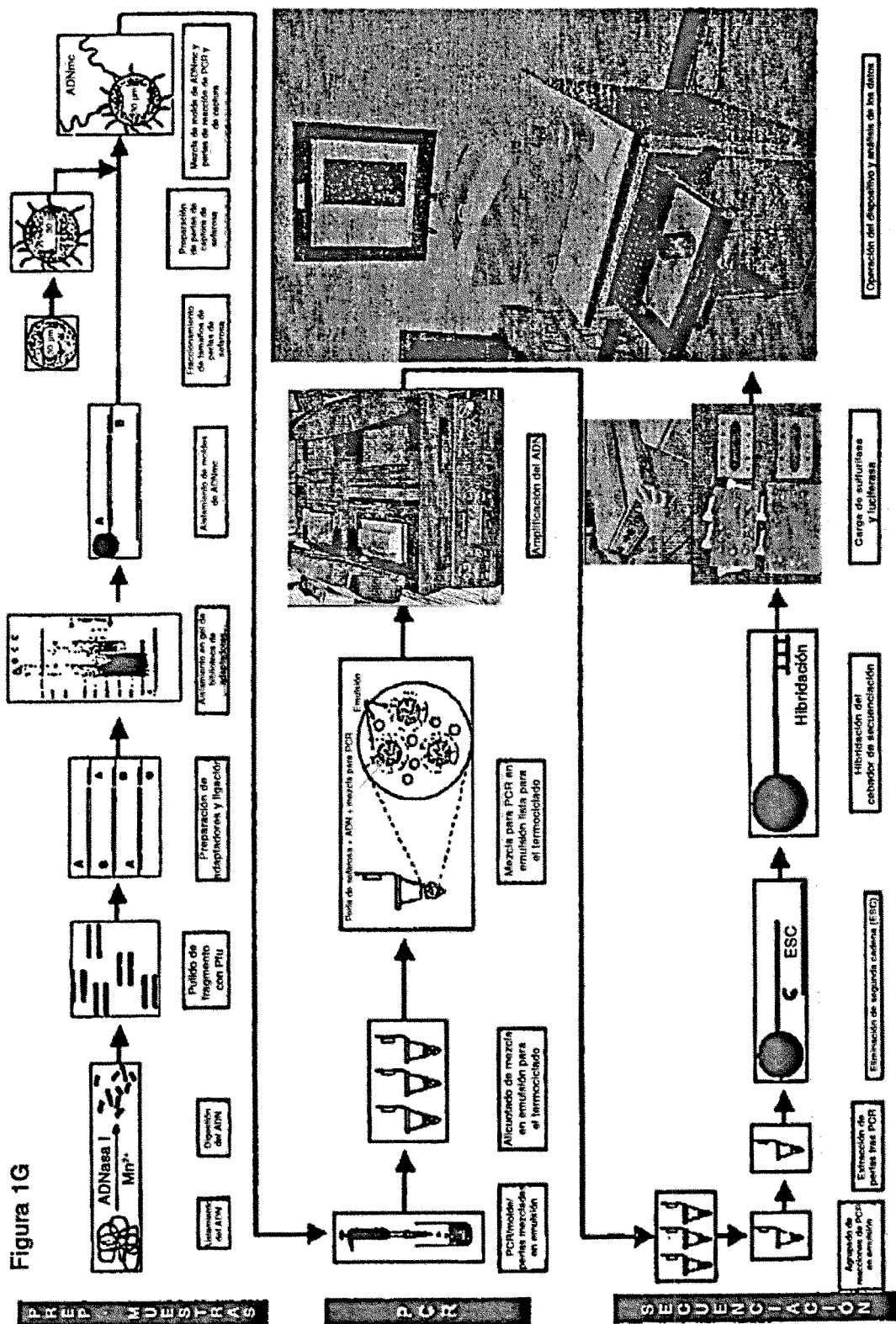




Figura 3

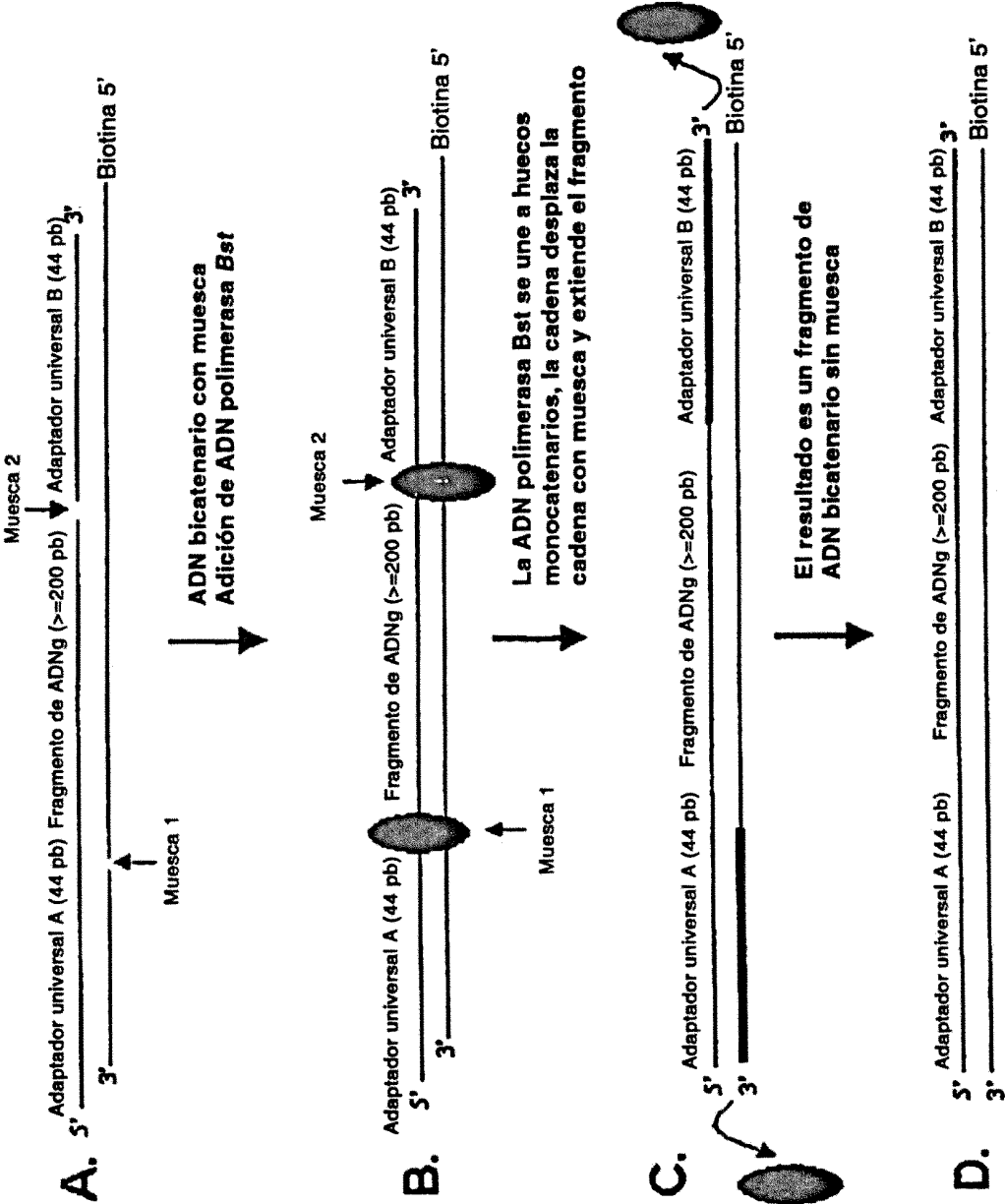


Figura 4

Posible especie de biblioteca de ADN bicatenario genómico

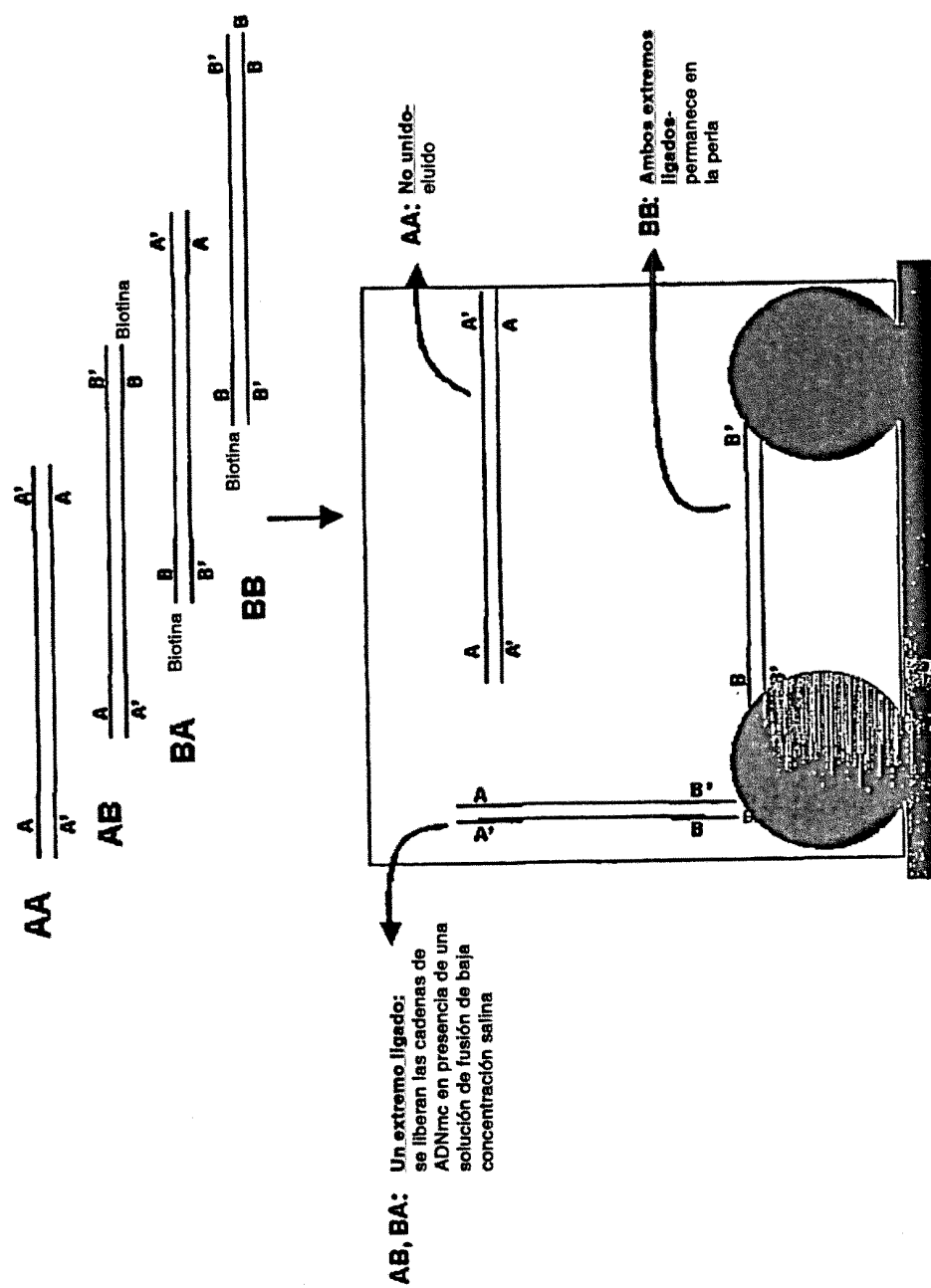


Figura 5

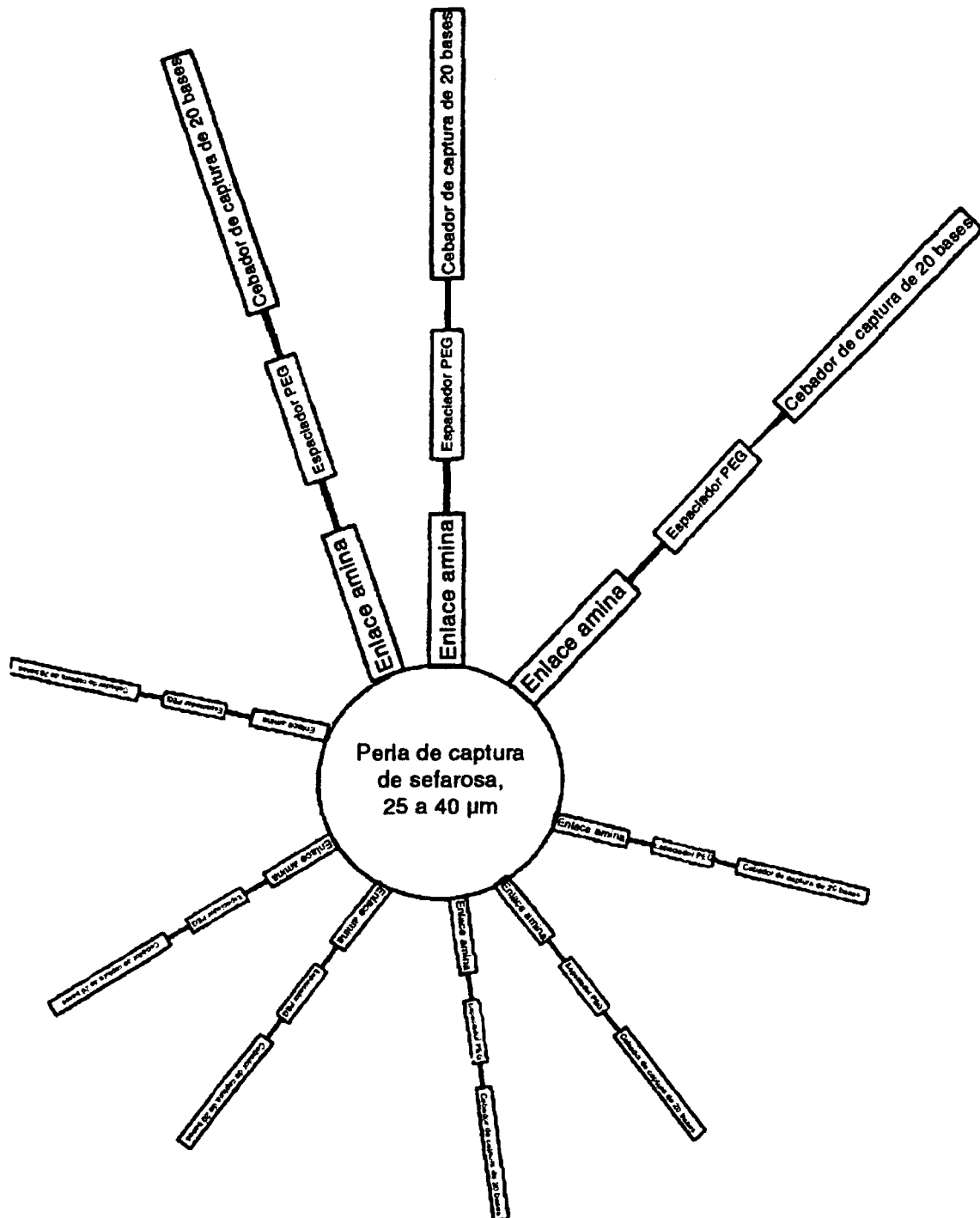




FIGURA 6A

