

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 378**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2021** **PCT/US2021/024695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2021** **WO21202403**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2021** **E 21720109 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024** **EP 4127220**

54 Título: **Métodos y composiciones para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.03.2020 US 202063001684 P

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

05.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHRISTIANSEN, LENA;
POKHOLOK, DMITRY;
STEEMERS, FRANK J.;
PANTOJA, RIGO;
CHU, MEGAN;
IAVICOLI, PATRIZIA;
CHANG, WEIHUA;
BRODIN, JEFFREY;
VERMAAS, ERIC;
THOMAS, JERUSHAH y
ZHANG, FAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 985 378 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense N.º 63/001.684 presentada el 30 de marzo de 2020 titulada "METHOD AND COMPOSITIONS FOR PREPARING NORMALIZED NUCLEIC ACID LIBRARIES".

10

Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias electrónico se proporciona como un archivo titulado ILLINC450WSEQLIST, creado el 22 de marzo de 2021, que tiene un tamaño de aproximadamente 2 Kb.

15

Campo de la invención

Las realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos. Algunas realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizados, tales como bibliotecas en las que las cantidades de ácidos nucleicos amplificados son sustancialmente las mismas para diferentes cantidades de ácidos nucleicos de entrada.

20

Antecedentes de la invención

Como práctica común, las muestras biológicas utilizadas para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos para análisis posteriores se procesan de manera homogénea según protocolos de ensayo estandarizados sin tener en cuenta los procedimientos personalizados para cada muestra. Una medida importante de control de calidad (QC) es la concentración de ácido nucleico de las bibliotecas de ácidos nucleicos, ya que el rendimiento de muchas tecnologías modernas de análisis de ácido nucleico depende de la concentración de ácido nucleico de los ácidos nucleicos de entrada. Ya que dichos análisis posteriores normalmente utilizan reactivos costosos e incurrir en costes significativos para realizarlos, las muestras que no cumplen con los requisitos de concentración de ácido nucleico y/u otras mediciones de control de calidad simplemente se descartan bajo el supuesto de que la preparación de la muestra era intrínsecamente inadecuada para la aplicación deseada.

25

30

Por ejemplo, en aplicaciones de secuenciación de nueva generación (NGS), también conocida como secuenciación de alto rendimiento, a menudo es deseable, pero logísticamente difícil, preparar bibliotecas de ácidos nucleicos con concentraciones molares de ADN sustancialmente uniformes. Este problema surge a menudo en la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos construidas a partir de una pluralidad de muestras biológicas heterogéneas, particularmente cuando una muestra biológica fuente deseable está desproporcionadamente infrarrepresentada. Este problema surge adicionalmente cuando una molécula de ácido nucleico diana es una especie de ácido nucleico relativamente más rara y/o más inestable en comparación incluso con otros ácidos nucleicos que proceden de la misma muestra biológica. Es difícil crear una biblioteca de ácidos nucleicos a partir de fuentes tales como un genoma, con una representación relativamente igual de diferentes regiones del genoma.

35

40

El documento WO 2017/176896 A1 desvela la normalización utilizando perlas con cebadores de normalización que se ampliaron utilizando la diana capturada como molde. El documento WO 2016/025872 A1 desvela métodos de normalización para bibliotecas de secuenciación de próxima generación que utilizan un sustrato de captura que tiene una capacidad de unión definida inferior a la cantidad de ácido nucleico de entrada. El documento WO 2014/047678 A1 desvela la extensión de ácidos nucleicos mediante ligamientos de adaptadores seguida de normalización utilizando perlas de captura.

45

50

Resumen de la invención

La invención se refiere a un método para normalizar una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende ácidos nucleicos diana, que comprende: (a) obtener un sustrato que tiene una cantidad normalizadora de sondas de captura unidas al mismo, en donde las sondas de captura comprenden primeros sitios de amplificación; (b) hibridar una pluralidad de ácidos nucleicos diana con las sondas de captura; (c) extender las sondas de captura para obtener sondas extendidas, en donde las sondas extendidas comprenden segundos sitios de amplificación; y (d) amplificar las sondas extendidas hibridando cebadores de extensión con los segundos sitios de amplificación, en donde la cantidad de cebadores de extensión es igual o mayor que la cantidad normalizadora de sondas de captura, en donde la amplificación se realiza de manera que sustancialmente todas las sondas de captura se extiendan, obteniendo de este modo una cantidad normalizadora de ácidos nucleicos diana amplificados; en donde los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión son incapaces o son esencialmente incapaces de hibridar entre sí; y en donde:

55

60

(i) cada uno de los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión carecen del mismo tipo de nucleótido, o

65

(ii) los primeros sitios de amplificación carecen de tipos de nucleótidos complementarios entre sí y cada cebador de extensión consiste esencialmente en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación, o

5 (iii) los primeros sitios de amplificación carecen de al menos un tipo de nucleótido seleccionado entre adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) y, opcionalmente, en donde los primeros sitios de amplificación carecen de una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y timina (T); o guanina (G) y citosina (C).

En algunas realizaciones, los cebadores de extensión están en solución.

10 En algunas realizaciones, las sondas de captura comprenden primeros índices o primeros sitios cebadores de secuenciación.

En algunas realizaciones, las sondas de captura comprenden primeros cebadores específicos de locus.

15 En algunas realizaciones, la pluralidad de ácidos nucleicos diana hibridan con los primeros cebadores específicos de locus.

