

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 158**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2021 PCT/EP2021/084559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2022 WO22128615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2021 E 21834753 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025 EP 4263857**

54 Título: **Determinación de la cantidad y calidad de una biblioteca de ADN**

30 Prioridad:

17.12.2020 DE 102020216120

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

12.06.2025

73 Titular/es:

**ROBERT BOSCH GMBH (100.00%)
Postfach 30 02 20
70442 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, ANNE;
GRUMAZ, CHRISTIAN y
LEMUTH, KARIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 027 158 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

Determinación de la cantidad y calidad de una biblioteca de ADN

5 La presente invención hace referencia a una sonda específica de dímero adaptador y a un procedimiento para detectar dímeros adaptadores en una biblioteca de ácido desoxirribonucleico (ADN), según el concepto general de las reivindicaciones independientes.

Estado del arte

10 La publicación de Hardigan et al. CRISPR/ Cas9-targeted Removal of Unwanted Sequences From small-RNA Sequencing Libraries. Nucleic Acids Research, 2019 hace referencia a la eliminación de dímeros adaptadores de las bibliotecas de ácidos nucleicos. La eliminación se produce mediante la escisión específica de los dímeros adaptadores utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Para verificar la eliminación exitosa de los dímeros adaptadores, se describe una cuantificación de los dímeros adaptadores mediante PCR cuantitativa. Para ello, se utilizan cebadores de superposición de adaptadores. La publicación de Shore et al. Small RNA "Library Preparation Method for Next-Generation Sequencing Using Chemical Modifications to Prevent Adapter Dimer Formation". PLoS One, 2016 hace referencia a moléculas adaptadoras para la creación de bibliotecas de ácidos nucleicos secuenciables, evitando la conformación de dímeros adaptadores.

15 La solicitud WO 2014/144979 A1 revela una reducción o una inhibición de la conformación de dímeros adaptadores en la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos.

La solicitud WO 2019/222706 A1 hace referencia a la secuenciación de ADN genómico. Se proporcionan métodos relacionados con bibliotecas de polinucleótidos.

20 La solicitud WO 2009/106308 A2 describe el procesamiento de ácidos nucleicos para crear bibliotecas de ácidos nucleicos secuenciables.

La solicitud WO 2015/044412 A1 revela moléculas adaptadoras para crear bibliotecas de ácidos nucleicos secuenciables y evitar la conformación de dímeros adaptadores.

25 La solicitud US 2016/289755 A1 revela una estimación de dímeros adaptadores en bibliotecas NGS mediante el uso de la técnica ddPCR.

30 Hoy en día, para secuenciar muestras de ADN se utilizan casi exclusivamente métodos de secuenciación de nueva generación (del inglés: Next Generation Sequencing, NGS). El término NGS hace referencia a toda una serie de métodos de secuenciación diferentes, todos los cuales se caracterizan esencialmente porque se pueden realizar un gran número de pruebas de forma automática en paralelo y en un corto período de tiempo. Utilizando NGS, por ejemplo, es posible descubrir nuevos genes relevantes para enfermedades y mutaciones genéticas causantes de enfermedades, es decir, cambios en el genoma. Estos hallazgos ayudan a comprender procesos biológicos fundamentales y obtener información sobre el desarrollo de enfermedades hereditarias.

35 Uno de los métodos NGS es la secuenciación de amplicones (o secuenciación dirigida por el inglés: amplicon sequencing o targeted sequencing), en la que las longitudes de los fragmentos de ADN a secuenciar ya se conocen antes de ejecutar la secuenciación debido a una correspondiente preparación de la muestra.

40 En la NGS se realiza una cuantificación precisa y un análisis de calidad de la biblioteca de ADN antes de cada ejecución de secuenciación para garantizar una ejecución de secuenciación exitosa. La cuantificación determina la concentración de fragmentos en la biblioteca de ADN. El análisis de calidad implica, por ejemplo, determinar las longitudes de los fragmentos de ADN que se van a secuenciar y determinar la conformación de dímeros adaptadores no deseados u otros artefactos. La cuantificación y el análisis de calidad se realizan de forma independiente entre sí mediante diferentes métodos y tecnologías.

Revelación de la presente invención

45 De acuerdo con la invención, se proporciona una sonda específica de dímero adaptador así como un procedimiento para detectar dímeros adaptadores en una biblioteca de ADN, que presentan las características distintivas de las reivindicaciones independientes.

Aunque los métodos NGS disponibles difieren en los reactivos y protocolos a utilizar, los pasos de procedimiento esenciales son los mismos para todos los métodos NGS. En primer lugar, el ADN que se va a

5 secuenciar debe estar preparado para la secuenciación. Para ello, la muestra de ADN a secuenciar se corta enzimática o mecánicamente en pequeños fragmentos. La longitud de los fragmentos de ADN depende del correspondiente método. A continuación, a los dos extremos libres de los fragmentos de ADN se unen fragmentos cortos de ADN producidos artificialmente, conocidas como moléculas adaptadoras, por lo general a través de un paso de ligación. Las moléculas adaptadoras están diseñadas para presentar una secuencia de nucleótidos complementaria a los cebadores utilizados. Los cebadores son oligonucleótidos con una secuencia de nucleótidos conocida que sirven como punto de partida para las enzimas que replican el ADN, como las ADN polimerasas.