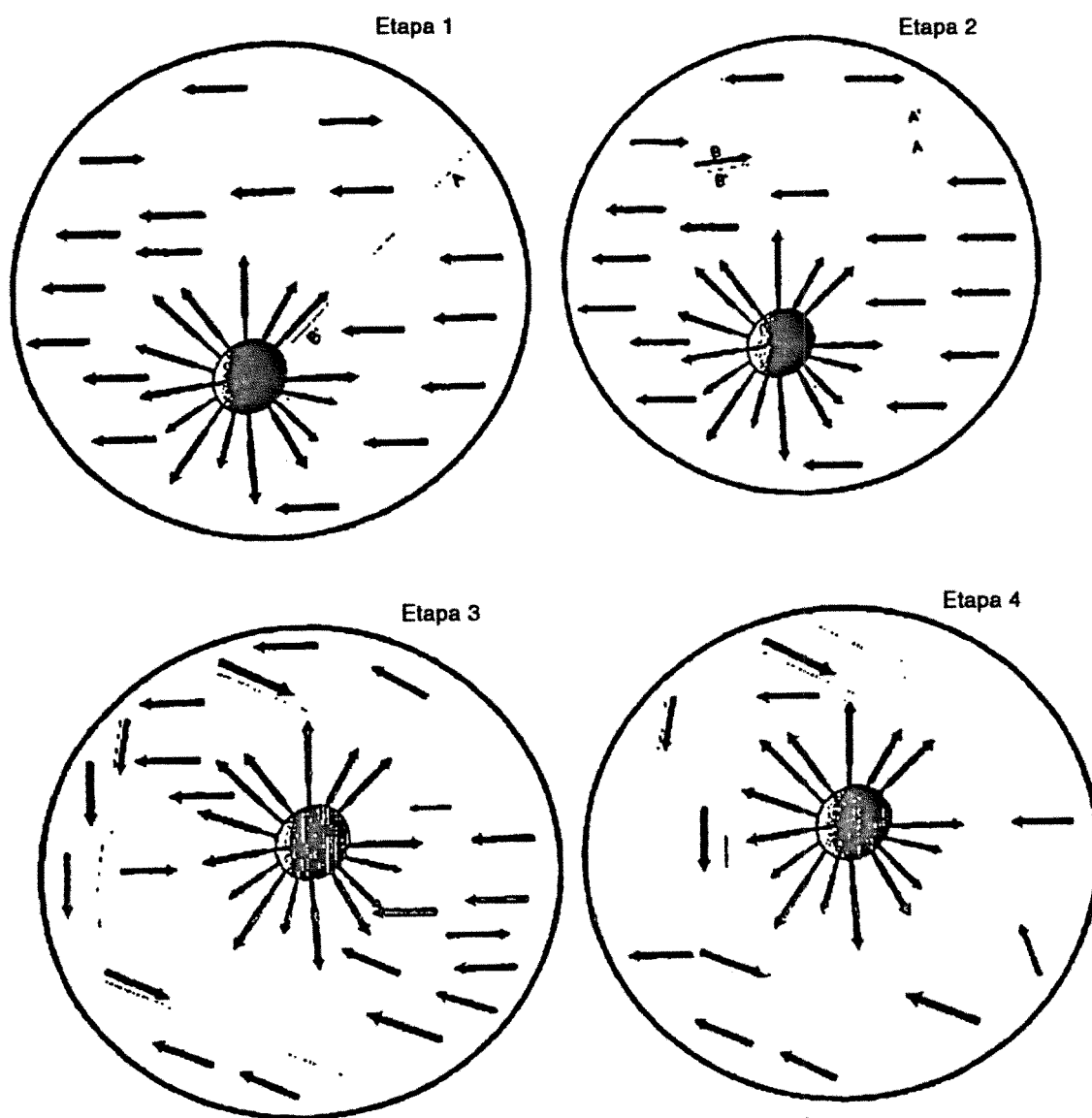


FIGURA 6B

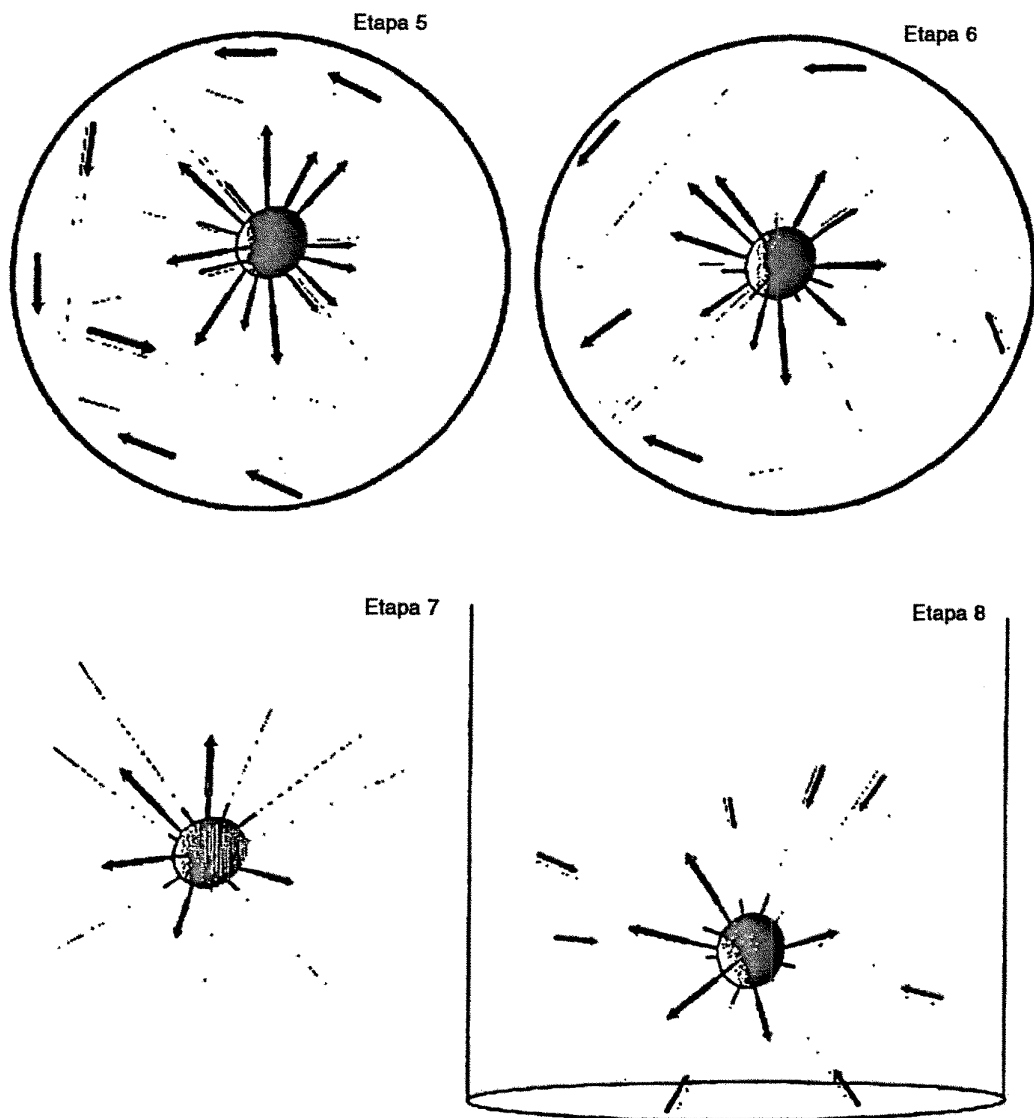


FIGURA 7

Flujo de proceso esquemático de la separación de perlas

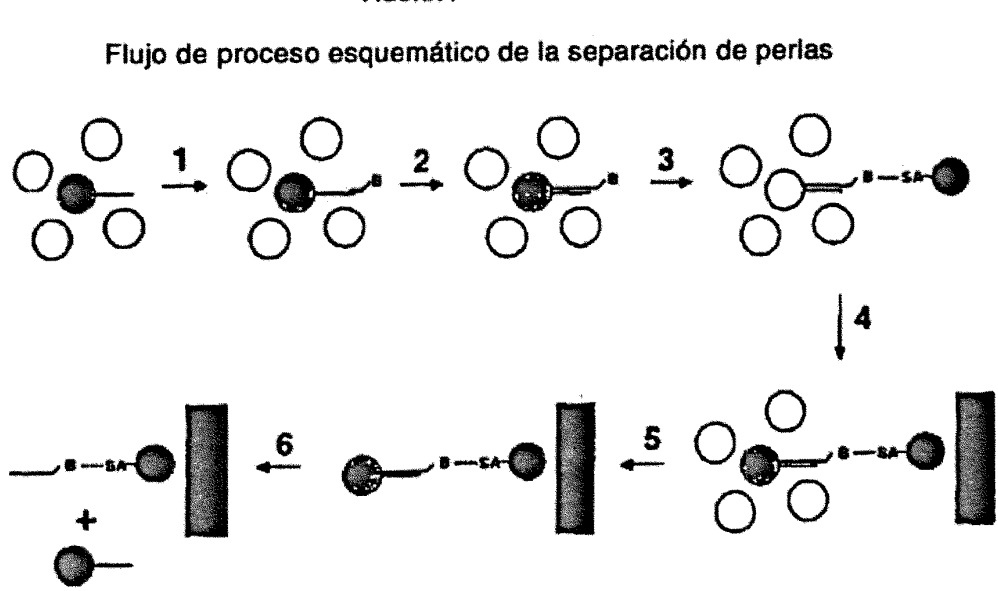


FIGURA 8

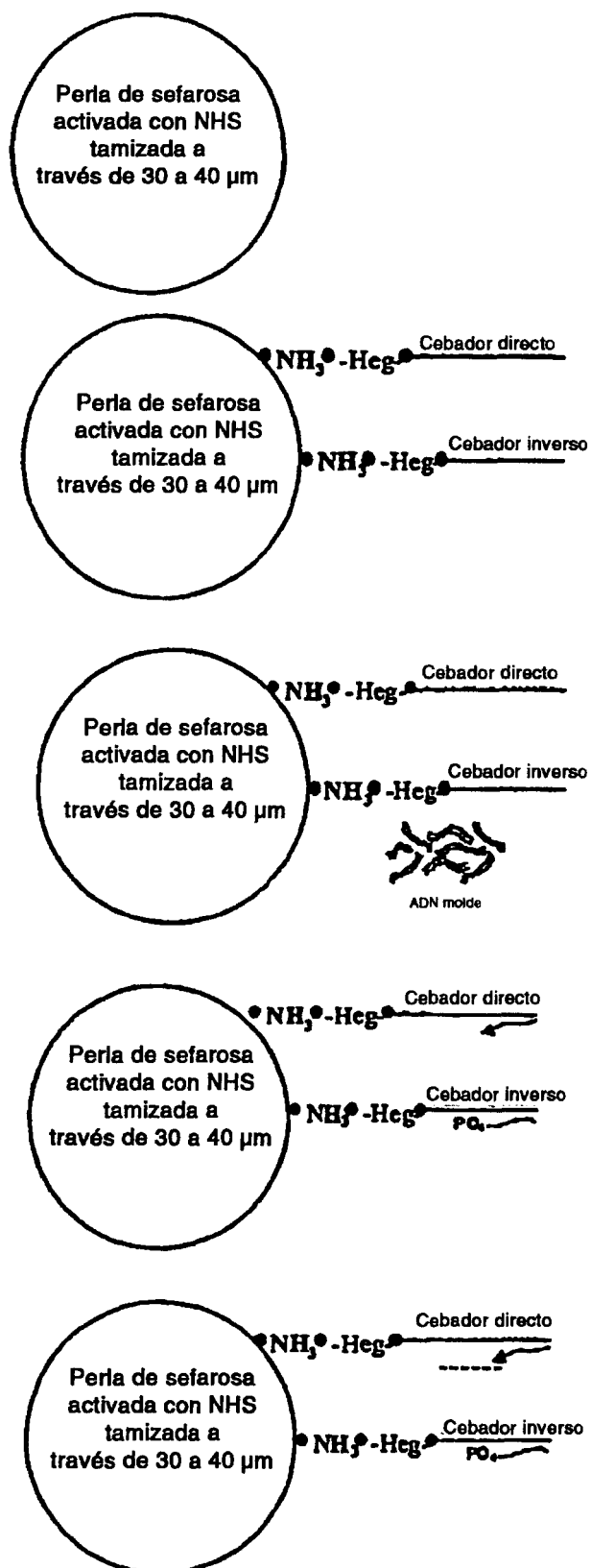


FIGURA 8 (continuación)