En algunas realizaciones, extender las sondas de captura comprende ligar los primeros cebadores específicos de locus con los segundos cebadores específicos de locus.

20 En algunas realizaciones, extender las sondas de captura comprende: (i) hibridar segundos cebadores específicos de locus con los ácidos nucleicos diana; y (ii) ligar los primeros cebadores específicos de locus con los segundos cebadores específicos de locus.

25 En algunas realizaciones, los segundos cebadores específicos de locus comprenden los segundos sitios de amplificación.

En algunas realizaciones, los segundos cebadores específicos de locus comprenden segundos índices o segundos sitios cebadores de secuenciación.

30 Algunas realizaciones también incluyen: (iii) hibridar oligonucleótidos de extensión con los segundos cebadores específicos de locus; y (iv) extender los segundos cebadores específicos de locus con secuencias complementarias de los oligonucleótidos de extensión mediante extensión por polimerasa.

35 En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de extensión comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación, complementarios de los segundos índices o complementarios de los segundos sitios cebadores de secuenciación.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación y la extensión comprende extensión por polimerasa de los primeros cebadores específicos de locus con secuencias complementarias de los ácidos nucleicos diana.

40 Algunas realizaciones también incluyen preparar los ácidos nucleicos diana añadiendo adaptadores a un extremo de los ácidos nucleicos diana, en donde los adaptadores comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación.

45 En algunas realizaciones, la adición de adaptadores comprende una reacción de tagmentación.

En algunas realizaciones, el sustrato comprende una pluralidad de perlas.

50 En algunas realizaciones, el sustrato comprende una celda de flujo.

En algunas realizaciones, la amplificación se realiza en condiciones tales que la cantidad normalizadora de sondas de captura limite la cantidad de productos de amplificación.

55 Algunas realizaciones también incluyen la secuenciación de los ácidos nucleicos diana amplificados.

Breve descripción de los dibujos

60 La FIG. 1 (panel A) representa una realización de un flujo de trabajo para normalizar productos de amplificación en una perla. La FIG. 1 (panel B) representa etapas de amplificación alternativas en un flujo de trabajo para normalizar una biblioteca de ácidos nucleicos en una perla.

La FIG. 2 representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se tagmenta con un transposoma indexado y las sondas de captura se extienden con secuencias complementarias del transposoma indexado.

65

La FIG. 3 representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se tagmenta y las sondas de captura se extienden mediante ligamiento con un cebador de extensión.

La FIG. 4A representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se tagmenta con un transposoma que contiene un promotor T7, los fragmentos se amplifican mediante transcripción *in vitro*, los fragmentos de ARN amplificados se hibridan con sondas de captura y las sondas de captura se extienden mediante ligamiento con un cebador de extensión.

La FIG. 4B representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se tagmenta con un transposoma que contiene un promotor T7, se añaden adaptadores durante una extensión de transcripción inversa (RT) y los productos de extensión se hibridan con sondas de captura en una celda de flujo.

La FIG. 5 representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se amplifica, las sondas de captura que contienen secuencias P5 se extienden mediante ligamiento con un cebador de extensión y el cebador de extensión se extiende con secuencias complementarias de un oligonucleótido de extensión.

La FIG. 6 representa una realización de un flujo de trabajo para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos en el que el ADN genómico se amplifica, las sondas de captura que contienen secuencias GGA se extienden mediante ligamiento con un cebador de extensión y el cebador de extensión se extiende con secuencias complementarias de un oligonucleótido de extensión.

La FIG. 7 representa una realización de normalización de productos de amplificación en una perla con sondas de captura y sondas de extensión, cada una de las cuales incluye los mismos tipos de nucleótidos no complementarios.

La FIG. 8 representa una perla con sondas de captura que contienen secuencias P5 hibridadas con un ácido nucleico diana que contiene secuencias P7' con cebadores de extensión que contienen secuencias P7 en solución, y una perla con sondas de captura que contienen secuencias GGA hibridadas con un ácido nucleico diana que contiene secuencias AAG' con cebadores de extensión que contienen secuencias AAG en solución.

La FIG. 9 es una fotografía de un gel que muestra que la normalización en perlas usando un sistema de cebador AAG/GGA produce menos dímeros en perlas que un sistema de cebador P5/P7.

La FIG. 10 es una fotografía de un gel que muestra que la normalización en perlas usando un sistema de cebador AAG/GGA produce niveles sustancialmente similares de productos amplificados normalizados entre niveles altos y bajos de ADN de entrada inicial y un sistema de cebador P5/P7 produce diferentes niveles de productos amplificados supuestamente normalizados entre niveles altos y bajos de ADN de entrada inicial.

La FIG. 11 es un gráfico lineal que compara diversas cantidades de ADN de entrada usando un sistema de cebador AAG/GGA o un sistema de cebador P5/P7 para obtener cantidades relativas de ADN de salida.

La FIG. 12 es una fotografía de un gel que muestra diversas cantidades de ADN de entrada usando un sistema de cebador AAG/GGA o un sistema de cebador P5/P7 en el que los ácidos nucleicos diana se hibridan durante la noche o durante 1 hora.

La FIG. 13 es una fotografía de un gel que muestra diversas cantidades de ADN de entrada usando un sistema de cebador AAG/GGA o un sistema de cebador P5/P7 en el que las capturas extendidas se amplificaron (+ExAMP) o no se amplificaron (-ExAMP).