10 Con el fin de proporcionar un número suficiente de copias de fragmentos de ADN para la secuenciación, los fragmentos de ADN flanqueados por moléculas adaptadoras se amplifican, por ejemplo, mediante métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: polymerase chain reaction, PCR). Cuando el ADN está fragmentado, provisto de moléculas adaptadoras y específicamente enriquecido, se habla de una biblioteca de ADN (DNALibrary).

15 La PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés: real-time quantitative PCR, qPCR), en la que los fragmentos de ADN amplificados se cuantifican en tiempo real durante un ciclo de PCR, resulta particularmente adecuada para cuantificar la biblioteca de ADN. La cuantificación se realiza, por ejemplo, mediante mediciones de fluorescencia. A los fragmentos de ADN se incorporan colorantes fluorescentes, por lo que la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de fragmentos de ADN amplificados.

20 Al preparar bibliotecas de ADN, las moléculas adaptadoras no sólo se unen a los extremos libres de los fragmentos de ADN que se van a amplificar, sino que también se pueden combinar entre sí para conformar dímeros adaptadores. Estos son indeseados y distorsionan el resultado tanto en la cuantificación de los fragmentos en la biblioteca de ADN como en la secuenciación posterior. Durante la cuantificación, el número de fragmentos de ADN flanqueados por moléculas adaptadoras parece mayor de lo que es en realidad cuando hay dímeros adaptadores, ya que los fragmentos de dímeros adaptadores también se cuantifican. Para evaluar la cuantificación de fragmentos en una biblioteca de ADN y controlar la conformación de artefactos como dímeros adaptadores, se deben ejecutar métodos adicionales de control de calidad además de la qPCR.

30 Según la presente invención, se revela una sonda específica de dímero adaptador para la detección de dímeros adaptadores, en particular, en una biblioteca de ADN. La sonda específica del dímero adaptador comprende una etiqueta por la cual resulta detectable. Esta etiqueta consiste en particular en un fluoróforo, de modo que la radiación de fluorescencia se detecta cuando el fluoróforo se excita con luz de una determinada longitud de onda. Alternativamente, la etiqueta de la sonda específica del dímero adaptador es una etiqueta quimioluminiscente mediante la cual se detecta la emisión de luz como resultado de una reacción química (quimioluminiscencia) o una reacción enzimática (bioluminiscencia). Alternativamente, el etiquetado de la sonda específica del dímero adaptador es una etiqueta radiactiva en la que se detecta la radiación radiactiva o un componente redox-activo cuya actividad se detecta por métodos electroquímicos.

40 La sonda específica del dímero adaptador se trata, por ejemplo, de una sonda TaqMan, que comprende un supresor de señal. En el caso de un fluoróforo como etiqueta, por ejemplo, el supresor de señal borra la señal de fluorescencia del fluoróforo transfiriendo el fluoróforo al menos parte de su energía al supresor de señal cuando es excitado por una fuente de luz.

45 La supresión sólo ocurre cuando el supresor de señal y el fluoróforo están en estrecha proximidad espacial entre sí. Durante la amplificación del ADN, en particular de la cadena de ADN complementaria, por ejemplo, mediante una polimerasa, la sonda unida covalentemente a la cadena de ADN se degrada. Esto hace que el supresor de señal y el fluoróforo se alejen uno del otro y se puede medir el aumento de la fluorescencia del fluoróforo.

La sonda específica del dímero adaptador está diseñada para unirse específicamente a una primera secuencia de nucleótidos adaptadores de una primera molécula adaptadora y a una segunda secuencia de nucleótidos adaptadores de una segunda molécula adaptadora.

50 Una ventaja de la sonda específica del dímero adaptador según la invención consiste en que los dímeros adaptadores se unen directa y específicamente a la sonda específica del dímero adaptador y, por lo tanto, se pueden detectar de forma rápida y sencilla. Por lo tanto, no son necesarios otros procedimientos costosos y que requieren mucho tiempo para la detección de dímeros adaptadores.

55 Además, se revela un procedimiento para detectar dímeros adaptadores en una biblioteca de ADN durante la qPCR, en donde la biblioteca de ADN comprende fragmentos de ADN flanqueados en ambos extremos libres por moléculas adaptadoras y dímeros adaptadores.

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

a) Adición de una sonda específica de dímero adaptador a una preparación de qPCR que comprende la biblioteca de ADN

5 b) Determinación del número de dímeros adaptadores contenidos en la biblioteca de ADN mediante la señal enviada por la sonda específica del dímero adaptador

c) Cálculo del número real de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN considerando el número determinado de dímeros adaptadores.