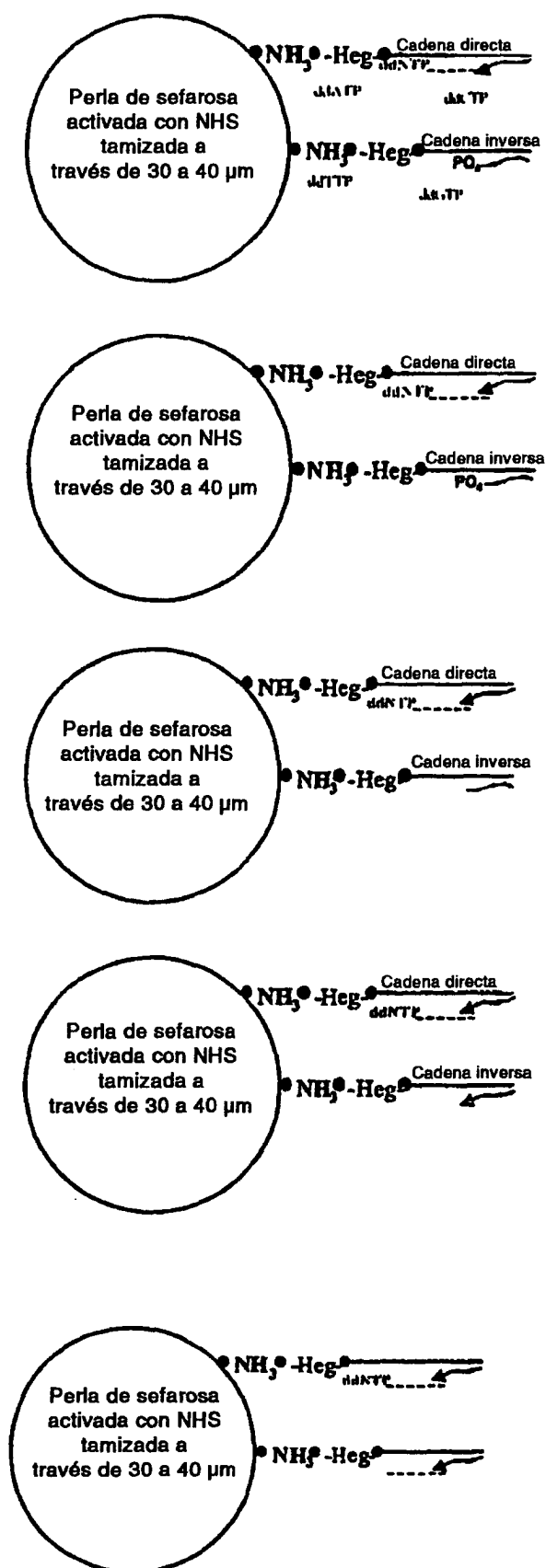


FIGURA 9

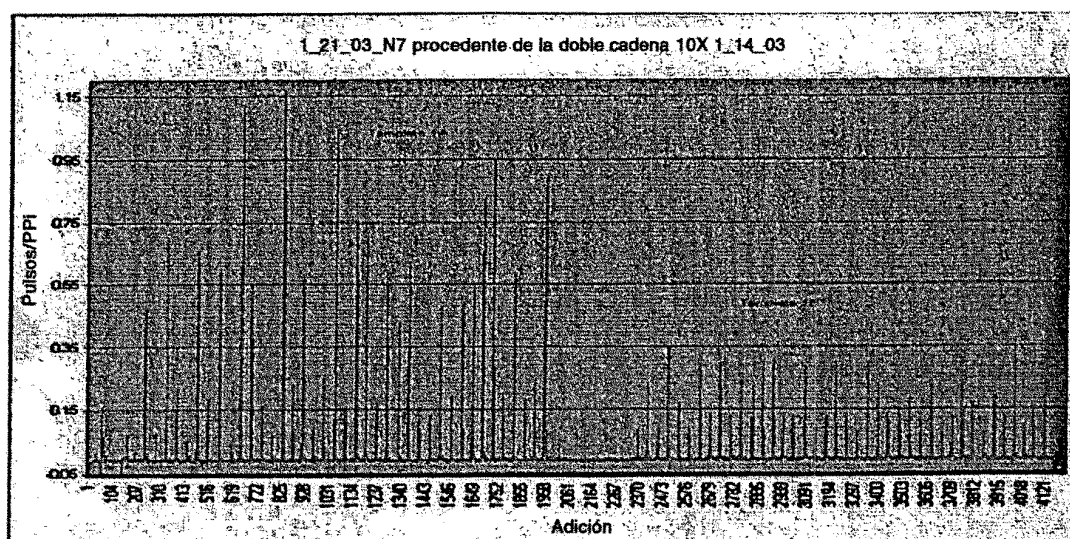
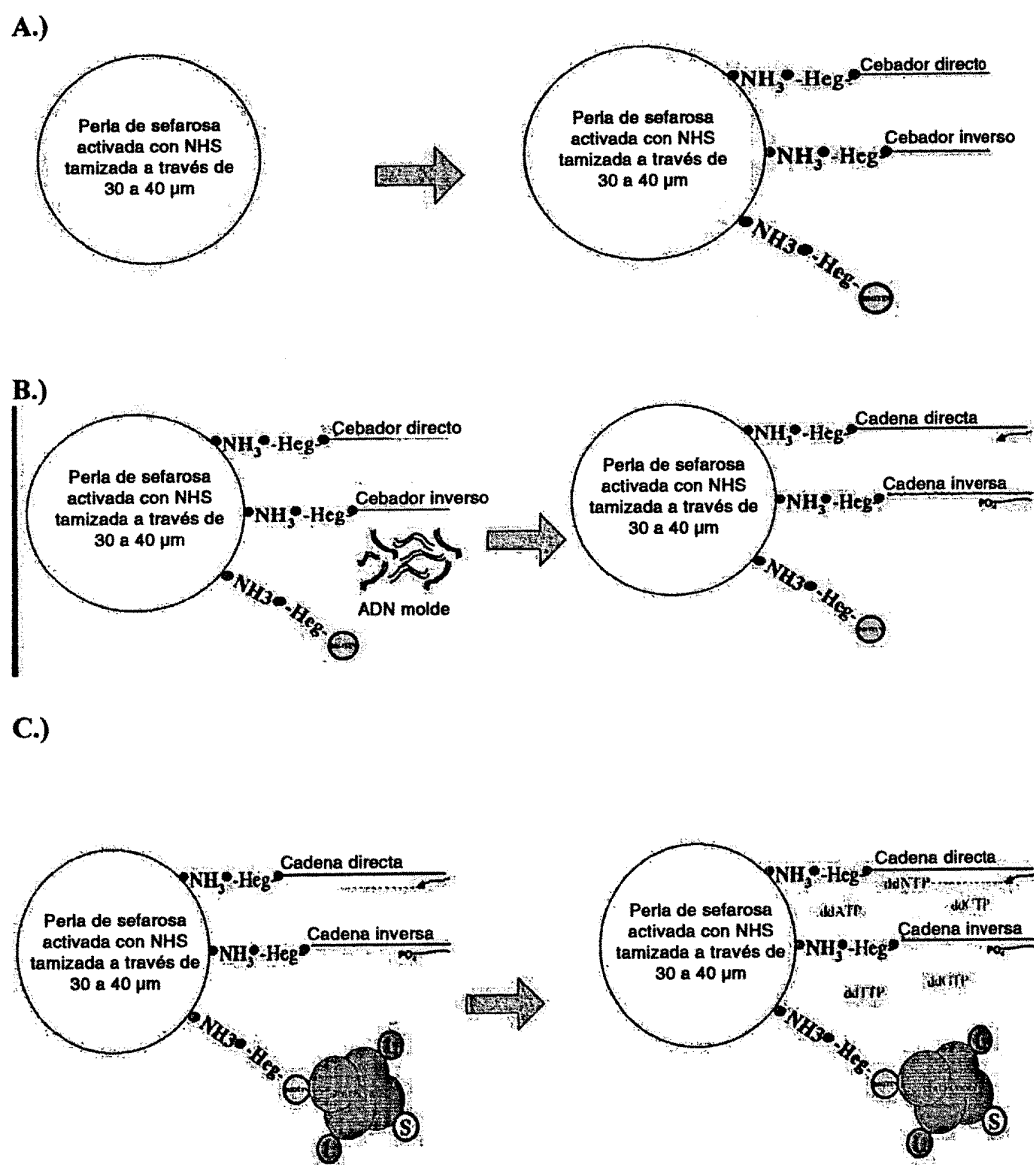
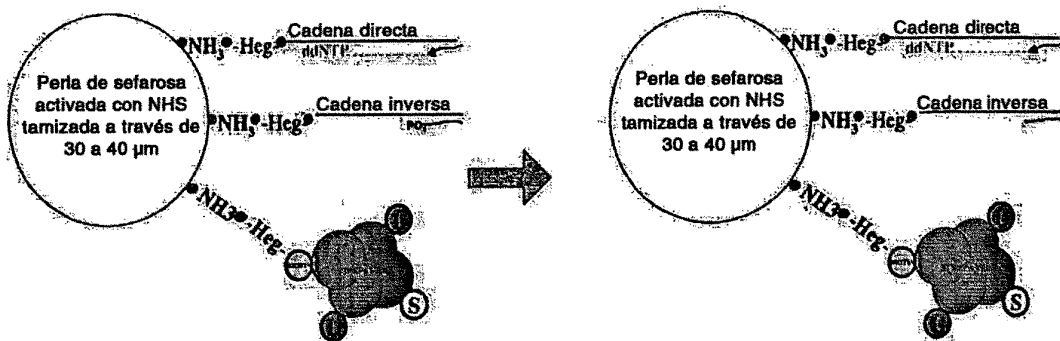


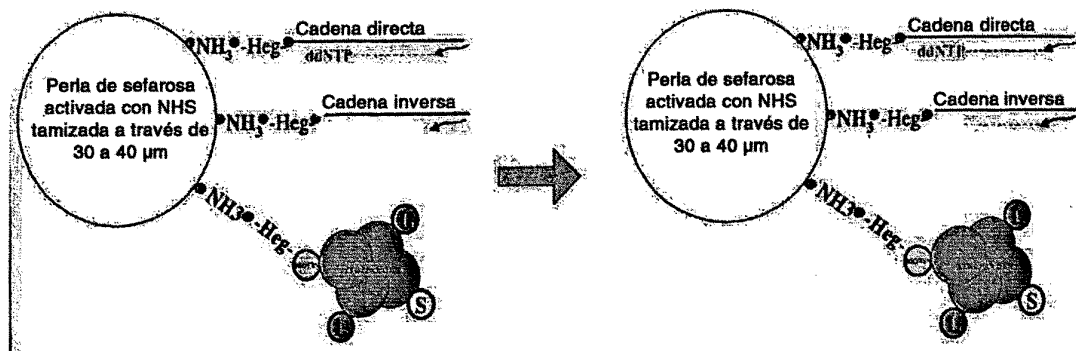
FIGURA 10



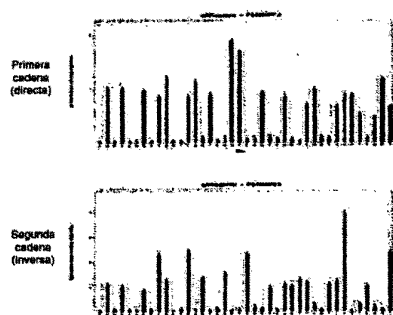
D.)



E.)



F.)



Muestra	Localización (pocillo)	Secuencia	Longitud de secuencia (aa)
PR_14_1	Pocillo 0001, 1362, 1680	ATGCGATCGTGACACAGTGT	22

Muestra	Localización (pocillo)	Secuencia	Longitud de secuencia (aa)
PR_14_1	Pocillo 0003, 1363, 1680	ATGCGATCGTGACACAGTGT	22