La FIG. 14 es un esquema de una realización para indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en solución.

La FIG. 15 es un esquema de una realización para indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en perlas.

La FIG. 16 es un esquema de una realización para indexación de múltiples niveles mediante hibridación-extensión en perlas.

La FIG. 17 es un esquema de una realización para indexación de múltiples niveles mediante hibridación-extensión en solución.

La FIG. 18 es un esquema de una realización para indexación de tres niveles mediante múltiples hibridaciones-extensión/ligamiento único en solución.

La FIG. 19 es un esquema de una realización para indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en gotitas.

La FIG. 20 es un esquema de una realización para indexación de un solo nivel mediante hibridación en gotitas con extensión a granel.

La FIG. 21 es un esquema de una realización en la que se extiende un nucleótido de indexación de muestra y se sella un espacio entre oligonucleótidos de enriquecimiento específicos de locus en una única etapa posterior al enriquecimiento.

La FIG. 22 es un gráfico del rendimiento total de ADN para reacciones de amplificación realizadas en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas.

La FIG. 23 es un gráfico de intensidad de fluorescencia para reacciones de amplificación realizadas con un beadchip Infinium EX de 60 K y en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Para cada tiempo, las columnas izquierda y derecha son valores medios de intensidad fluorescente del canal Xraw o Yraw, respectivamente.

Obsérvese que las intensidades Xraw e Yraw son mayores para las formulaciones que contienen IPP a los 30 min y 1 h.

La FIG. 24 es un gráfico de la tasa de éxito para reacciones de amplificación realizadas en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas.

Descripción detallada

Las realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos. Algunas realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizados, tales como bibliotecas en las que las cantidades de ácidos nucleicos (amplificados) son sustancialmente las mismas.

Algunas realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizados que tienen cantidades sustancialmente similares de ácidos nucleicos diana. En algunas de estas realizaciones se prepararon bibliotecas de ácidos nucleicos normalizados que tienen cantidades sustancialmente similares de ácidos nucleicos amplificados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de entrada se hibridan con sondas de captura unidas a perlas, comprendiendo las sondas de captura primeros sitios de amplificación sin tipos de nucleótidos complementarios entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación carecen de un único tipo de nucleótido. En alguna realización, los primeros sitios de amplificación carecen de una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y timina (T); o guanina (G) y citosina (C). En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación consisten en una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y guanina (G); adenina (A) y citosina (C); citosina (C) y timina (T); o guanina (G) y timina (T). En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación consisten en una combinación de nucleótidos de adenina (A) y guanina (G). En algunas realizaciones, el primer sitio de amplificación puede consistir en un tipo de nucleótido.

La sonda de captura se puede extender con secuencias complementarias del ácido nucleico de entrada hibridado. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende mediante polimerización. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende mediante ligamiento de la sonda de captura con un oligonucleótido complementario del ácido nucleico de entrada hibridado. En algunas realizaciones, la sonda de captura se extiende mediante polimerización y ligamiento. La sonda de captura extendida puede incluir un segundo sitio de amplificación y/o índice de muestra.

La sonda de captura extendida se puede amplificar en la perla hibridando cebadores de extensión en solución con los segundos sitios de amplificación. En algunas realizaciones, la cantidad de cebadores de extensión es igual o mayor que una cantidad normalizadora de sondas de captura. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión consisten esencialmente en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación. En algunas de dichas realizaciones, los cebadores de extensión y las sondas de captura no incluyen nucleótidos complementarios y se reducen las interacciones entre los cebadores de extensión y las sondas de captura, tales como la formación de dímeros de cebadores. Los cebadores de extensión hibridados pueden extenderse y los productos hibridarse con sondas de captura no extendidas en las perlas. Las sondas de captura extendidas se amplifican de manera que se extiendan sustancialmente todas las sondas de captura, obteniendo de este modo una cantidad normalizadora de ácidos nucleicos diana amplificados.

Algunas realizaciones se refieren a la preparación de una biblioteca de ácidos nucleicos en la que se añade un adaptador extendiendo un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, se hibrida un ácido nucleico diana con una sonda de captura que comprende un primer cebador específico de locus. La sonda de captura se puede extender hibridando el ácido nucleico diana hibridado con un segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, el primer y segundo cebadores específicos de locus se pueden ligar, extendiendo de este modo la sonda de captura. En algunas realizaciones, el segundo cebador específico de locus se puede extender hibridando un cebador de extensión con el segundo cebador específico de locus y extendiendo el segundo cebador específico de locus con secuencias complementarias del cebador de extensión. En algunas realizaciones, se introduce un índice de muestra mediante una etapa de extensión.