10 En general, la qPCR es un método muy preciso para determinar la concentración de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN, ya que solo se amplifican y, por lo tanto, se cuantifican los fragmentos específicamente unidos al adaptador. Sin embargo, cuando también se han conformado dímeros adaptadores, los cebadores también se unen a ellos durante la qPCR, de modo tal que también se cuantifican los dímeros adaptadores. En este caso, la concentración de ADN medida es superior a la real.

15 Por lo tanto, para una cuantificación precisa convencionalmente es necesario determinar las longitudes de los fragmentos contenidos en la biblioteca de ADN utilizando otro método, por ejemplo, electroforesis en gel o, eventualmente, electroforesis en gel capilar, para poder calcular el número real de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN. El número de dímeros adaptadores se resta del número de fragmentos de ADN.

20 Una ventaja del procedimiento según la invención consiste en que el número de dímeros adaptadores en la biblioteca de ADN se determina en tiempo real directamente durante la qPCR mediante la sonda específica del dímero adaptador. Por lo tanto, no son necesarios métodos que requieren mucho tiempo y trabajo, como una determinación de las longitudes de los fragmentos de ADN y de los dímeros adaptadores en la biblioteca de ADN, especialmente cuando se conocen las longitudes de los fragmentos de ADN, como es el caso, por ejemplo, de una biblioteca de ADN para la secuenciación de amplicones. Cuando se conocen las longitudes de los fragmentos de ADN, se puede calcular el número de fragmentos de ADN a partir de la cuantificación corregida sin necesidad de métodos y procedimientos de análisis adicionales después de la qPCR. La ventaja
25 en este caso consiste en que mediante la sonda según la invención y el procedimiento según la invención se ahorran pasos de trabajo, así como tiempo, recursos financieros y materiales.

El número determinado de dímeros adaptadores también puede ser una característica de calidad que determina si la biblioteca de ADN se puede utilizar para una secuenciación posterior.

Otras formas de ejecución ventajosas resultan de las reivindicaciones relacionadas.

30 En una forma de ejecución particularmente ventajosa del procedimiento, a la preparación de qPCR

en el paso a) se añade además al menos una sonda específica del adaptador para una primera molécula adaptadora; y

en el paso b) se determina adicionalmente el número de las primeras moléculas adaptadoras contenidas mediante la señal enviada por la sonda específica del adaptador; y

35 en el paso c) se calcula el número real de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN considerando el número determinado de dímeros adaptadores y el número determinado de primeras moléculas adaptadoras.

40 La ventaja en este caso consiste en que tanto el número de dímeros adaptadores en la biblioteca de ADN se detecta en tiempo real directamente durante la qPCR usando la sonda específica del dímero adaptador, como también el número de primeras moléculas adaptadoras usando la sonda específica del adaptador. La sonda específica del adaptador se une tanto a las primeras moléculas adaptadoras que flanquean los fragmentos de ADN como a las primeras moléculas adaptadoras de los dímeros adaptadores. La sonda específica del adaptador se utiliza para detectar el número total de primeras moléculas adaptadoras. Para calcular el número real de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN, el número de dímeros adaptadores detectados
45 se resta del número de primeras moléculas adaptadoras detectadas. Por lo tanto, no son necesarios métodos que requieren mucho tiempo y trabajo para determinar el número real de fragmentos de ADN, como por ejemplo una determinación de las longitudes de los fragmentos de ADN y de los dímeros adaptadores en la biblioteca de ADN.

Durante la qPCR, se ejecuta en paralelo una cuantificación de los fragmentos contenidos en la biblioteca de ADN mediante la señal de la sonda específica del adaptador y una determinación de la calidad de la biblioteca de ADN mediante la señal de la sonda específica del dímero del adaptador. Esto permite ahorrar pasos de trabajo, así como tiempo y recursos financieros y materiales.

- 5 El número determinado de dímeros adaptadores también puede ser una característica de calidad que determina si la biblioteca de ADN se puede utilizar para una secuenciación posterior.

En otra forma de ejecución ventajosa del procedimiento, la cantidad de ADN que se utilizará para la secuenciación posterior, en particular la secuenciación NGS, se determina basándose en el cálculo del número real de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN.

- 10 Determinar el número exacto de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN para la secuenciación del ADN es de suma importancia. Cuando la carga de ADN en el secuenciador es demasiado baja, no se aprovecha todo el potencial, lo que resulta antieconómico. Cuando la carga es demasiado alta, las señales de secuenciación ya no podrán leerse correctamente. La ventaja es que el número real calculado de fragmentos de ADN en la biblioteca de ADN se puede utilizar para calcular la cantidad óptima de ADN a utilizar, garantizando así una carga óptima del secuenciador.

Además, el número determinado de dímeros adaptadores es fundamental para determinar si la biblioteca de ADN se puede utilizar para la secuenciación. Cuando la proporción de dímeros adaptadores es demasiado alta, no se debe utilizar.

- 20 Resulta ventajoso cuando el procedimiento es una secuenciación de amplicones en la que se conoce la longitud de los fragmentos de ADN.