Figura 11A

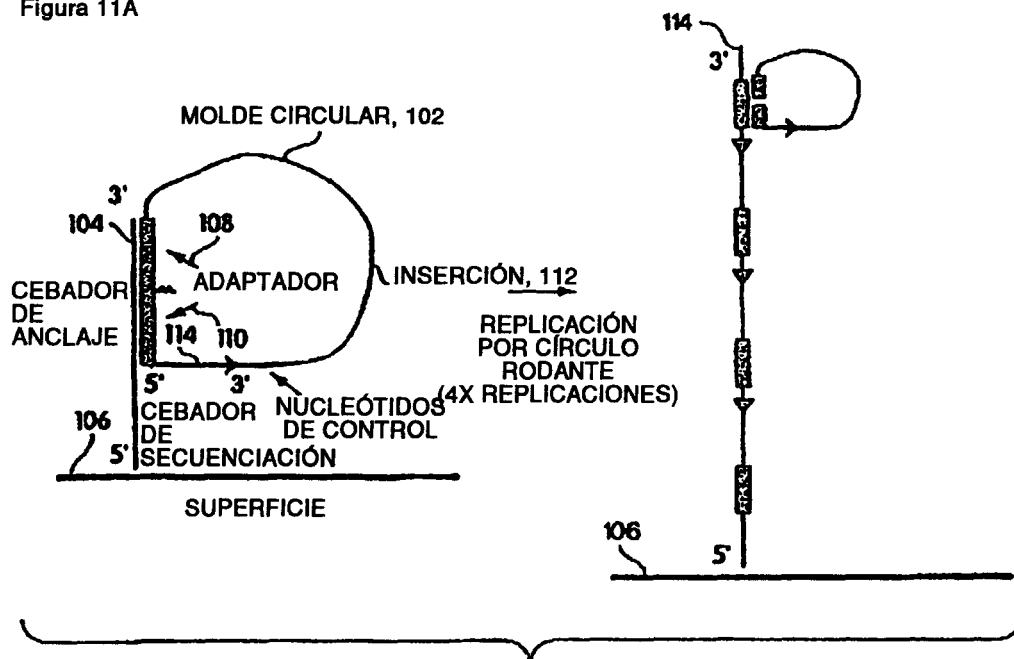


FIGURA 11B

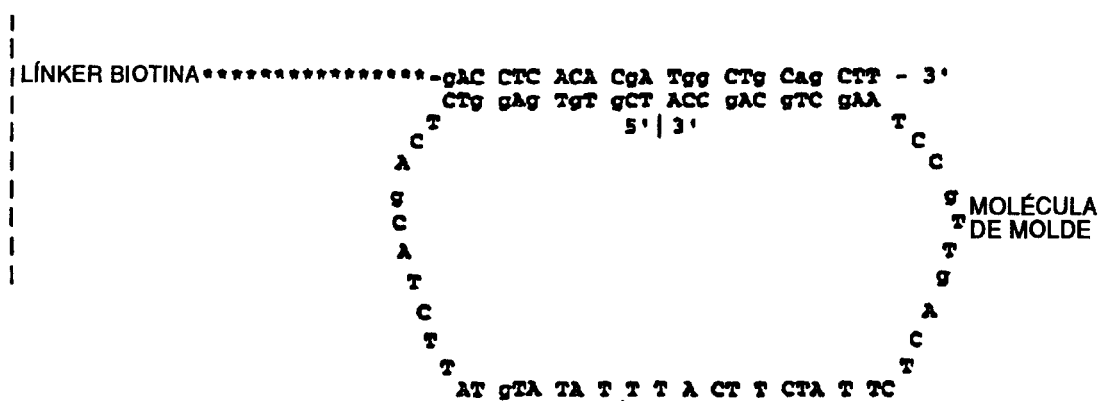


Figura 11C

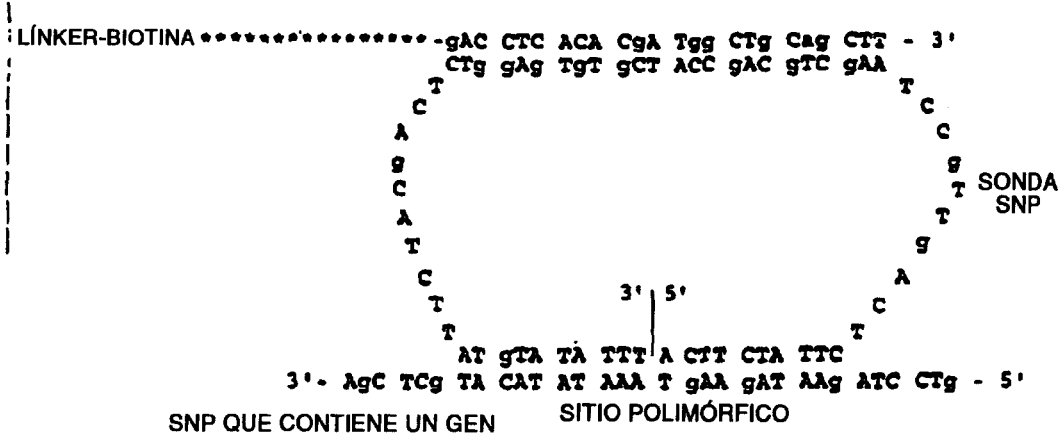


Figura 11D

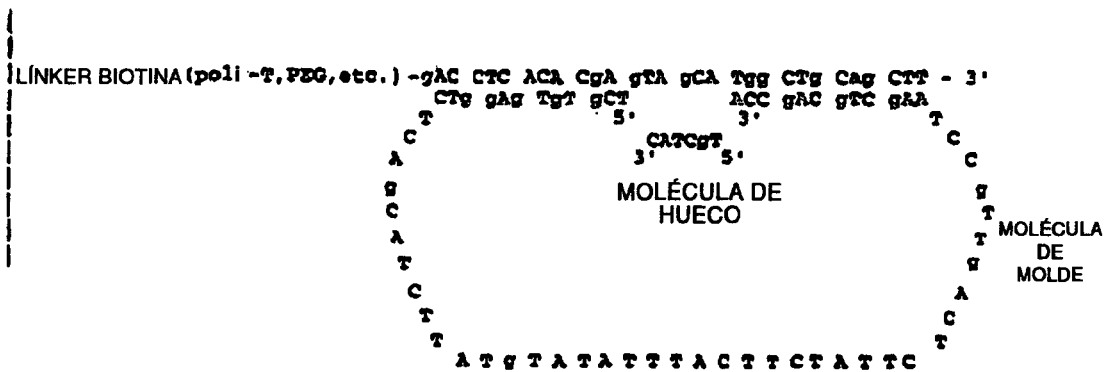


Figura 12

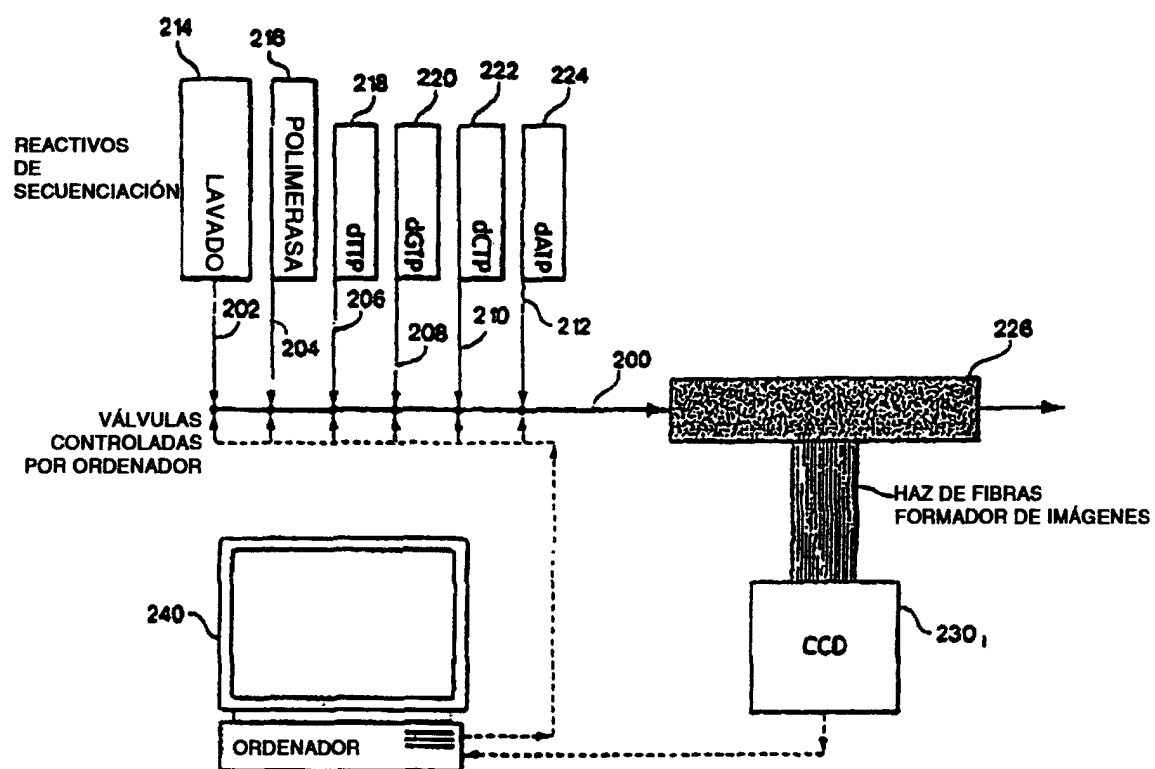


Figura 13

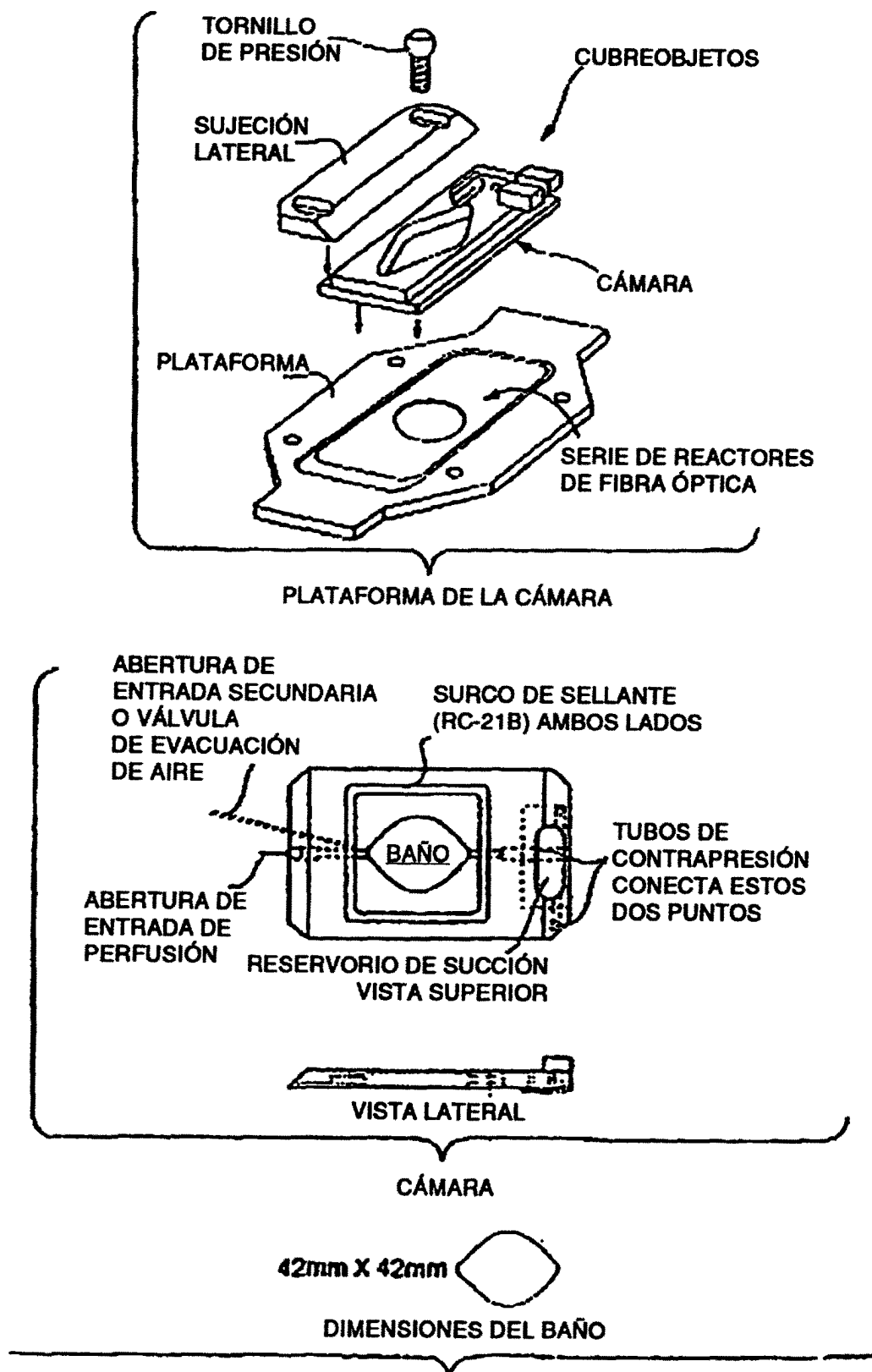


Figura 14

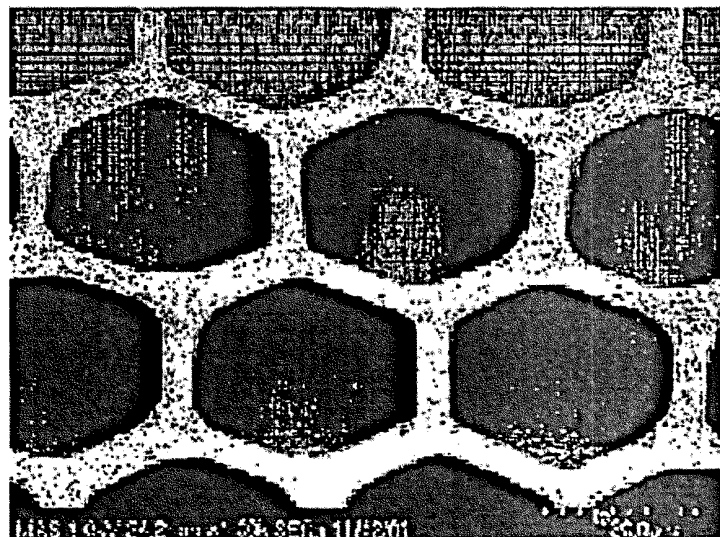
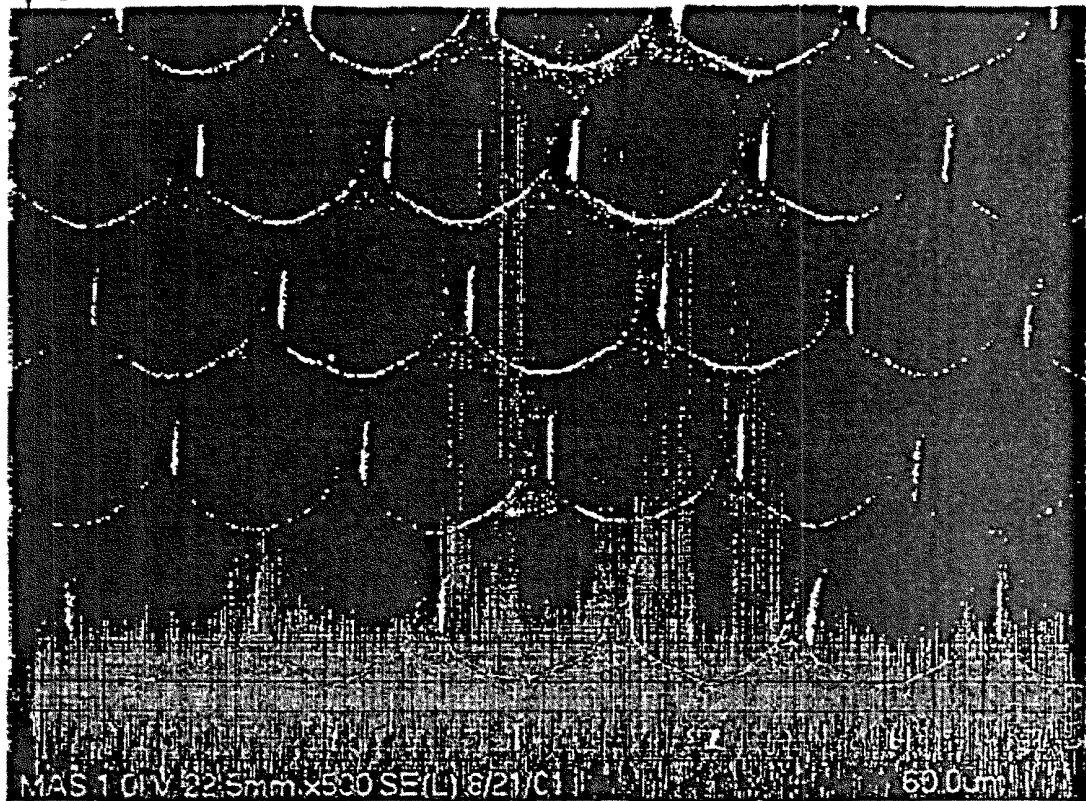
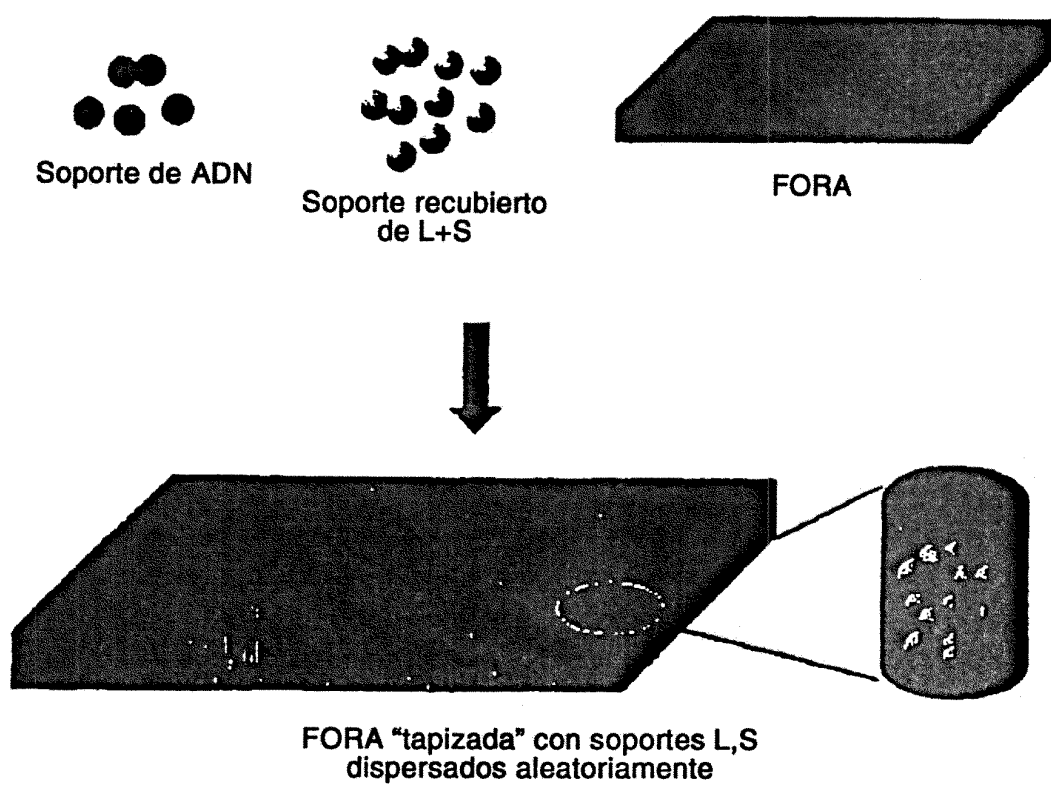