Determinadas definiciones

Como se utiliza en la presente memoria, la “hibridación” puede referirse a la capacidad de las moléculas de ácido nucleico para unirse mediante apareamiento de cadenas de bases complementarias. Dicha hibridación se puede producir cuando las moléculas de ácido nucleico se ponen en contacto en condiciones y/o circunstancias adecuadas. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el “complemento” de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Como se utiliza en la presente memoria, se dice que las moléculas de ácido nucleico presentan “complementariedad completa” cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de su nucleótido compañero de apareamiento de bases de la otra. Se dice que dos moléculas son “mínimamente complementarias” si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad como para permitirles permanecer hibridadas entre sí al menos en condiciones convencionales de “baja rigurosidad”. En algunos casos, se dice que las moléculas son “complementarias” si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad como para permitirles permanecer hibridadas entre sí en condiciones convencionales de “alta rigurosidad”. Se dice que las moléculas de ácido nucleico que hibridan con otras moléculas de ácido nucleico, p. ej., al menos en condiciones de baja rigurosidad, son “análogos hibridables” de las otras moléculas de ácido nucleico. Las condiciones de rigurosidad convencionales son descritas por Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y por Haymes y col. en: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad y para la divulgación analizada en la presente memoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones se permiten desviaciones de la complementariedad completa, siempre que tales desviaciones no bloqueen por completo la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Por lo tanto, para que una molécula de ácido nucleico o fragmento de la misma de la presente divulgación sirva como cebador o sonda en algunas realizaciones, solo necesita ser suficientemente complementaria en secuencia para poder formar una estructura bicatenaria estable con las concentraciones particulares de disolvente y sal empleadas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son completamente complementarios de sus dianas.

Como se usan en la presente memoria, “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a moléculas tanto de ARN como de ADN, incluidas moléculas de ácido nucleico que comprenden ADNc, ADN genómico, ADN sintético y moléculas de ADN o ARN que contienen análogos de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener cualquier estructura tridimensional. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria (p. ej., una cadena codificante o no codificante). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ácido nucleico incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNip, microARN, ARNtracr, ARNcr, ARN guía, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, sondas de ácidos nucleicos y cebadores de ácidos nucleicos. Una molécula de ácido nucleico puede contener nucleótidos no convencionales o modificados. Las expresiones “secuencia polinucleotídica” y “secuencia de ácido nucleico”, como se usan en la presente memoria, se refieren indistintamente a la secuencia de una molécula polinucleotídica. En la presente memoria se utiliza la nomenclatura para bases nucleotídicas establecida en 37 CFR §1.822.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “muestra de ácido nucleico” se refiere a una colección de moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico proviene de una única fuente biológica, p. ej., un individuo o una muestra tisular, y, en otras realizaciones, la muestra de ácido nucleico es una muestra combinada, que contiene, p. ej., ácidos nucleicos de más de un organismo, individuo o tejido.

Como se utiliza en la presente memoria, “muestra de ácido nucleico” abarca “biblioteca de ácidos nucleicos” que, como se utiliza en la presente memoria, incluye una biblioteca de ácidos nucleicos que se ha preparado mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, proporcionar la biblioteca de ácidos nucleicos incluye las etapas necesarias para preparar la biblioteca, por ejemplo, incluyendo el proceso de incorporar una o más muestras de ácidos nucleicos en una colección basada en vectores, tal como mediante ligamiento en un vector y transformación de un hospedador. En algunas realizaciones, proporcionar una biblioteca de ácidos nucleicos incluye el proceso de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como mediante ligamiento a adaptadores. En algunas realizaciones, los adaptadores pueden hibridarse con cebadores de PCR para facilitar la amplificación por PCR o pueden ser regiones cebadoras universales tales como, por ejemplo, adaptadores de cola de secuenciación. En algunas realizaciones, los adaptadores pueden ser adaptadores de secuenciación universales.

Como se utiliza en la presente memoria, “sustancialmente” tiene su significado habitual como se lee a la luz de la memoria descriptiva y puede significar, por ejemplo, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %

Normalización de productos de amplificación

Algunas realizaciones se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen cantidades normalizadas de productos amplificados. Por ejemplo, las cantidades de determinados productos amplificados obtenidos a partir de diferentes ácidos nucleicos diana pueden ser sustancialmente las mismas entre los productos amplificados. En algunas realizaciones, las cantidades de ácido nucleico en bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas varían en menos de aproximadamente un 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % o 1 %. En algunas

realizaciones, las cantidades de ácido nucleico en bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas varían en menos de aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces. En algunas realizaciones, se generan bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas en las que la cantidad de ácidos nucleicos constituyentes en las bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas resultantes están en cantidades sustancialmente similares independientemente de la cantidad de ácidos nucleicos de entrada. En algunas realizaciones, las cantidades de ácidos nucleicos constituyentes en bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas varían en menos de aproximadamente un 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 % o 1 %. En algunas realizaciones, las cantidades de ácidos nucleicos constituyentes en bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas varían en menos de aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces.

Algunas realizaciones de preparación de una biblioteca de ácidos nucleicos normalizada pueden incluir proporcionar condiciones de amplificación en las que se proporciona un cebador de amplificación en una cantidad limitada y se proporcionan otros reactivos de amplificación en cantidades no limitantes. En algunas de dichas realizaciones, la cantidad de productos de amplificación está limitada según la cantidad del cebador de amplificación limitado. En algunas de tales realizaciones, se puede realizar más de una reacción de amplificación y cada reacción de amplificación puede dar lugar a una cantidad de producto de amplificación que es sustancialmente la misma que la de las demás reacciones de amplificación.