- 25 La ventaja aquí es que la longitud de los fragmentos de ADN se conoce a través de la preparación específica de la muestra. Dependiendo de la preparación de qPCR, este parámetro es necesario para calcular la cantidad y calidad de la biblioteca de ADN a fin de utilizar la cantidad óptima de ADN para la secuenciación de amplicones. Al elegir la secuenciación de amplicones, se pueden eliminar procedimientos adicionales, en particular para determinar la longitud de los fragmentos de ADN, ahorrando así tiempo, costes y pasos de trabajo.

El objeto de la revelación, sin que sea parte de la invención, consiste además en un cartucho, en particular un cartucho microfluídico, como se describe, por ejemplo, en las solicitudes DE102016222072A1 o DE102016222075A1, en donde el cartucho está diseñado para ejecutar el procedimiento según la invención.

- 30 Los pasos de proceso descritos para la detección en tiempo real de dímeros adaptadores de una biblioteca de ADN durante una qPCR o para la detección en tiempo real de dímeros adaptadores y primeras moléculas adaptadoras de una biblioteca de ADN durante una qPCR se ejecutan entonces todos dentro del cartucho. La secuenciación posterior, por ejemplo, también tiene lugar dentro del cartucho. Los pasos preparatorios para la qPCR también se realizan dentro del cartucho.

- 35 Especialmente en un sistema microfluídico, un control combinado de cantidad y calidad es ventajoso ya que no es necesario implementar métodos adicionales.

Alternativamente, todos los pasos descritos se realizan de manera manual.

Breve descripción del dibujo

- 40 En los dibujos se representan formas de ejecución de la presente invención y se explican en detalle en la siguiente descripción de las figuras. Las figuras muestran:

Figura 1: Representación esquemática de una sonda específica de dímero adaptador según la invención para la detección de dímeros adaptadores.

- 45 Figura 2: Representación esquemática de un procedimiento según la invención para la detección de dímeros adaptadores en una biblioteca de ADN durante una qPCR en una primera forma de ejecución.

Figura 3: Representación esquemática del procedimiento según la invención para la detección de dímeros adaptadores en una biblioteca de ADN durante una qPCR en una segunda forma de ejecución.

Figura 4: Representación esquemática de un cartucho diseñado para la ejecución del procedimiento según la figura 3.

Formas de ejecución de la presente invención

5 En la figura 1 se muestra una sonda 33 específica de dímero adaptador según la invención para la detección de dímeros adaptadores 3, en particular, en una biblioteca de ADN.

10 La sonda específica del dímero adaptador 33 comprende una primera secuencia de nucleótidos de ADN 8a que es complementaria a una parte de la secuencia de nucleótidos del adaptador de una primera molécula adaptadora 2a y una segunda secuencia de nucleótidos de ADN 8b que es complementaria a una parte de la secuencia de nucleótidos del adaptador de una segunda molécula adaptadora 2b. Mediante la primera y segunda 8a, 8b secuencias de nucleótidos de ADN, la sonda específica del dímero adaptador 33 se une específicamente a los dímeros adaptadores 3.

15 La sonda 33 específica del dímero adaptador comprende un fluoróforo 35 como etiqueta. Cuando el fluoróforo 35 se excita con luz de una determinada longitud de onda, emite una radiación de fluorescencia detectable. En una forma de ejecución alternativa no mostrada, la etiqueta de la sonda 33 específica del dímero adaptador es una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta radiactiva o un componente redox-activo.

La sonda 33 específica del dímero adaptador se trata, por ejemplo, de una sonda TaqMan, que comprende un supresor de señal 37. El supresor de señal 37 borra la señal de fluorescencia del fluoróforo 35 transfiriendo el fluoróforo 35 al menos parte de su energía al supresor de señal 37 cuando es excitado por la fuente de luz.

20 La supresión sólo ocurre cuando el supresor de señal 37 y el fluoróforo 35 están en estrecha proximidad espacial entre sí. Durante una amplificación del ADN, por ejemplo, mediante una polimerasa de ADN, la sonda 33 unida covalentemente a la cadena de ADN se degrada. Esto hace que el supresor de señal 37 y el fluoróforo 35 se alejen uno del otro y se puede medir el aumento de la fluorescencia del fluoróforo 35.

25 En una forma de ejecución alternativa, la sonda 33 específica del dímero adaptador es un tipo diferente de sonda.

En la figura 2 está representado un procedimiento según la invención para la detección de dímeros adaptadores 3 en una biblioteca de ADN durante una qPCR en una primera forma de ejecución.

30 En primer lugar, y no se muestra en la figura 2, se prepara una muestra de ADN de tal manera que haya fragmentos de ADN 1 presentes. Para ello, la muestra de ADN se descompone enzimática o mecánicamente en fragmentos de ADN 1 o, alternativamente, se enriquecen determinados fragmentos de ADN 1, por ejemplo mediante una PCR de amplicón (del inglés: targeted PCR). Las longitudes de los fragmentos de ADN 1 dependen del correspondiente método.

Posteriormente, y como se muestra en el paso A, se añaden a los fragmentos de ADN 1 las primeras moléculas adaptadoras 2a y las segundas moléculas adaptadoras 2b.