Figura 15



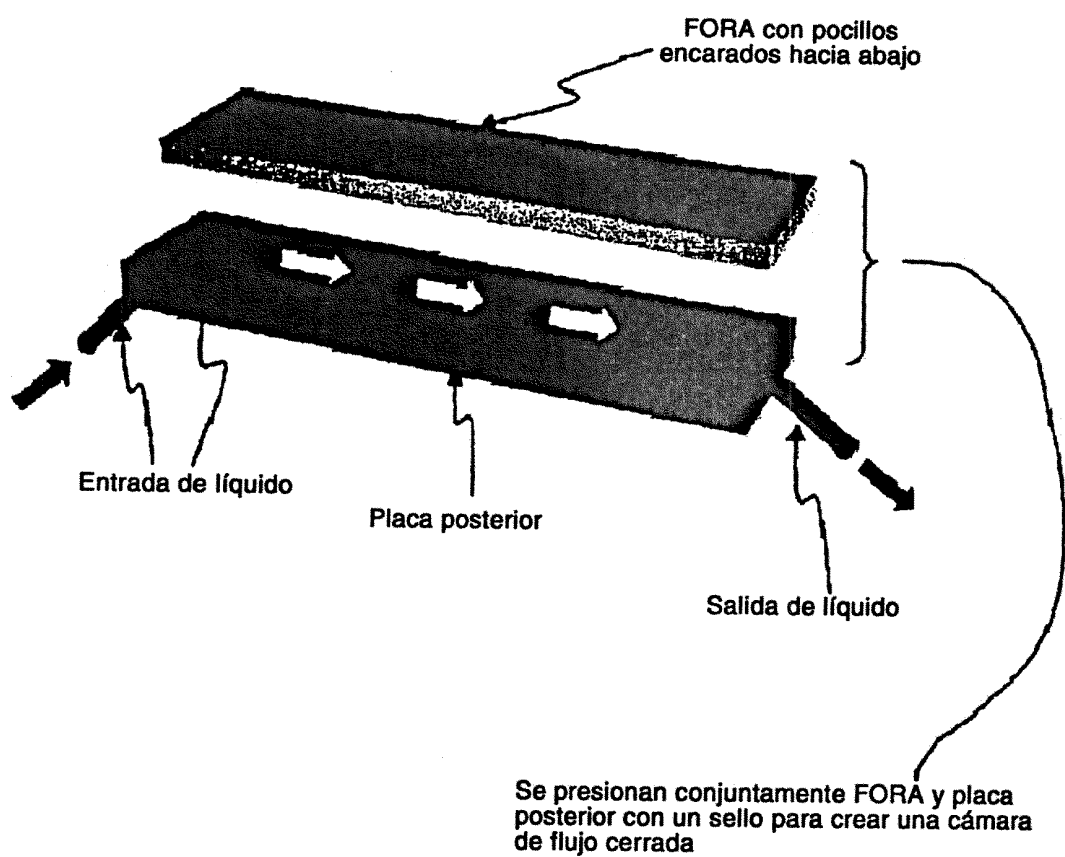


Figura 16

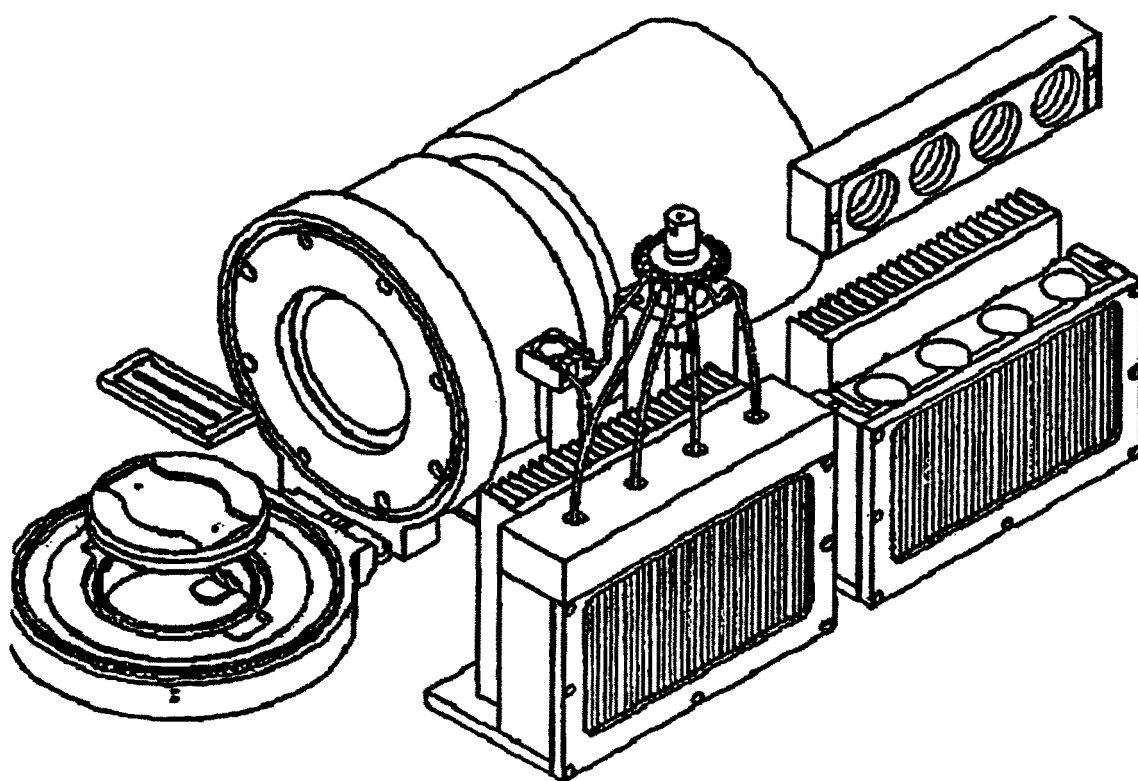


Figura 17



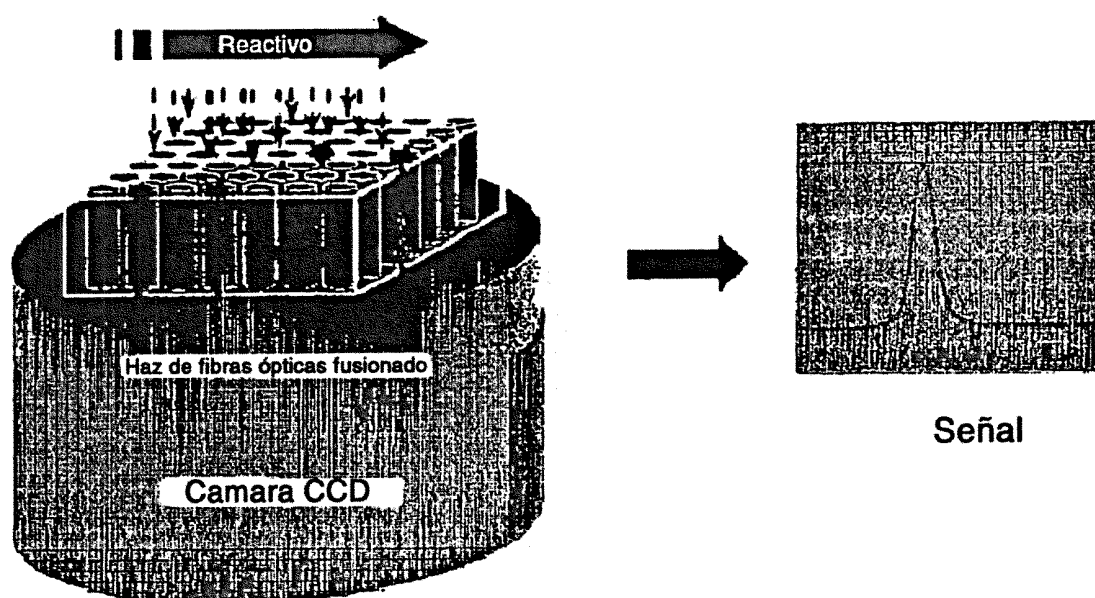
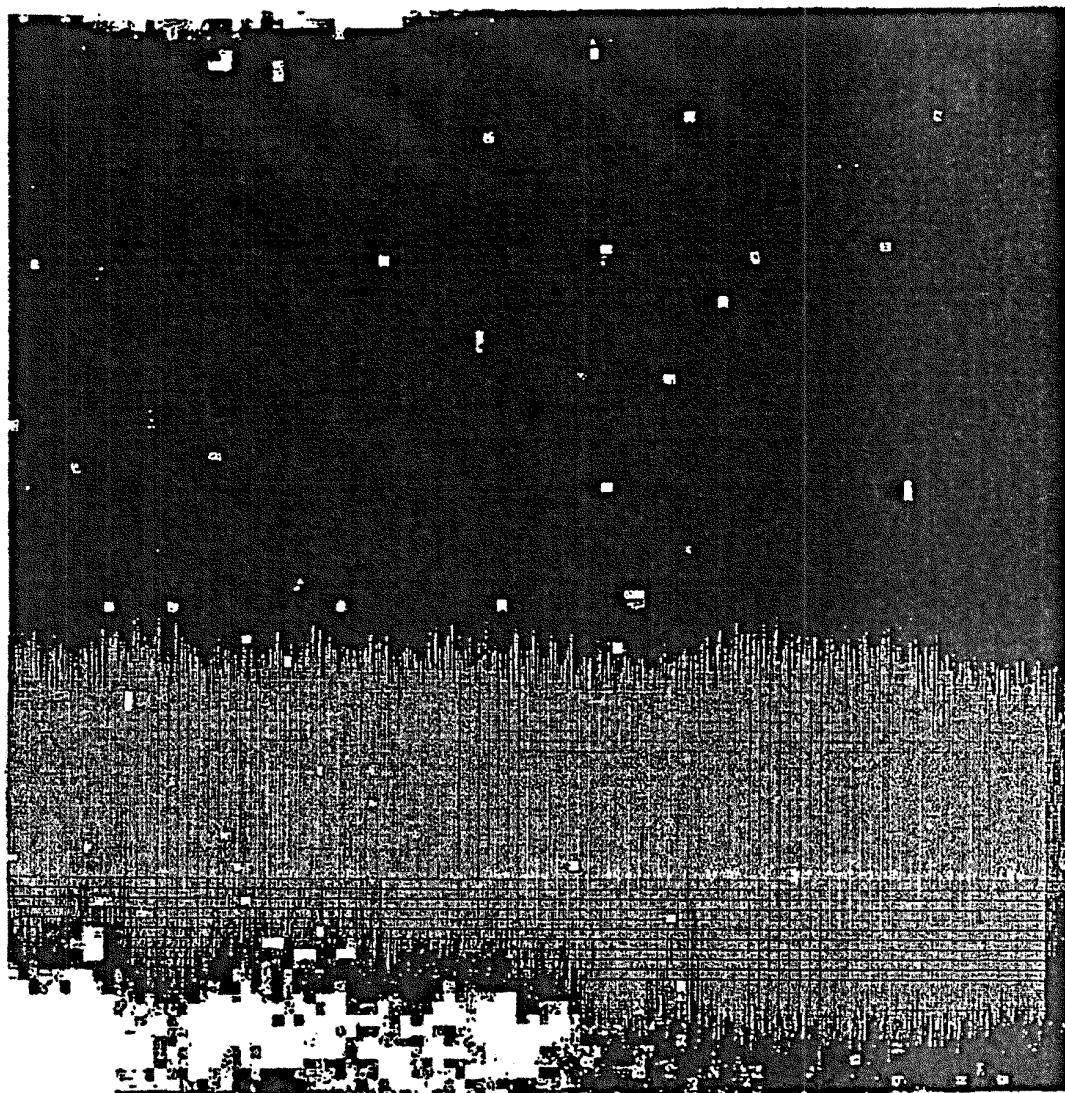


Figura 18



**Sulfurilasa sobre soporte móvil/luciferasa sobre la superficie, el PPI fluye sobre la superficie de la placa FORA. En la cámara, por cada píxel hay 1 soporte móvil; un pocillo de 50  $\mu\text{m}$  de la placa FORA comprende 4 píxels de 15  $\mu\text{m}$ . Se muestra un área de 100 x 100 píxels (10K píxels), 1,5  $\text{mm}^2$ .**