En algunas realizaciones, se puede proporcionar un sustrato que incluye una pluralidad de sondas de captura y una pluralidad de cebadores de extensión unidos al sustrato. En algunas realizaciones, un sustrato comprende un soporte sólido. En algunas realizaciones, el sustrato es un sustrato plano. En algunas realizaciones, un sustrato plano incluye sitios separados, tales como pocillos. En algunas realizaciones, un sustrato puede incluir una pluralidad de perlas. En algunas realizaciones, las sondas de captura pueden incluir primeros sitios de amplificación. Un sitio de amplificación puede incluir un sitio de unión para un cebador de amplificación. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión pueden incluir sitios capaces de hibridar con segundos sitios de amplificación. En algunas realizaciones, las sondas de captura o los cebadores de extensión se pueden proporcionar en una cantidad normalizadora de modo que la amplificación de un ácido nucleico diana a partir de los primeros y segundos cebadores de amplificación dé lugar una cantidad normalizada de producto de amplificación. Por ejemplo, la cantidad de sondas de captura se puede proporcionar en una cantidad inferior que o igual a los cebadores de extensión, de modo que la cantidad de productos de amplificación esté limitada por la cantidad de sondas de captura; o la cantidad de cebadores de extensión se puede proporcionar en una cantidad inferior que o igual a las sondas de captura, de modo que la cantidad de productos de amplificación esté limitada por la cantidad de cebadores de extensión.

En algunas realizaciones, una muestra de ácido nucleico se puede hibridar con las sondas de captura y las sondas de captura se pueden extender para generar sondas extendidas. En algunas realizaciones, las sondas extendidas pueden incluir un segundo sitio de amplificación capaz de hibridar con los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, las sondas extendidas se pueden amplificar hibridando las sondas extendidas con las sondas de extensión, las sondas de extensión se pueden extender y los productos posteriores se pueden hibridar con las sondas de captura y los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, la amplificación puede incluir una amplificación en puente.

Algunas realizaciones de normalización de una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende ácidos nucleicos diana pueden incluir la obtención de un sustrato que tiene una cantidad normalizadora de sondas de captura unidas al sustrato y una pluralidad de cebadores de extensión. En algunas realizaciones, el sustrato comprende una pluralidad de perlas. En algunas realizaciones, las sondas de captura comprenden primeros sitios de amplificación y son incapaces o son esencialmente incapaces de hibridar con los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión no son complementarios entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión comprenden secuencias de nucleótidos no complementarias entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación comprenden nucleótidos modificados que inhiben la hibridación con los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, cada uno de los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión carecen del mismo tipo de nucleótido. En algunas realizaciones, las sondas de captura comprenden primeros sitios de amplificación que carecen de tipos de nucleótidos complementarios entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación carecen de una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y timina (T); o guanina (G) y citosina (C). En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación consisten en una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y guanina (G); adenina (A) y citosina (C); citosina (C) y timina (T); o guanina (G) y timina (T). En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación consisten en una combinación de nucleótidos de adenina (A) y guanina (G). En algunas realizaciones, los cebadores pueden contener bases pseudocomplementarias o bases y modificaciones que evitan la formación de dímeros.

En algunas realizaciones, los cebadores de extensión comprenden sitios capaces de hibridar con segundos sitios de amplificación. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión consisten esencialmente en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión consisten en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión están en solución.

Algunas realizaciones incluyen hibridar una pluralidad de ácidos nucleicos diana con las sondas de captura y extender las sondas de captura para obtener sondas extendidas. En algunas realizaciones, las sondas extendidas se pueden

amplificar hibridando las sondas extendidas con las sondas de extensión, las sondas extendidas se pueden extender y los productos posteriores se pueden hibridar con las sondas de captura y los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, la amplificación puede incluir una amplificación en puente. En algunas realizaciones, la cantidad de cebadores de extensión es igual o mayor que la cantidad normalizadora de sondas de captura y la amplificación se realiza de manera que sustancialmente todas las sondas de captura se extiendan, para obtener una cantidad normalizadora de ácidos nucleicos diana amplificados.

En algunas realizaciones, el ADN se amplifica usando amplificación del genoma completo, se hibrida con sondas de captura, formación de bibliotecas dirigidas amplificables, amplificación limitada con normalización y secuenciación de la biblioteca de secuenciación dirigida normalizada.

En algunas realizaciones, se incluye una etapa para el análisis de la biblioteca de secuenciación dirigida. Por ejemplo, la secuenciación puede incluir la sonda de captura y el ADN genómico para el análisis de polimorfismos y variantes de un solo nucleótido. La secuenciación de la sonda de captura puede identificar la región diana, una variante y un índice de muestra o código de barras. En algunas realizaciones, el análisis no incluye el alineamiento de las lecturas de secuenciación con un genoma de referencia.

En algunas realizaciones, las sondas de captura pueden incluir un primer índice y/o el cebador de extensión puede incluir una secuencia complementaria de un segundo índice. Un índice puede incluir una secuencia que pueda identificar la fuente de un ácido nucleico. Por ejemplo, un índice puede identificar la fuente de un ácido nucleico diana para una muestra determinada. En algunas realizaciones, un índice puede identificar la fuente de un producto de amplificación de un ácido nucleico diana para una muestra determinada de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, un índice puede comprender menos de 50, 40, 30, 20, 10 o 5 nucleótidos consecutivos o un número de nucleótidos entre dos cualesquiera de los números anteriores.

En algunas realizaciones, las sondas de captura pueden incluir un primer sitio cebador de secuenciación y/o el cebador de extensión puede incluir una secuencia complementaria de un segundo sitio cebador de secuenciación. Un sitio de cebador de secuenciación puede incluir un sitio de unión para un cebador de secuenciación. Los ejemplos de un sitio cebador de secuenciación incluyen ácidos nucleicos que tienen la secuencia P5, P7 o complementos de las mismas.