35 Las moléculas adaptadoras 2a, 2b son, por ejemplo, pseudo moléculas adaptadoras de doble cadena 2a, 2b y se llevan asimétricamente a los dos extremos libres 1a, 1b de los fragmentos de ADN 1, por ejemplo, mediante una ligadura. De este modo, las primeras moléculas adaptadoras 2a se unen específicamente al primer extremo libre 1a de los fragmentos de ADN 1 y las segundas moléculas adaptadoras 2b se unen específicamente al segundo extremo libre 1b de los fragmentos de ADN 1. De este modo, se conforman
40 fragmentos de ADN 21 flanqueados por moléculas adaptadoras 2a, 2b. La primera molécula adaptadora 2a presenta una secuencia de nucleótidos complementaria a un primer cebador. La segunda molécula adaptadora 2a presenta una secuencia de nucleótidos complementaria a un segundo cebador.

45 Las moléculas adaptadoras 2a, 2b no sólo se unen a los extremos libres de los fragmentos de ADN 1, sino que también se pueden combinar entre sí, aunque de forma menos eficiente, para conformar dímeros adaptadores 3. Estos son indeseados y, entre otras cosas, distorsionan el resultado de una cuantificación posterior de los fragmentos de ADN 1.

En otro paso, no mostrado en la figura, se amplifican los fragmentos de ADN flanqueados 21 y los dímeros adaptadores 3, por ejemplo, mediante un método de PCR.

Esto da como resultado una biblioteca de ADN que comprende fragmentos de ADN 1 flanqueados en ambos extremos libres por moléculas adaptadoras 2a, 2b y dímeros adaptadores 3.

5 Para determinar la cantidad de fragmentos de ADN 1 y de dímeros adaptadores 3, por ejemplo, para análisis o para secuenciar los fragmentos de ADN 1, se realiza una qPCR. Para ello, y como se muestra en el paso B, se añaden a la preparación un primer cebador 4a y un segundo cebador 4b, que sirven como punto de partida para las enzimas que replican el ADN, como la ADN polimerasa. El primer cebador 4a se une específicamente a la secuencia de nucleótidos complementaria de la primera molécula adaptadora 2a y el segundo cebador 4b se une específicamente a la secuencia de nucleótidos complementaria de la segunda molécula adaptadora 2b. En este caso, la secuencia de nucleótidos de las moléculas adaptadoras 2a, 2b complementaria a los cebadores 4a, 4b es, por ejemplo, sólo una región parcial de la secuencia de nucleótidos de las moléculas adaptadoras 2a, 2b en los respectivos extremos no unidos de las moléculas adaptadoras 2a, 2b. Además, a la preparación de qPCR se añade una sonda dímera adaptadora específica 33, como se describe por ejemplo en la figura 1.

15 La sonda 33 específica del dímero adaptador se une específicamente a una primera secuencia de nucleótidos adaptadores de una primera molécula adaptadora 2a y a una segunda secuencia de nucleótidos adaptadores de una segunda molécula adaptadora 2b. De este modo, la sonda específica del dímero adaptador 33 está diseñada para unirse específicamente a los dímeros adaptadores 3.

20 En la qPCR posterior, se amplifican los fragmentos de ADN flanqueados 21 y los dímeros adaptadores 3. Durante la amplificación de ADN, se mide la fluorescencia emitida por la sonda específica del dímero adaptador 33 después de cada ciclo y se registra una curva de fluorescencia específica del dímero adaptador 333 como se muestra en el paso C. Los ciclos de PCR se muestran en el eje x y la fluorescencia medida en el eje y. Utilizando una curva estándar, se asigna un número de moléculas a las señales de fluorescencia. Esto permite calcular el número de dímeros adaptadores 3.

25 Además, los fragmentos de ADN amplificados 1 también se cuantifican en tiempo real después de cada ciclo de PCR. En el paso D anterior, se muestra un fragmento de ADN 1, así como una etiqueta intercalante de ADN 5. La etiqueta intercalante de ADN 5, por ejemplo, un colorante fluorescente, se incorpora a los fragmentos de ADN 1 como se muestra en el paso 4 a continuación, con lo que la señal 6 de la etiqueta 5, en particular, la señal de fluorescencia, aumenta proporcionalmente con la cantidad de fragmentos de ADN amplificados 1. Además, y no se muestra en las figuras, la etiqueta intercalante de ADN 5 también se incorpora a los dímeros adaptadores 3. Aquí se detecta la concentración total de fragmentos de ADN 1 y de dímeros adaptadores 3. A partir de esto, se puede calcular una cuantificación corregida restando la concentración de dímeros adaptadores 3 de la concentración total de ADN detectada. Cuando se conocen las longitudes de los fragmentos de ADN 1, como en la preparación de muestras para la secuenciación de amplicones, se puede calcular el número real de fragmentos de ADN 1 en la biblioteca de ADN.