Figura 19

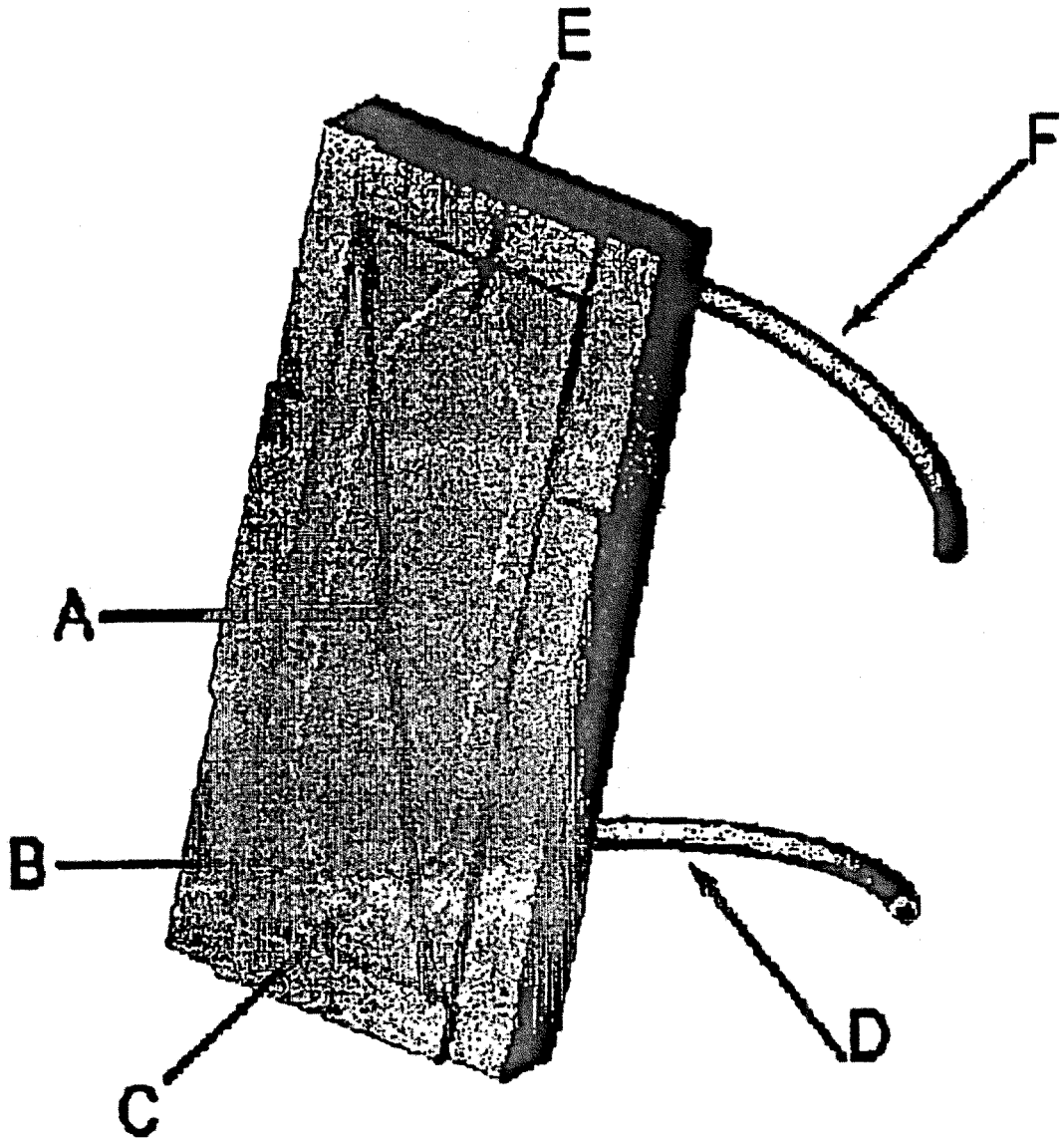


Figura 20

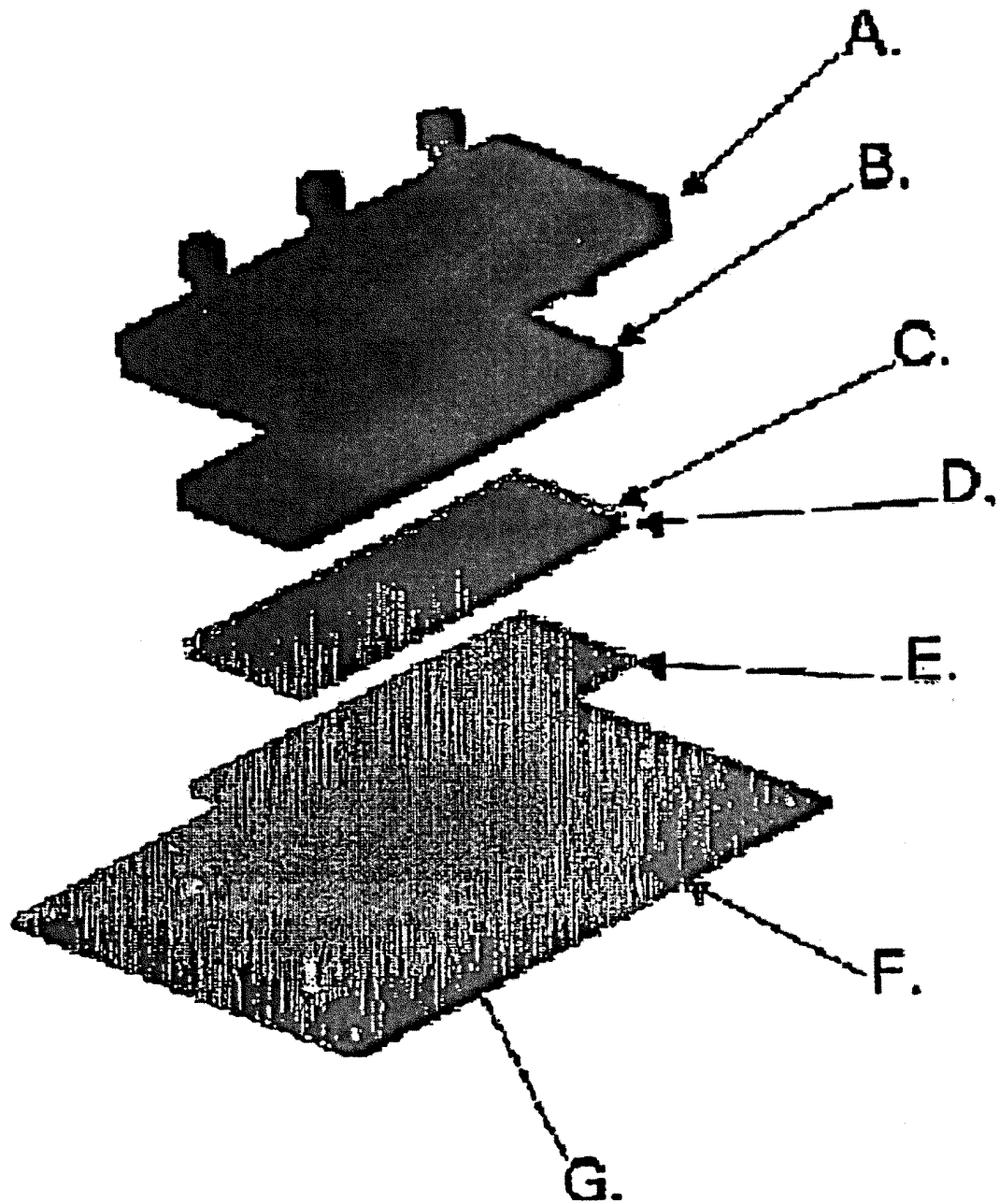


Figura 21

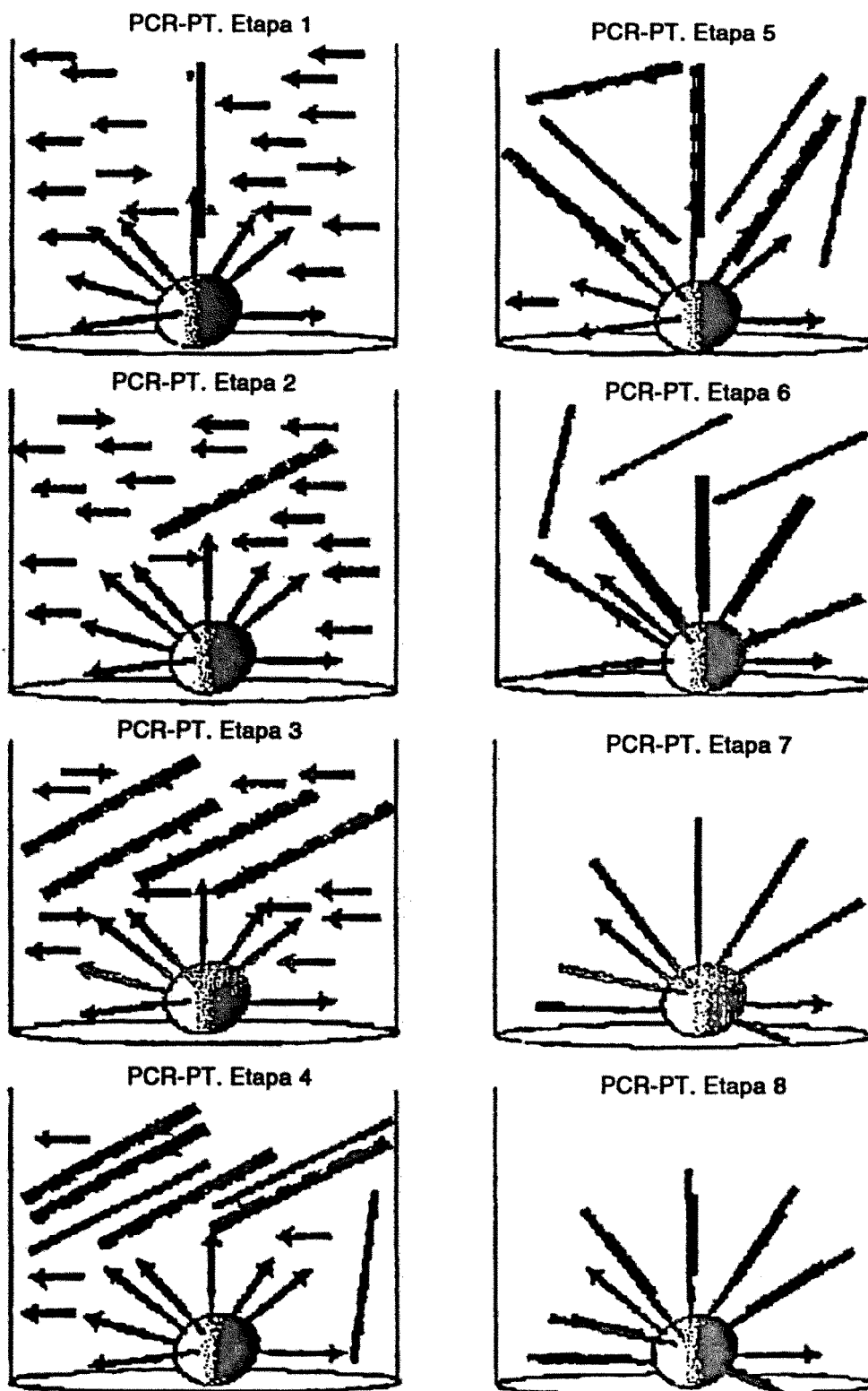


Figura 22

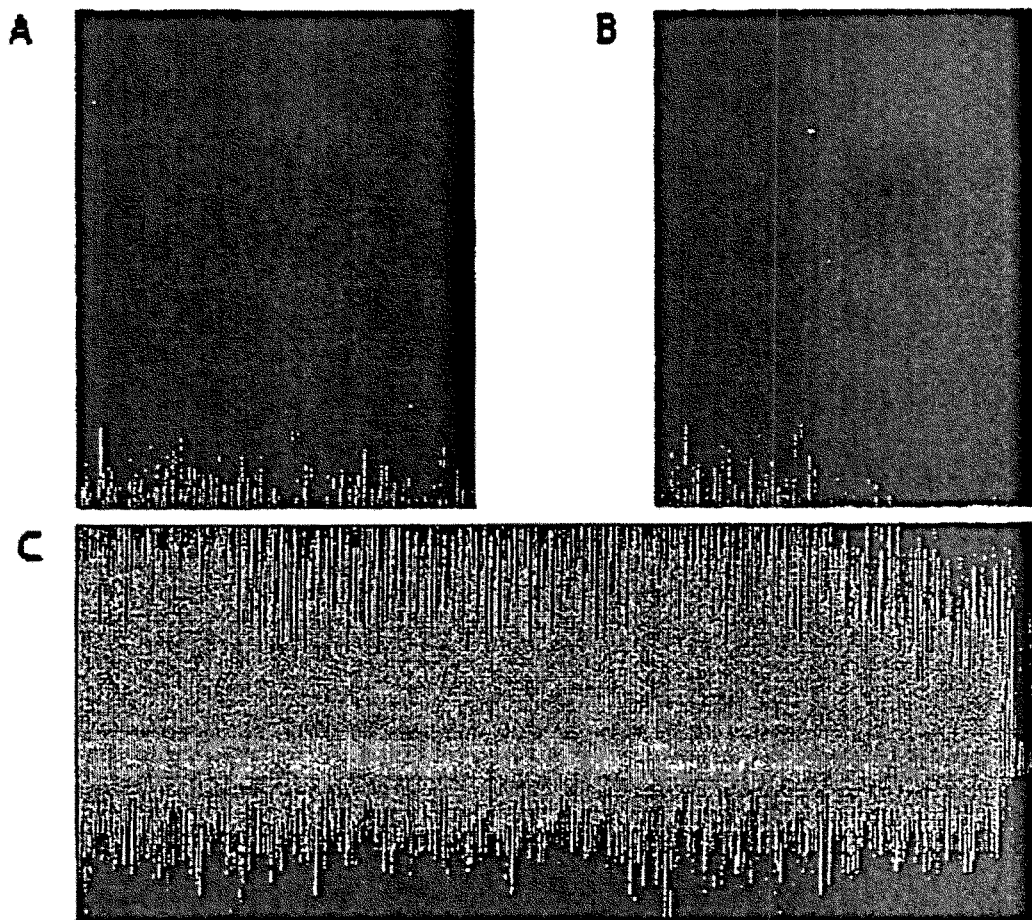


Figura 23

Figura 24

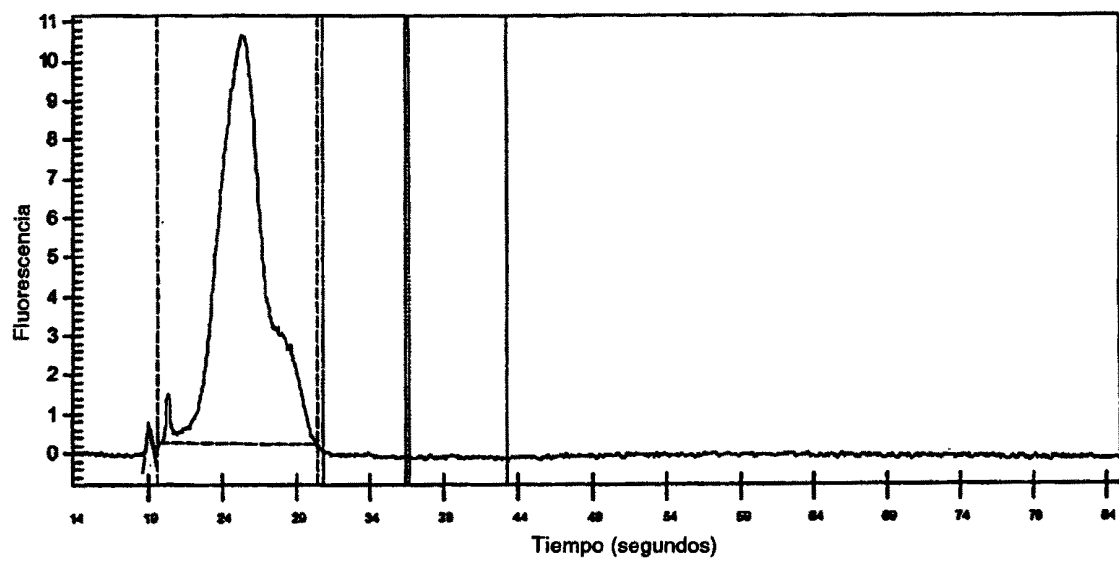


Figura 25

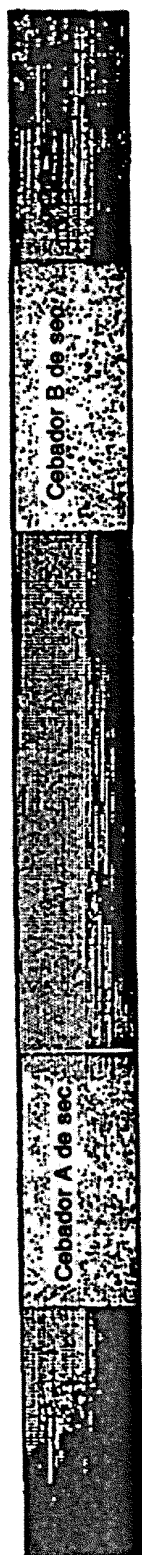


Figura 26

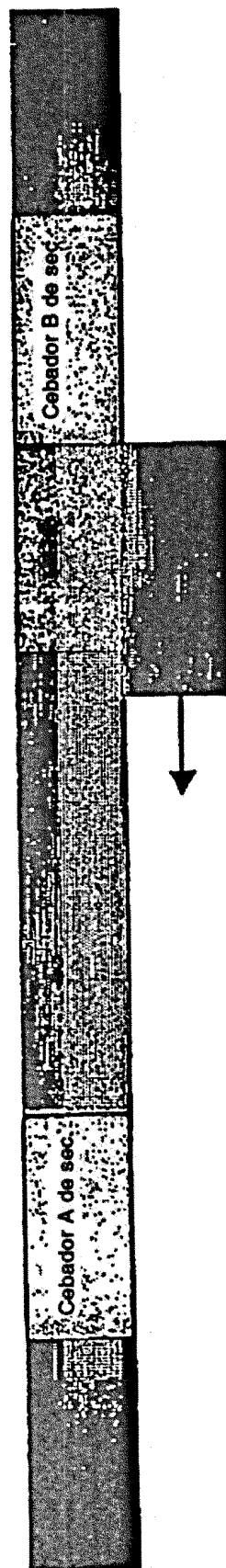




Figura 27

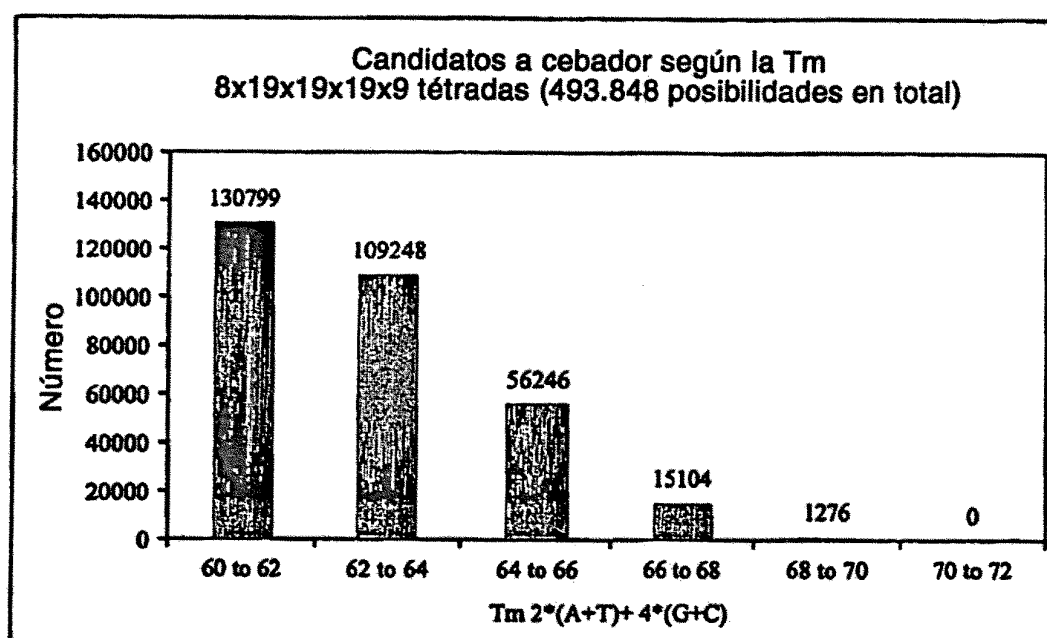


Figura 28

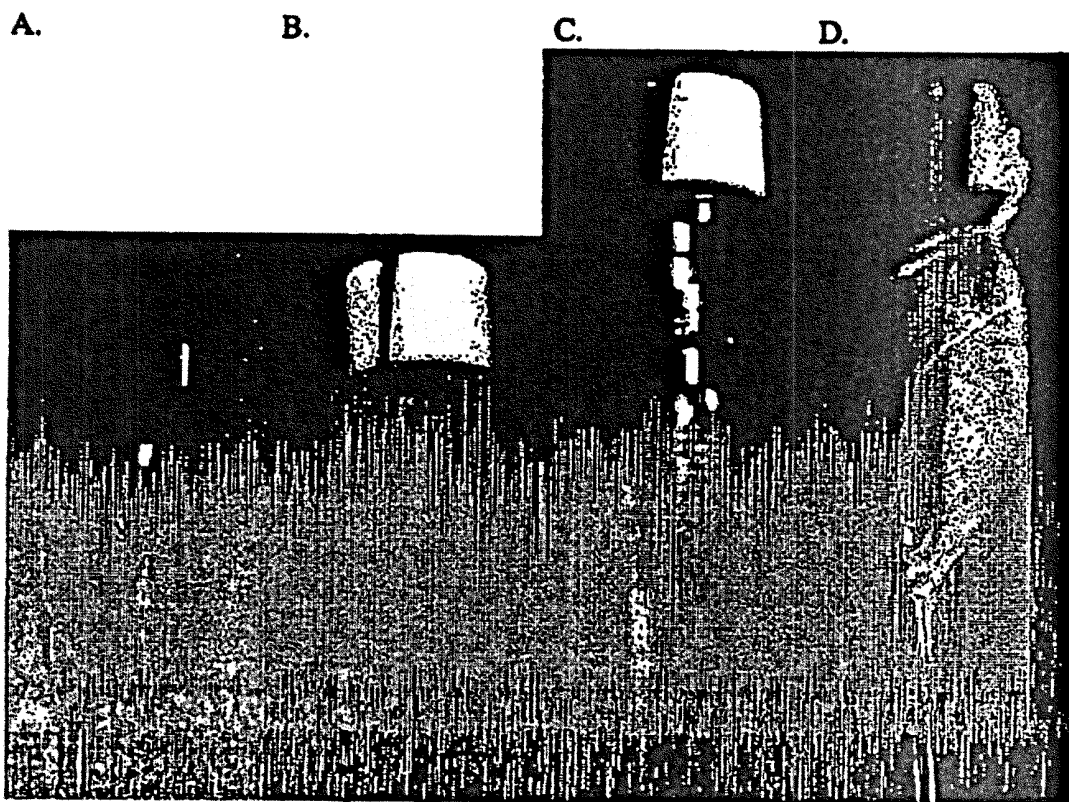


Figura 29A

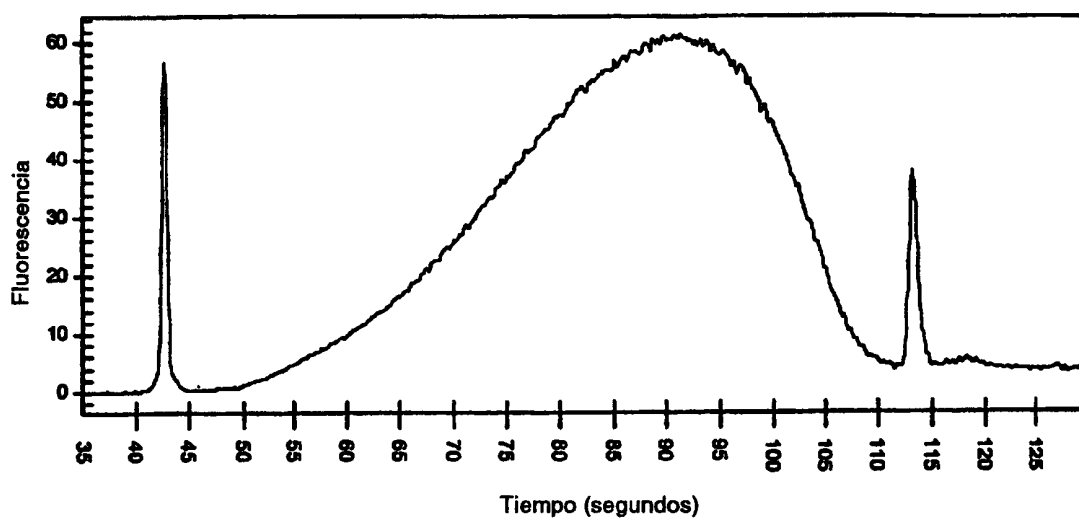
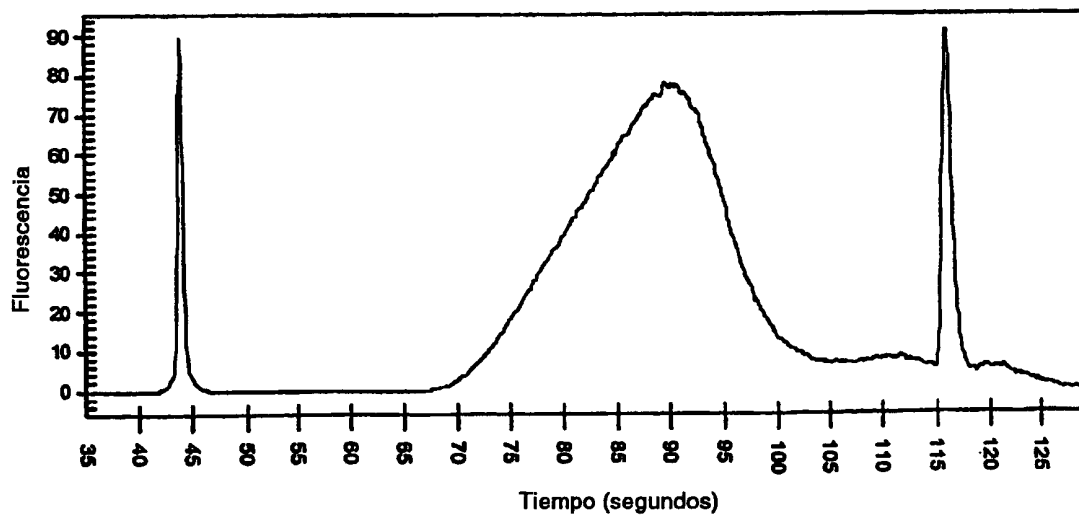