Cebador P5 AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA (Id de sec. n.º: 1)

Cebador P7 CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT (Id de sec. n.º: 2)

En algunas realizaciones, las sondas de captura pueden incluir un primer cebador específico de locus. El primer cebador específico de locus puede incluir una secuencia de ácido nucleico capaz de unirse a un primer sitio de unión a locus en un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, las sondas de captura se pueden extender hibridando un ácido nucleico diana con el primer cebador específico de locus de la sonda de captura e hibridando un segundo cebador específico de locus con el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el primer cebador específico de locus y el segundo cebador específico de locus se unen en ubicaciones del ácido nucleico diana adyacentes entre sí. En algunas realizaciones, las ubicaciones a las que se unen el primer cebador específico de locus y el segundo cebador específico de locus en el ácido nucleico diana están separadas por menos de 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 nucleótidos consecutivos en el ácido nucleico diana o por cualquier número de nucleótidos en el ácido nucleico diana entre dos cualesquiera de los números anteriores. En algunas realizaciones, extender la sonda de captura puede incluir ligar el primer cebador específico de locus con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, extender la sonda de captura puede incluir extender el primer cebador específico de locus con una polimerasa y ligar el primer cebador específico de locus con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, extender la sonda de captura puede incluir extender el primer cebador específico de locus con una polimerasa.

En algunas realizaciones, los segundos cebadores específicos de locus pueden incluir un segundo sitio de amplificación. En algunas realizaciones, los segundos cebadores específicos de locus pueden incluir un segundo índice. En algunas realizaciones, los segundos cebadores específicos de locus pueden incluir un segundo sitio cebador de secuenciación.

En algunas realizaciones, se puede añadir un adaptador al segundo cebador específico de locus. El adaptador puede incluir un segundo sitio de amplificación, un segundo índice y/o un segundo sitio cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, el adaptador se puede añadir mediante ligamiento o extensión y ligamiento al segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, se puede hibridar un oligonucleótido de extensión con el segundo cebador específico de locus. El oligonucleótido de extensión puede incluir secuencias complementarias de un segundo sitio de amplificación, un segundo índice y/o un segundo sitio cebador de secuenciación. El segundo cebador específico de locus puede extenderse con secuencias complementarias del oligonucleótido de extensión y, de este modo, incluir un segundo sitio de amplificación, un segundo índice y/o un segundo sitio cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana se hibrida con un primer cebador específico de locus y un segundo cebador específico de locus, y un oligonucleótido de extensión se hibrida con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana se hibrida con el primer cebador específico de locus y el segundo cebador específico de locus, al mismo tiempo que el oligonucleótido de extensión se hibrida con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana se hibrida con el primer cebador específico de

locus y el segundo cebador específico de locus, antes de que el oligonucleótido de extensión se hibride con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana se hibrida con el primer cebador específico de locus y el segundo cebador específico de locus, después de que oligonucleótido de extensión se hibride con el segundo cebador específico de locus. En algunas realizaciones, el primer cebador específico de locus se extiende y se une al segundo cebador específico de locus utilizando una polimerasa y/o una ligasa, el segundo cebador específico de locus se extiende con una polimerasa.

En la FIG. 1 (panel A) se ilustra una realización ilustrativa en la que una sonda de captura está unida a una perla, la sonda de captura contiene un sitio de amplificación (P5), un primer sitio cebador de secuenciación (CS1), un índice y una primera sonda específica de locus (LSP1) diseñada a una base de corriente arriba de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) o de una inserción/supresión de interés. Las perlas también se injertan con una alta concentración de cebadores de extensión que contienen adaptadores de secuenciación, tales como P5 o P7. Por supuesto, debe tenerse en cuenta que se contemplan otros adaptadores de secuenciación. La sonda de captura se extiende mediante hibridación con un ácido nucleico diana y ligamiento con un oligonucleótido que contiene una segunda sonda específica de locus (LSP2) y una secuencia complementaria de una secuencia P7 (P7'). La sonda de captura extendida se amplifica en la perla. La FIG. 1 (panel B) resume las etapas de amplificación alternativas que incluyen amplificación en puente, amplificación asistida por recombinasa isotérmica o cualquier otro tipo de amplificación clonal. La densidad de los adaptadores de secuenciación en cada superficie de perla determina la concentración de la biblioteca final una vez completada la reacción de agrupamiento. El tiempo de agrupación se optimiza para alcanzar la utilización completa de los cebadores P5/P7 en la superficie de la perla, independientemente de la eficiencia inicial de captura-extensión de la diana. Posteriormente, las bibliotecas amplificadas se eliminan de las perlas, las muestras indexadas diferencialmente se reúnen, se agrupan y se secuencian en una plataforma adecuada dependiendo de la complejidad del ensayo. La FIG. 1 (panel B) ilustra tres perlas con diferentes cantidades de ácidos nucleicos diana hibridados con sondas de captura en las perlas y la amplificación en las perlas da lugar a cantidades normalizadas de productos de amplificación. Seleccionando una cantidad o densidad predeterminada de adaptadores de secuenciación en la superficie de la perla, se puede alterar la concentración final de un amplicón particular a medida que se amplifica en esa perla.