35 El número determinado de dímeros adaptadores 3 también puede ser una característica de calidad que determina si la biblioteca de ADN se puede utilizar para una secuenciación posterior.

En la figura 3 está representado un procedimiento según la invención para la detección de dímeros adaptadores 3 en una biblioteca de ADN durante una qPCR en una segunda forma de ejecución.

40 A diferencia del procedimiento descrito en la figura 2 en la primera forma de ejecución, además de la sonda específica del dímero adaptador 33, también se añade una sonda específica del adaptador 22 a la mezcla de qPCR en el paso B'. La sonda 22 específica del dímero adaptador se une específicamente a una primera secuencia de nucleótidos adaptadores de una primera molécula adaptadora 2a. De este modo, la sonda específica del adaptador 22 se une tanto a una primera molécula adaptadora 2a que flanquea un fragmento de ADN 1 como a una primera molécula adaptadora 2a de un dímero adaptador 3. Mediante la sonda específica del adaptador 22 se puede detectar el número total de primeras moléculas adaptadoras 2a, que es representativo del número total de fragmentos de ADN flanqueados 21.

50 En la qPCR posterior, se amplifican los fragmentos de ADN flanqueados 21 y los dímeros adaptadores 3. Durante la amplificación de ADN, se detecta la fluorescencia emitida por la sonda específica del dímero adaptador 33 después de cada ciclo y se registra una curva de fluorescencia específica del dímero adaptador 333 como se muestra en el paso C.

Además, después de cada ciclo de amplificación, se detecta la fluorescencia emitida por la sonda específica del adaptador 22 y se registra una curva de fluorescencia específica del adaptador 222 como se muestra en el paso C'. Los ciclos de PCR se muestran respectivamente en el eje x y la fluorescencia medida en el eje y.

- 5 Mediante una correspondiente curva estándar, se asigna un número de molécula a las señales de fluorescencia relacionadas con el dímero del adaptador y a las señales de fluorescencia relacionadas con el adaptador. Esto se realiza en paralelo al registro de las curvas de fluorescencia 222, 333. Para calcular el número real de fragmentos de ADN 1 en la biblioteca de ADN, el número determinado de dímeros adaptadores 3 se resta del número de las primeras moléculas adaptadoras determinadas 2a.
- 10 De manera alternativa, y no se muestra en la figura 3, la sonda específica del adaptador 22 se une específicamente a una secuencia de nucleótidos del adaptador de una segunda molécula adaptadora 2b. El número real de fragmentos de ADN 1 en la biblioteca de ADN es relevante, por ejemplo, para determinar la cantidad de moléculas de ADN que se utilizarán para una secuenciación posterior, en particular, para la secuenciación NGS.
- El número determinado de dímeros adaptadores 3 también puede ser una característica de calidad que determina si la biblioteca de ADN se puede utilizar para una secuenciación posterior.
- 15 Dependiendo del número de diferentes fragmentos de ADN 1 utilizados simultáneamente en los métodos descritos en las figuras 2 y 3, por ejemplo, y por lo tanto también de las diferentes moléculas adaptadoras 2a, 2b utilizadas, se pueden conformar diferentes artefactos, en particular, dímeros adaptadores 3. Por supuesto, en los procedimientos se pueden utilizar varias sondas específicas de secuencia quimérica diferentes para la detección de artefactos, como por ejemplo, la sonda específica de dímero adaptador 33 para la detección de dímeros adaptadores 3. Para la detección de las moléculas adaptadoras 2a, 2b se pueden utilizar, por ejemplo, múltiples sondas 22 específicas del adaptador.
- 20 La figura 4 muestra un cartucho 100, en particular, un cartucho microfluídico. El cartucho 100 está diseñado para la ejecución de un procedimiento según la segunda forma de ejecución tal como se describió anteriormente con referencia a la figura 3.
- Por lo tanto, todos los pasos descritos en la figura 3 se realizan dentro del cartucho 100. La secuenciación posterior también tiene lugar, por ejemplo, dentro del cartucho 100.
- 25 Alternativamente, y no mostrado en la figura 4, el cartucho 100 está diseñado para la ejecución de un procedimiento según la primera forma de ejecución descrita en la figura 2, en particular, con una secuenciación posterior.
- En una forma de ejecución alternativa, todos los pasos descritos se realizan de manera manual.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sonda específica de dímero adaptador (33) para detectar dímeros adaptadores (3), en particular, en una biblioteca de ADN, en donde la sonda (33) presenta una etiqueta, en particular un fluoróforo (35), y está diseñada para unirse específicamente a una primera secuencia adaptadora de nucleótidos de una primera molécula adaptadora (2a) y a una segunda secuencia adaptadora de nucleótidos de una segunda molécula adaptadora (2b).
2. Procedimiento para detectar dímeros adaptadores (3) en una biblioteca de ADN durante una qPCR, en donde la biblioteca de ADN comprende:
- 10 - fragmentos de ADN (1) flanqueados en ambos extremos libres por moléculas adaptadoras (2a, 2b), así como
- dímeros adaptadores (3)
- y en donde el procedimiento comprende los siguientes pasos:
- a) Adición de una sonda específica de dímero adaptador (33) según la reivindicación 1 a una preparación de qPCR que comprende la biblioteca de ADN
- 15 b) Determinación del número de dímeros adaptadores (3) contenidos en la biblioteca de ADN mediante la señal enviada por la sonda específica del dímero adaptador (33)
- c) Cálculo del número real de fragmentos de ADN (1) en la biblioteca de ADN considerando el número determinado de dímeros adaptadores (3).
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque a la preparación de qPCR
- 20 en el paso a) se le añade además al menos una sonda específica del adaptador (22) para una primera molécula adaptadora (2a) y
- en el paso b) se determina adicionalmente el número de las primeras moléculas adaptadoras (2a) contenidas mediante la señal enviada por la sonda específica del adaptador (22) y
- 25 en el paso c) se calcula el número real de fragmentos de ADN (1) en la biblioteca de ADN considerando el número determinado de dímeros adaptadores (3) y el número determinado de primeras moléculas adaptadoras (2a).
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque a partir del cálculo del número real de fragmentos de ADN (1) en la biblioteca de ADN, se determina la cantidad de ADN que se utilizará para la secuenciación posterior, en particular, la secuenciación NGS.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se trata de una secuenciación de amplicones en la que se conoce la longitud de los fragmentos de ADN (1).