Figura 29B



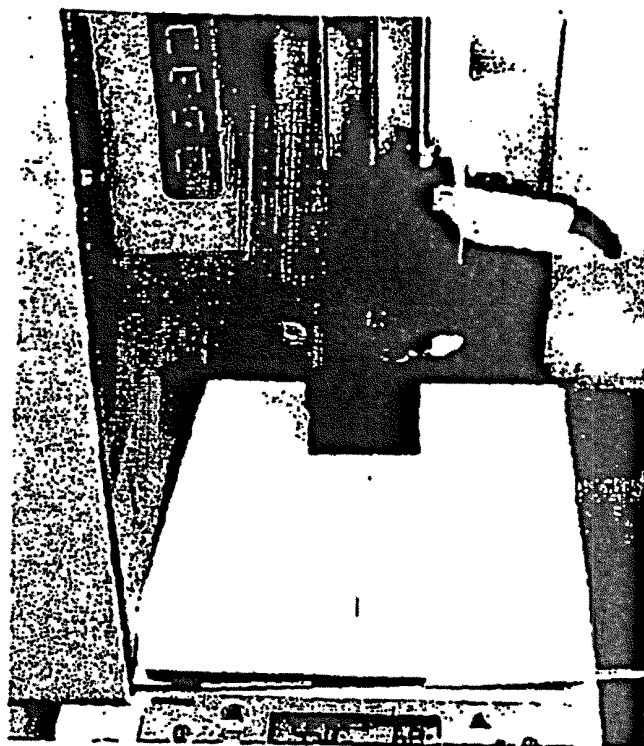


Figura 30

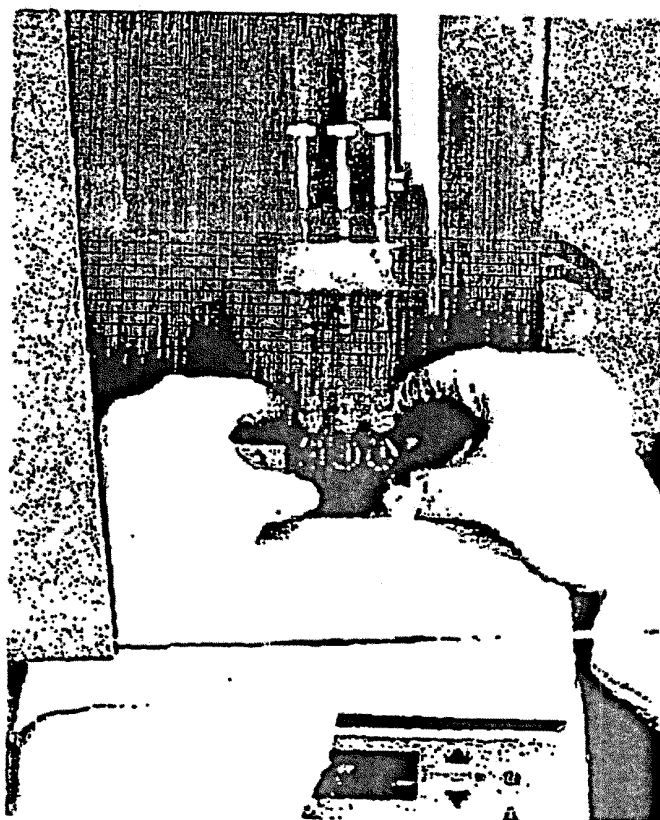


Figura 31

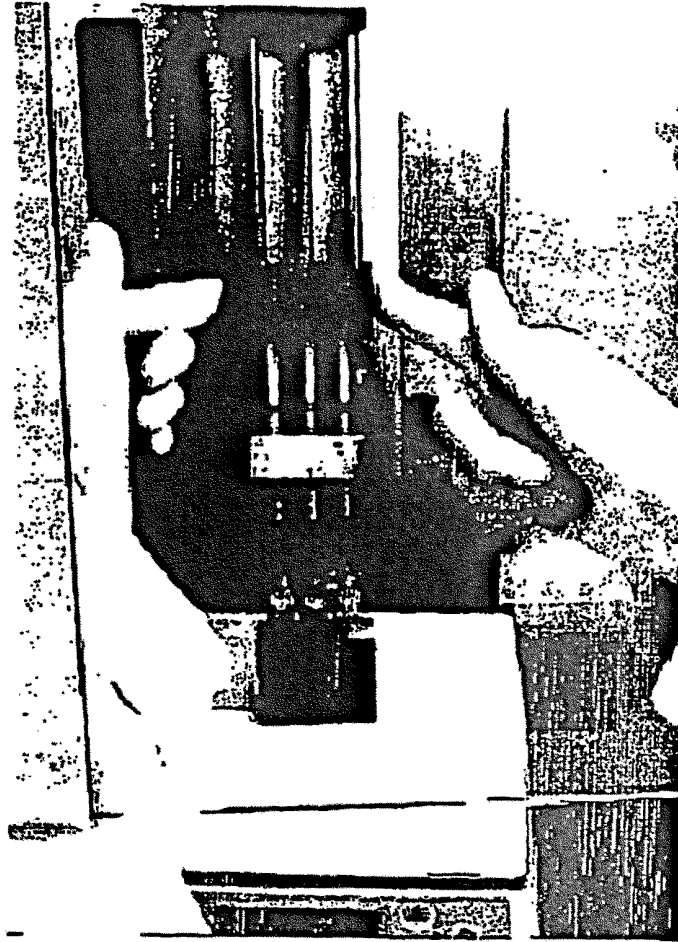


Figura 32

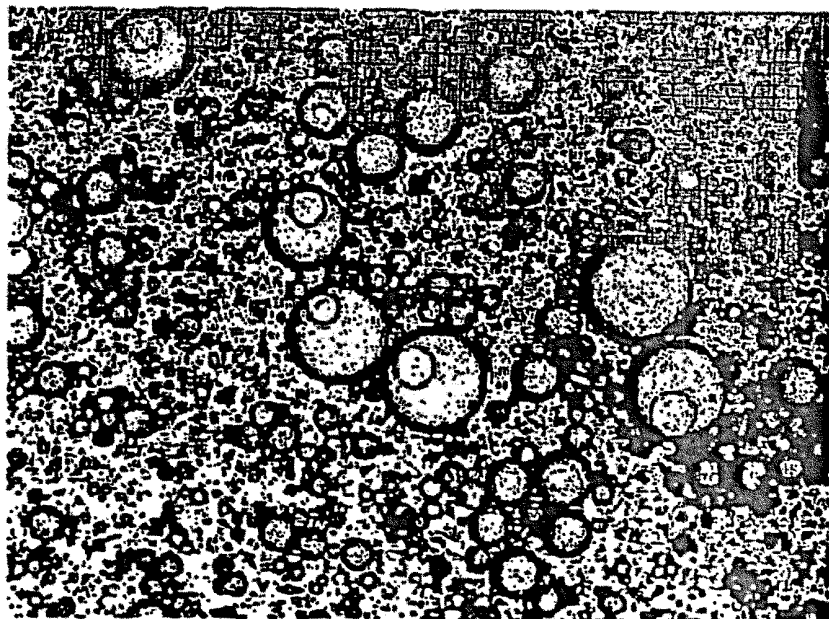
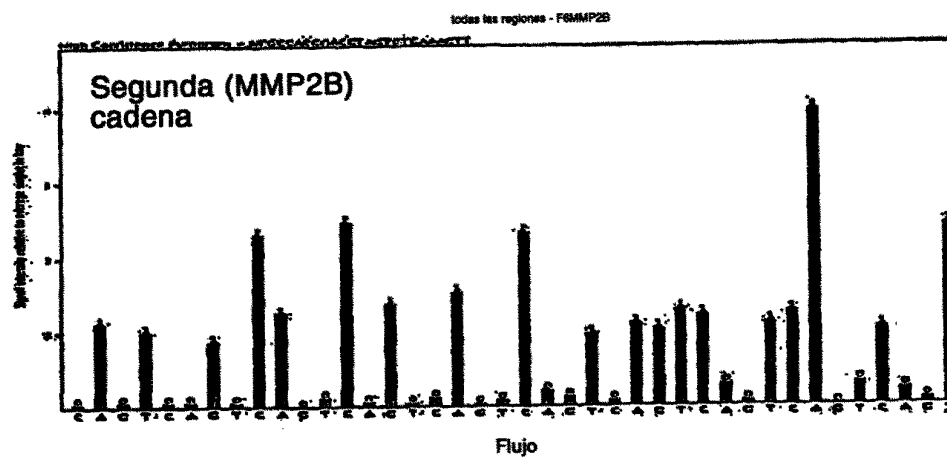
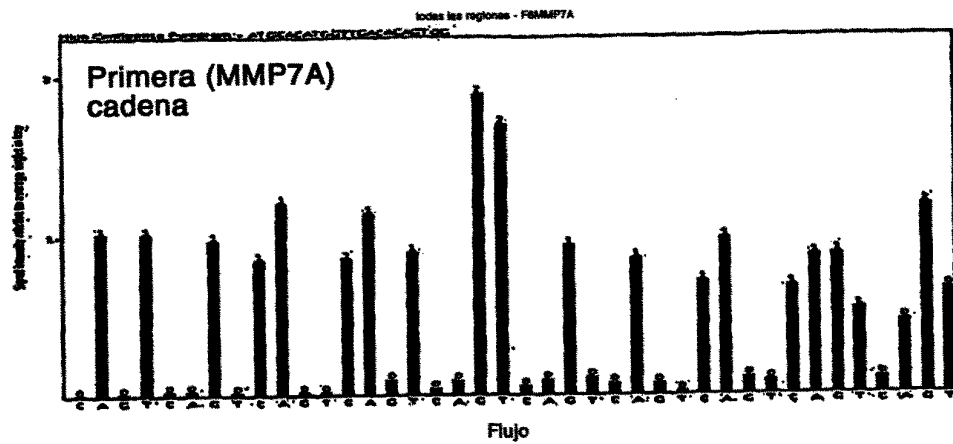


Figura 33

**FIGURA 34**

Muestra	Localización (pocillo)	Secuencia	Longitud de correspondencia perfecta
F8_14_1	pocillo 00001_1362_1660	ATGCACATGGTTGACACAGTGGT	22

ATGC ACATGGTTGACACAGTGG

ATC CACCGACTAGTCTCAAGT

Muestra	Localización (pocillo)	Secuencia	Longitud de correspondencia perfecta
F6 14 1		ATGCCACCGACCTAGTCTCAAACCT	25

Fig. 35

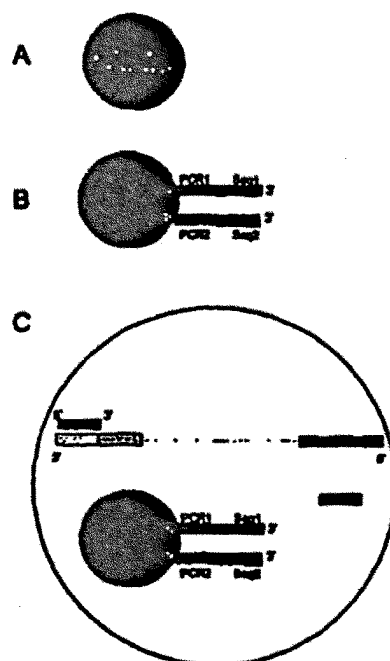
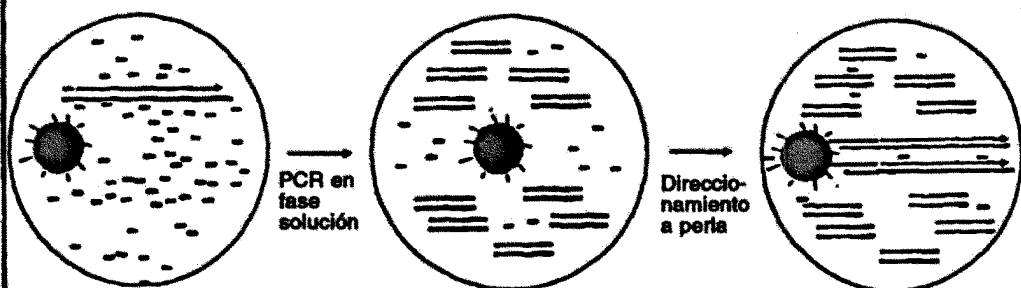


Fig. 36



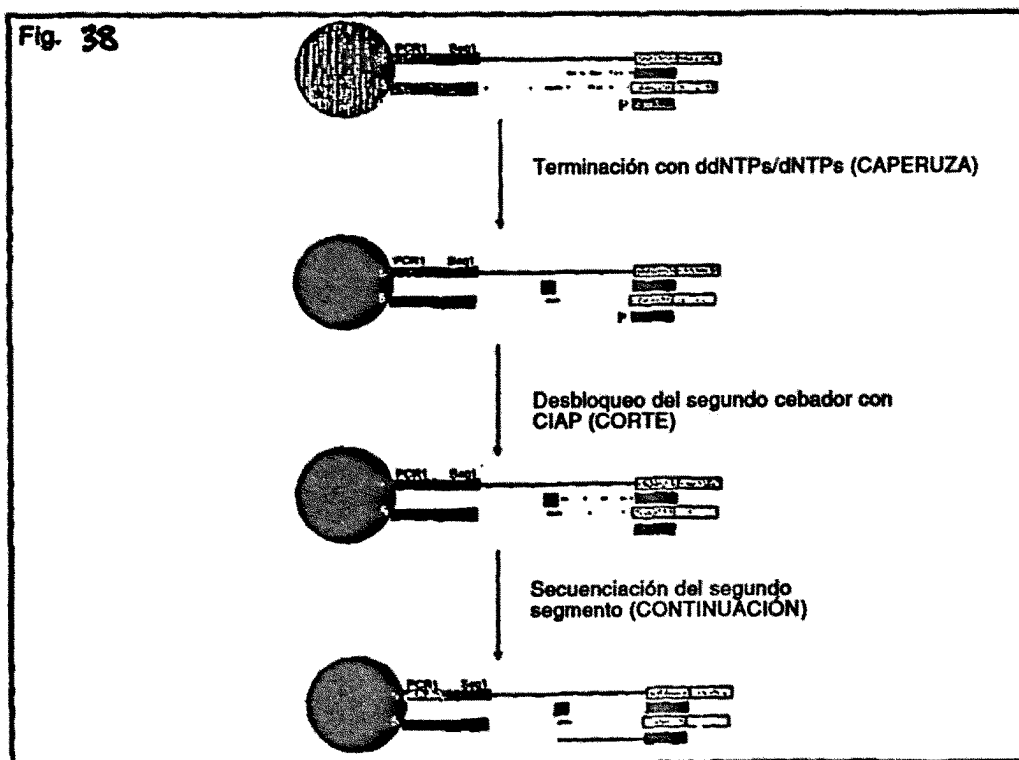
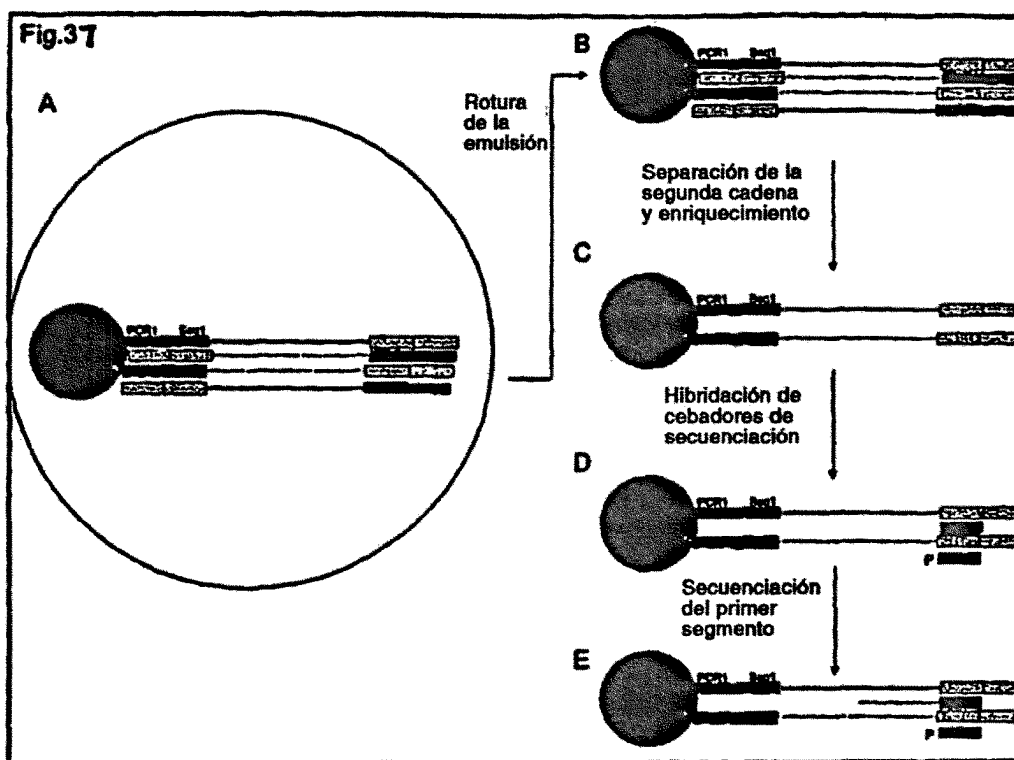
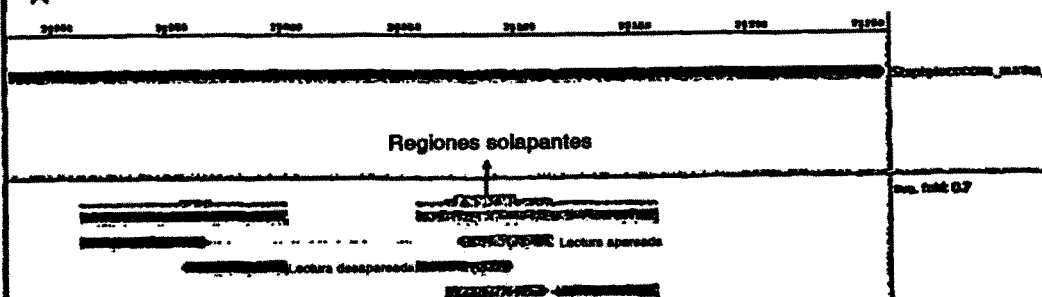