En la FIG. 2 se representa una realización ilustrativa en la que el ADN genómico (ADNg) está tagmentado con un transposoma. La reacción de tagmentación fragmenta el ADNg y añade adaptadores a los fragmentos de ADN. Los adaptadores incluyen secuencias P7, un primer índice y un sitio cebador común (CS2). Se rellenan los huecos de los extremos de los fragmentos y los fragmentos se amplifican mediante PCR. Los fragmentos amplificados se hibridan con sondas de captura unidas a perlas. Las sondas de captura incluyen una secuencia P5, un sitio de cebador común (CS1), un segundo índice y un primer cebador específico de locus (LSP1). El LSP1 está diseñado para unirse inmediatamente corriente arriba de un polimorfismo de un solo nucleótido (estrella) de interés. A las perlas se unen cebadores de extensión que contienen secuencias P7 y/o P5. La biblioteca no unida se lava mediante lavados rigurosos y se extiende una sonda específica de locus mediante ADN polimerasa de alta fidelidad para copiar el SNP, la región corriente abajo y el segundo adaptador de secuenciación con índice (CS2'_Índice'_P7'). Después de la eliminación de la cadena de ADN diana, la cadena extendida se somete a normalización mediante agrupamiento en la misma perla, como se representa en la FIG. 1.

En la FIG. 3 se representa otra realización ilustrativa en la que el ADNg está tagmentado con un transposoma TDE1 que contiene secuencias adaptadoras mínimas. La reacción de tagmentación fragmenta el ADNg y agrega adaptadores mínimos a los extremos de los fragmentos, conteniendo los adaptadores el elemento mosaico (ME) y la secuencia común (CS), y complementos de los mismos. Después de la tagmentación y el llenado de huecos, la biblioteca inicial se preamplifica mediante PCR a través de los sitios de CS. La biblioteca desnaturalizada se hibrida con una sonda de captura unida a una perla, conteniendo la sonda de captura una secuencia P5, una primera secuencia común (CS 1), un índice y una primera sonda específica de locus (LSP1). La LSP1 está diseñada para unirse a ácidos nucleicos diana inmediatamente corriente arriba de un SNP de interés (estrella). Un cebador de extensión que contiene un extremo fosforilado 5', un segundo cebador específico de locus (LSP2), un complemento de una segunda secuencia común (CS2') y un complemento de una secuencia P7 (P7') se hibrida a una o unas pocas bases en dirección corriente abajo del SNP. La biblioteca no unida y el exceso del cebador de extensión se lavan mediante lavados rigurosos y la LSP1 de la sonda de captura se extiende sobre el SNP y se liga con la LSP2 corriente abajo del cebador de extensión. La cadena de la biblioteca resultante, que ahora contiene adaptadores de secuenciación, se lava y se agrupa en la misma perla. Como alternativa, el ADN de entrada puede tagmentarse con TSM que contiene la secuencia del promotor T7 o SP6 y amplificarse mediante transcripción *in vitro* (TIV).

En la FIG. 4A se representa otra realización ilustrativa más en la que el ADNg está tagmentado con un transposoma que contiene secuencias T7. La reacción de tagmentación fragmenta el ADNg y añade adaptadores a los extremos de los fragmentos. Los adaptadores contienen secuencias T7 y ME y complementos de las mismas. Los fragmentos se amplifican mediante transcripción *in vitro* para obtener una pluralidad de ARN. La ARN se hibrida con una sonda de captura unida a una perla, conteniendo la sonda de captura una secuencia P5, una primera secuencia común (CS1), un índice y una primera sonda específica de locus (LSP1). La LSP1 está diseñada para unirse a ácidos nucleicos diana inmediatamente corriente arriba de un SNP de interés (estrella). Un cebador de extensión que contiene un extremo fosforilado 5', un segundo cebador específico de locus (LSP2), un complemento de una segunda secuencia común (CS2') y un complemento de una secuencia P7 (P7') se hibrida a una o unas pocas bases en dirección corriente

abajo del SNP. La sonda de captura se extiende con una transcriptasa inversa y la sonda de captura extendida se liga con el cebador de extensión. La cadena de la biblioteca resultante, que ahora contiene adaptadores de secuenciación, se lava y se agrupa en la misma perla.

En la FIG. 4B se representa otra realización ilustrativa en la que el ADN_g está tagmentado con un transposoma que contiene secuencias T7. La reacción de tagmentación fragmenta el ADN_g y añade adaptadores a los extremos de los fragmentos. Los adaptadores contienen secuencias T7 y ME y complementos de las mismas. Los fragmentos se amplifican mediante transcripción *in vitro* para obtener una pluralidad de ARN. La ARN se hibrida con un oligonucleótido que contiene una secuencia P5, una primera secuencia común (CS1), un índice y una primera sonda específica de locus (LSP1). La LSP1 está diseñada para unirse a ácidos nucleicos diana inmediatamente corriente arriba de un SNP de interés (estrella). El oligonucleótido hibridado se extiende mediante transcripción inversa (RT). Los productos de extensión se hibridan con sondas de captura unidas a una celda de flujo a través de una región en los productos extendidos que se une a un segundo cebador específico de locus (LSP2). La sonda de captura contiene una secuencia P7 y la segunda LSP2. La sonda de captura se extiende y las sondas de captura extendidas se amplifican mediante amplificación en fase sólida, tal como amplificación por grupos, por ejemplo, amplificación en puente.