DIBUJOS

Fig. 1

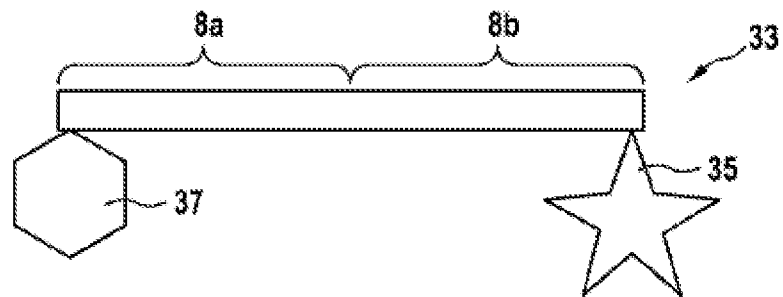


Fig. 2

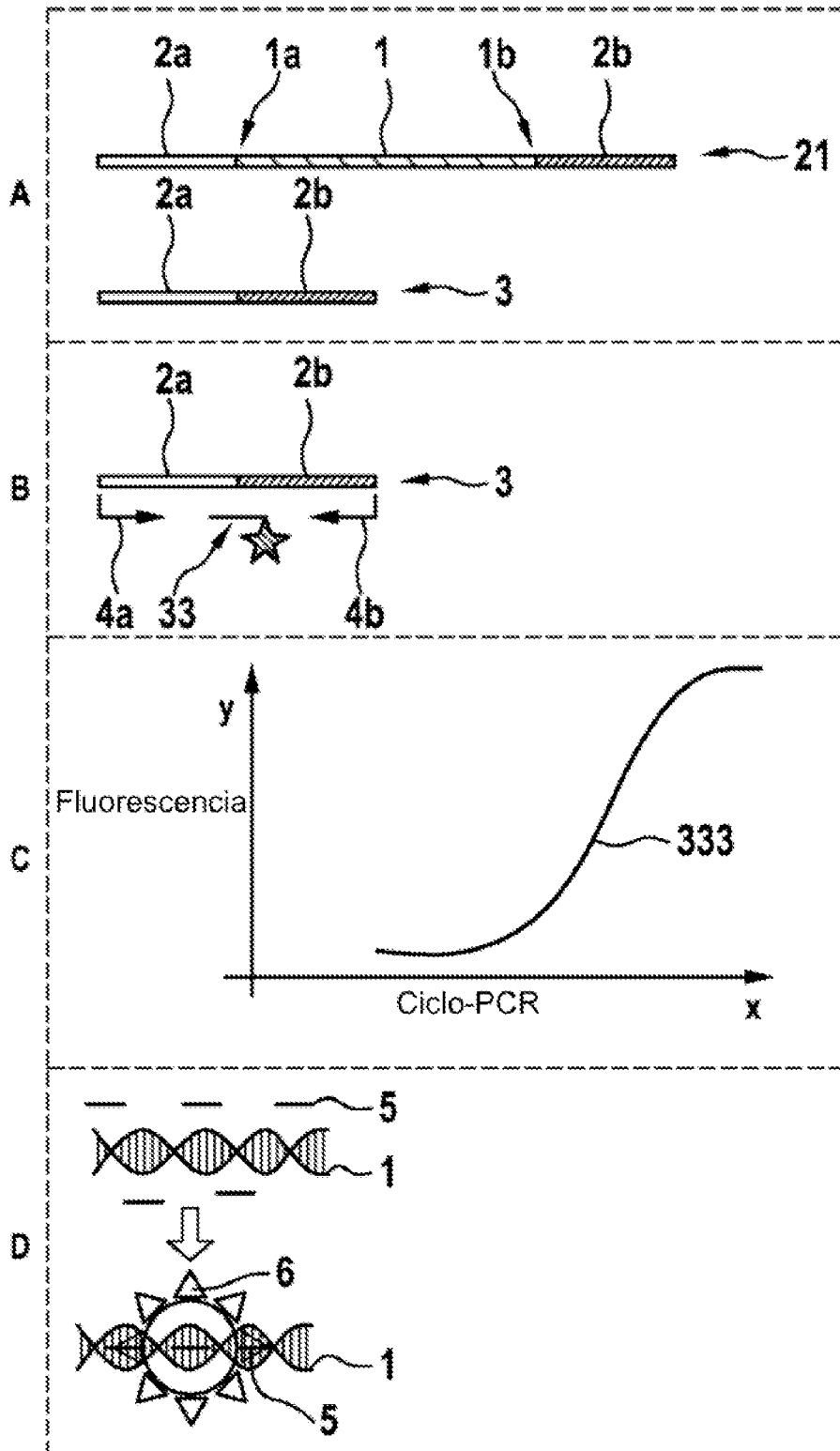


Fig. 3

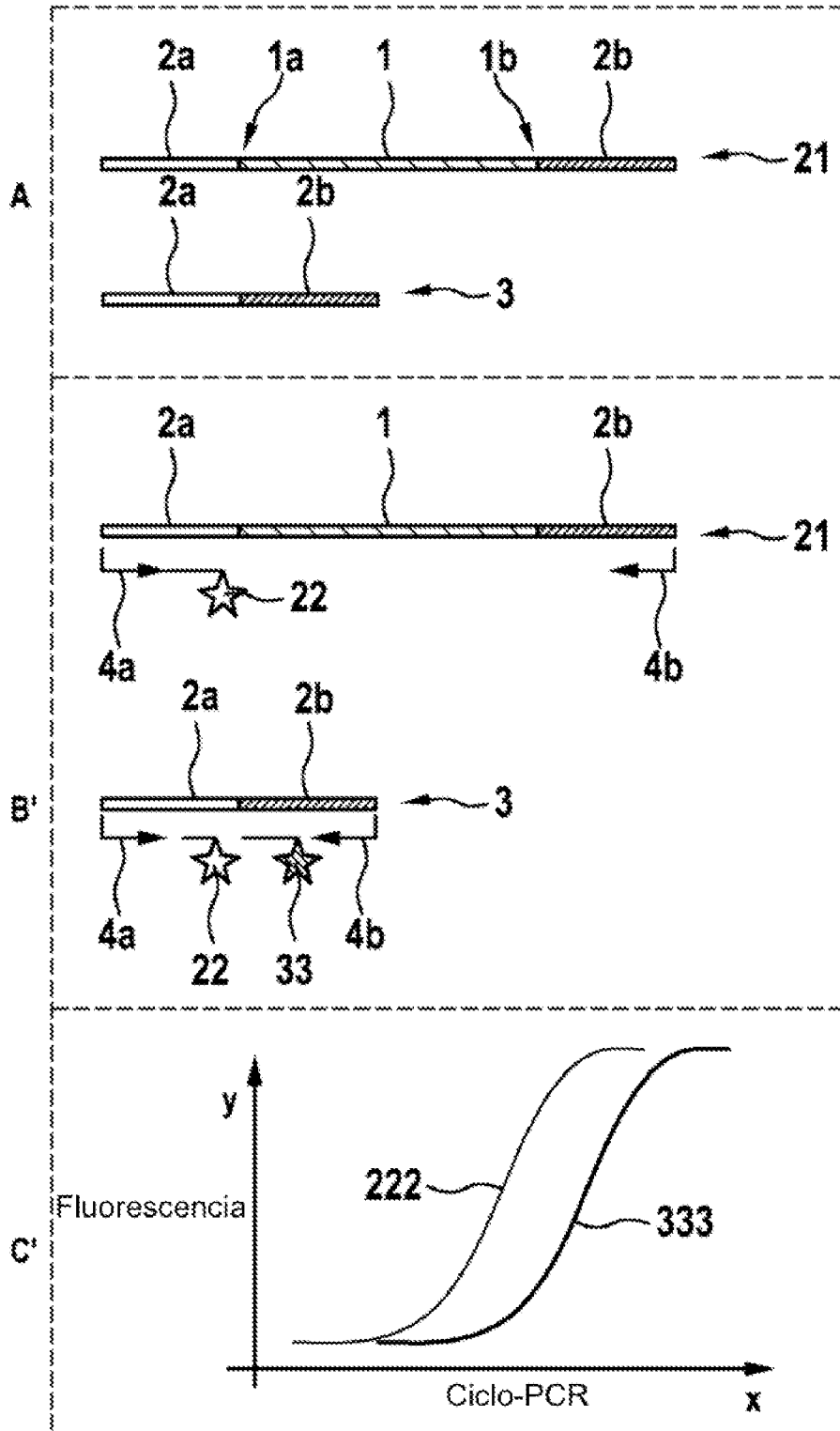


Fig. 4