Fig. 39

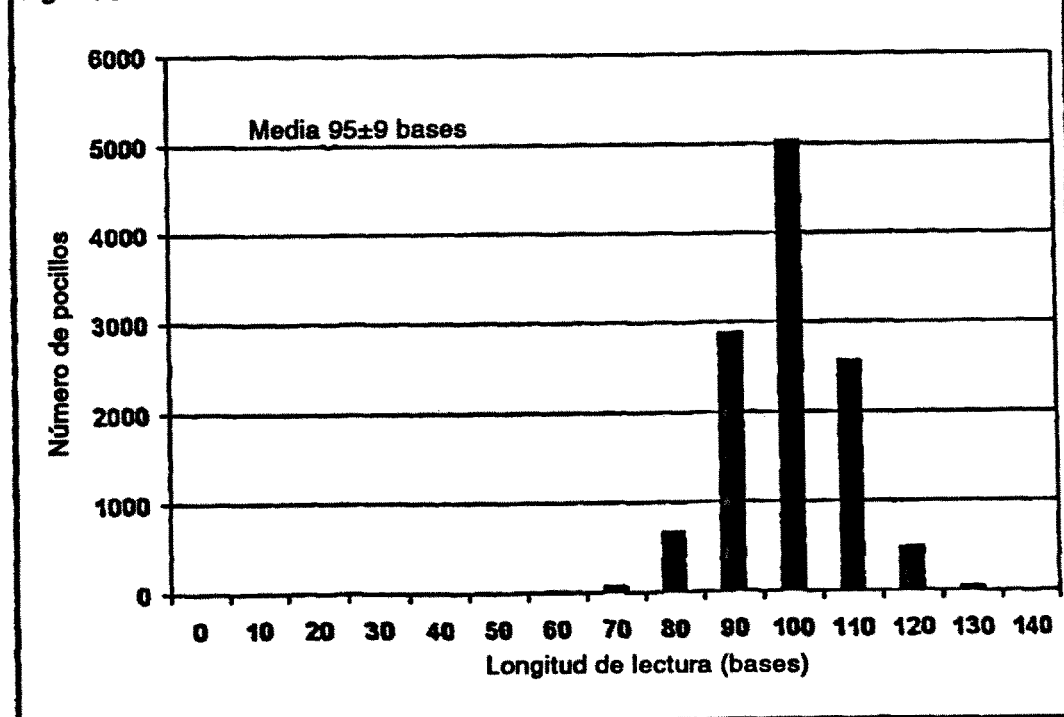
A

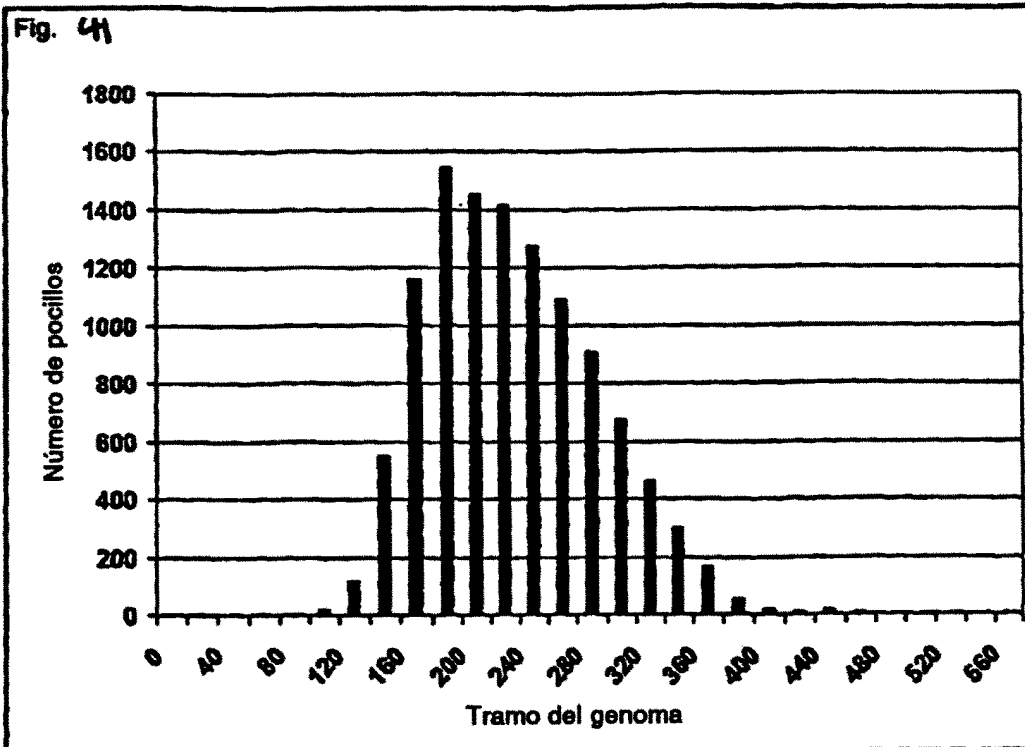


B

Nº total de lecturas	31,785
Total de primeras cadenas	15,770
Total de segundas cadenas	16,015
Lecturas de cadenas apareadas	11,799
Lecturas de cadenas desapareadas	8,187
Cobertura total	38%

Fig. 40





**Fig. 42**

Pocillo	Posición del genoma	Orientación	Serie alineada
00364 0548 2509	571366	F	TATTGTTGATGCTGTAAAA <sub>5</sub> GAAGCTACTGGTGTAGIATTTTATGAAGTT
00364 0548 2509 02	571512	R	TGCTCAAAGAATTCATTAAATATGACCATATTTCAITGTATCTTT
00383 0585 2232	1487890	R	AAGCGAACAGTCAAGTACCACAGTCAGTTGACITTTACACAAGCGGAT
00383 0585 2232 02	1487769	F	TACAGGTGTTGGTATGCCATTTCGCAITTGTTGCGCTTGGTTAGCCG
00397 0940 2923	2611039	F	AACATATAACATCCCCATCTCAATTCGCGCTCCATGTA <sub>5</sub> CAAAAAAAGC
00397 0940 2923 02	2611164	R	TAGATATCACTTCGGTGTACTGG <sub>7</sub> AATGCAGGCATGAG
00417 0811 1933	122001	R	ATTCAACTCTGGAAATGCTTCTTGATACGCCCTCGATGATG
00417 0811 1933 02	121930	F	GATGAGGAGCTGCAATGGCAATGGGTAAAGGCATCATCG
00434 0595 0893	2022591	R	TGTATCTCBATTGGATTAGTTGCTTTTGCATCTTCATTAGACC
00434 0595 0893 02	2022473	F	CATTACATCTGCACCAGAAATAGCTTCTAATACGATTGC
00443 1003 0754	107373	F	GCGACGACGTCCAGCTAATAACGCTGCACCTAAGGCTAATGATAAT
00443 1003 0754 02	107502	R	AAACCATGCAGATGCTAACAAAGCTCAAGCATTACAGAAACT
00454 1257 3047	59038	R	TGTTGCTGCATCATAATTAATACTACATCATTTAATCTTTGG
00454 1257 3047 02	58880	F	GCAGATGGTGTGACTAACCAAGTTGGTCAAAATGCCCTAAATACAAAGAT

## ES 2 330 339 T3

### LISTA DE SECUENCIAS

<110> 454 CORPORATION

5 <120> MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> 21465-510

10 <140> PCT/US04/002570

<141> 2004-01-28

15 <150> 60/443.471

<151> 2003-01-29

<150> 60/465.071

20 <151> 2003-04-23

<150> 60/476.602

<151> 2003-06-06

25 <150> 60/476.504

<151> 2003-06-06

30 <150> 60/476.313

<151> 2003-06-06

<150> 60/476.592

35 <151> 2003-06-06

<150> 60/497.985

<151> 2003-08-25

40 <160> 63

<170> PatentIn ver. 3.3

45 <210> 1

<211> 44

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de adaptador sintético

55 <400> 1

cgtttccct ggtgccttg ccatctgtc cctccctgc atgc

44

60 <210> 2

<211> 40

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 330 339 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de adaptador sintético	
5	<400> 2	
	gcatgacagg gaggggaacag atggcaaggc acacagggga	40
10	<210> 3	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de adaptador sintético	
20	<400> 3	
	gcatgacacg caacagggga tagggacacg cacgcaacag	40
25	<210> 4	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de adaptador sintético	
35	<400> 4	
	ccatctgttg cgtgcgtgtc cctatccct gttgcgtgtc atgc	44
40	<210> 5	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucléotido sintético	
50	<400> 5	
55	<b>tcgtgtgagg tctcagcatc ttatgtatat ttacttctat tctcagttgc ctaagctgca 60</b> <b>gcca 64</b>	
	<210> 6	
	<211> 24	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	

## ES 2 330 339 T3

	<400> 6	
	gacctcacac gatggctgca gctt	24
5	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
15	<400> 7	
	gacctcacac gatggctgca gctt	24
20	<210> 8	
	<211> 64	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
30	<400> 8	
35	<b>tttatatgta ttctacgact ctggagtgtg ctaccgacgt cgaatccggt gactcttatt</b> <b>ttca</b>	<b>60</b> <b>64</b>
	<210> 9	
40	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
50	ctagctcgta catataaatg aagataagat cctg	34
	<210> 10	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 10	
65	gacctcacac gagtagcatg gctgcagctt	30

## ES 2 330 339 T3

	<210> 11	
	<211> 64	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
10	<400> 11	
	<b>tcgtgtgagg tctcagcatc ttatgtatat ttacttctat tctcagttgc ctaagctgca</b>	<b>60</b>
15	<b>gccca</b>	<b>64</b>
	<210> 12	
	<211> 40	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
25	<400> 12	
	gcttacctga ccgacctctg cctatcccct gttgcgtgtc	40
30	<210> 13	
	<211> 40	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
40	<400> 13	
	ccattcccca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgtc	40
45	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
55	<400> 14	
	gcttacctga ccgacctctg	20
60	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 330 339 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
5	<400> 15	
	ccattcccca gctcgtcttg	20
10	<210> 16	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
20	<400> 16	
	ccattcccca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgtc tcag	44
25	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
35	<400> 17	
	ccatctgttc cctccctgtc	20
40	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
50	<400> 18	
	cctatcccct gttgcgtgtc	20
55	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
65	<400> 19	
	cgtttcccct ggtgccttg	20

## ES 2 330 339 T3

	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
10	<400> 20	
	ccatctgttg cgtgcgtgtc	20
15	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
25	<400> 21	
	ccatctgttc cctccctgtc	20
30	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
40	<400> 22	
	cctatcccct gttgcgtgtc	20
45	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
55	<400> 23	
	ccatctgttg cgtgcgtgtc	20
60	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	



## ES 2 330 339 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
5	<400> 24	
	cgtttccct gtgtgccttg	20
10	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
20	<400> 25	
	catctgtgcc actaggctct	20
25	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
35	<400> 26	
	ccatctgttg cgtgcgtgc	20
40	<210> 27	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
50	<400> 27	
	accagcactc gcaccacc	18
55	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
65	<400> 28	
	cgtttccct gtgtgccttg	20

## ES 2 330 339 T3

	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
10	<400> 29	
	tacctctccg cgtaggcg	18
15	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
25	<400> 30	
	ccatctgttg cgtgcgtgtc	20
30	<210> 31	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
40	<400> 31	
	ccccggacga gacgcag	17
45	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
55	<400> 32	
	atctctgcct actaacctg aag	23
60	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 330 339 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
5	<400> 33	
	catcttgctc actaggctct	20
10	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
20	<400> 34	
	gtttctctcc agcctctcac cga	23
25	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
35	<400> 35	
	accagcactc gcaccacc	18
40	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
50	<400> 36	
	atctctgcct actaacatg aag	23
55	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
65	<400> 37	
	tacctctccg cgtaggag	18

## ES 2 330 339 T3

	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
10	<400> 38	
	gtttctctcc agcctctcac cga	23
15	<210> 39	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
25	<400> 39	
	ccccggacga gacgcag	17
30	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
40	<400> 40	
	cgtttcccct gtgtgccttg	20
45	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético	
55	<400> 41	
	ccatctgttg cgtgcgtgtc	20
60	<210> 42	
	<211> 27	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 330 339 T3

	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético		
5	<400> 42		
	ctagctagca tggaagcgcc agcagca		27
10	<210> 43		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético		
20	<400> 43		
	ccgggatccc tcgatgacga ccagcggc		28
25	<210> 44		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético		
35	<400> 44		
	atgcacatgg ttgacacagt ggt		23
40	<210> 45		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleotido sintético		
50	<400> 45		
	atgcacatgg ttgacacagt gg		22
55	<210> 46		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético		
65	<400> 46		
	atgccaccga cctagtctca aactt		25

## ES 2 330 339 T3

	<210> 47	
	<211> 51	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
10	<400> 47	
	tattgttgat gctgtaaaaa gaagctactg gtgtagtatt ttatgaagt t	51
15	<210> 48	
	<211> 47	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
25	<400> 48	
	tgctcaaaga attcatttaa aatatgacca tatttcattg tatcttt	47
30	<210> 49	
	<211> 48	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
40	<400> 49	
	aagcgaacag tcaagtacca cagtcagttg acttttacac aagcggat	48
45	<210> 50	
	<211> 47	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
55	<400> 50	
	tacagtggtt ggtatgcat ttgcgatttg ttgcgcttgg ttagccg	47
60	<210> 51	
	<211> 52	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 330 339 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
5	<400> 51	
	aacatataaa catccctat ctcaatttc gcttccatgt aacaaaaaa gc	52
10	<210> 52	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
20	<400> 52	
	tagatatcac ttgcgtgta ctggtaatgc aggcattgag	39
25	<210> 53	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
35	<400> 53	
	attcaactct ggaaatgctt tcttgatacg cctcgatgat g	41
40	<210> 54	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
50	<400> 54	
	gatgaggagc tgcaatggca atgggttaaa ggcattcatcg	40
55	<210> 55	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
65	<400> 55	
	tgtatctcga ttggattag ttgcttttg catcttcatt agacc	45

## ES 2 330 339 T3

	<210> 56	
	<211> 40	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
10	<400> 56	
	cattaacatc tgcaccagaa atagcttcta atacgattgc	40
15	<210> 57	
	<211> 46	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
25	<400> 57	
	gcgacgacgt ccagctaata acgtgcacc taaggctaata gataat	46
30	<210> 58	
	<211> 43	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
40	<400> 58	
	aaaccatgca gatgctaaca aagctcaagc attaccagaa act	43
45	<210> 59	
	<211> 44	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
55	<400> 59	
	tgttgctgca tcataattta atactacatc atttaattct ttgg	44
60	<210> 60	
	<211> 51	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	



## ES 2 330 339 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

5 <400> 60

gcagatggtg tgactaacca agttggtcaa aatgccctaa atacaaaaga t

51

10 <210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: etiqueta 6xHis sintética

20 <400> 61

**His His His His His His**  
**1 5**

25

<210> 62

<211> 64

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 62

40 **acttctattc tcagttgcct aagctgcagc catcgtgtga ggtctcagca tcttatgtat 60**  
**attt 64**

<210> 63

45 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

55 <400> 63

gtcctagaat agaagtaaat atacatgctc ga

32

60

65