En la FIG. 5 se representa otra realización ilustrativa en la que se hibridan ácidos nucleicos diana amplificados que contienen un SNP de interés (estrella) con sondas de captura unidas a perlas. La amplificación puede incluir amplificación lineal o amplificación exponencial. Los ejemplos de amplificación incluyen la amplificación del genoma completo y la amplificación dirigida. Las sondas de captura contienen una secuencia P5 y una primera sonda específica de locus (LSP1). Los cebadores de extensión se hibridan con los ácidos nucleicos diana hibridados y los oligonucleótidos de extensión se hibridan con los cebadores de extensión. Los cebadores de extensión contienen un segundo cebador específico de locus (LSP2) y una segunda secuencia común (CS2). Los oligonucleótidos de extensión se hibridan con la región CS2 de los cebadores de extensión y contienen un índice y una secuencia P7. La LSP1 de la sonda de captura se liga con la LSP2 del cebador de extensión y el cebador de extensión se extiende para incluir secuencias complementarias del oligonucleótido de extensión. Se elimina el ácido nucleico diana hibridado. La sonda de captura extendida se amplifica mediante cebadores P5 unidos a las perlas y cebadores P7 en solución. La amplificación da lugar a una cantidad normalizada de productos de amplificación porque la amplificación está limitada por la cantidad de cebadores P5 unidos a las perlas.

En la FIG. 6 también se representa una realización ilustrativa en la que se hibridan ácidos nucleicos diana amplificados que contienen un SNP de interés (estrella) con sondas de captura unidas a perlas. Las sondas de captura contienen una secuencia GGA y una primera sonda específica de locus (LSP1). Los cebadores de extensión se hibridan con los ácidos nucleicos diana hibridados y los oligonucleótidos de extensión se hibridan con los cebadores de extensión. Los cebadores de extensión contienen un segundo cebador específico de locus (LSP2) y una segunda secuencia común (CS2). Los oligonucleótidos de extensión se hibridan con la región CS2 de los cebadores de extensión y contienen un índice y una secuencia AAG. La LSP1 de la sonda de captura se liga con la LSP2 del cebador de extensión y el cebador de extensión se extiende para incluir secuencias complementarias del oligonucleótido de extensión. Se elimina el ácido nucleico diana hibridado. La sonda de captura extendida se amplifica mediante cebadores GGA unidos a las perlas y cebadores AAG en solución. La amplificación da lugar a una cantidad normalizada de productos de amplificación porque la amplificación está limitada por la cantidad de cebadores GGA unidos a las perlas.

Cantidades diferentes de ácidos nucleicos de entrada pueden dar lugar a cantidades sustancialmente similares de productos amplificados. Como se representa en la FIG. 7, se hibridan diferentes cantidades de ácidos nucleicos diana con sondas de captura unidas a perlas y las sondas de captura se extienden para generar diferentes cantidades de sondas de captura extendidas (lado izquierdo de la FIG. 7). Las sondas de captura extendidas se amplifican mediante primeros cebadores unidos a las perlas y segundos cebadores en solución. La cantidad de los productos amplificados está limitada por la cantidad de primeros cebadores unidos a las perlas. Por lo tanto, la amplificación da lugar a cantidades sustancialmente similares de productos amplificados incluso aunque las cantidades de ácidos nucleicos de entrada iniciales fueran diferentes.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana incluye secuencias complementarias de los segundos sitios de amplificación. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana incluye secuencias complementarias de un segundo índice y/o un segundo cebador de secuenciación. En algunas de dichas realizaciones, una sonda de captura que contiene un primer cebador específico de locus se puede extender hibridando el ácido nucleico diana con el primer cebador específico de locus y extendiendo el primer cebador específico de locus con una polimerasa para incorporar secuencias complementarias del ácido nucleico diana, tales como un segundo sitio de amplificación, un segundo índice y/o un segundo cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana se puede preparar añadiendo adaptadores que incluyen secuencias complementarias de segundos sitios de amplificación, un segundo índice y/o un segundo cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana se puede preparar mediante una reacción de tagmentación. Por ejemplo, un ácido nucleico de entrada que comprende un ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con una pluralidad de transposomas. Los transposomas pueden fragmentar el ácido nucleico de entrada y unir adaptadores a los extremos de los fragmentos de ácido nucleico. En la patente estadounidense n.º 9.040.256 se describen ejemplos de reacciones de tagmentación.

En algunas realizaciones, las bibliotecas de ácidos nucleicos preparadas o las bibliotecas agrupadas pueden ser adecuadas para aplicaciones analíticas posteriores, incluidas aplicaciones de secuenciación que utilizan técnicas tales como la secuenciación de nueva generación (NGS) y metodologías relacionadas, tales como el genotipado por secuenciación (GBS). Por ejemplo, el primer cebador específico de locus y el segundo cebador específico de locus pueden unirse al ácido nucleico diana en ubicaciones que tienen polimorfismo mononucleotídico SNP, inserción, delección o duplicación entre los dos sitios de unión. Los ácidos nucleicos diana amplificados se pueden secuenciar y se puede identificar el SNP, la inserción, la delección o la duplicación.

En algunas realizaciones, los productos de amplificación se pueden separar de un soporte sólido, tal como una perla. Generalmente, se puede usar cualquier método adecuado para eliminar ácidos nucleicos del soporte sólido, tal como el uso de enzimas y/o cambios de temperatura y/o pH. En algunas realizaciones, los productos de amplificación se separan del soporte sólido por elución. En algunas realizaciones, los productos de amplificación se eluyen en un tampón calentado. En algunas realizaciones donde se incluye estreptavidina en un soporte de fase sólida y los ácidos nucleicos se biotinilan para facilitar la unión de los ácidos nucleicos al soporte sólido, los productos de amplificación de ácidos nucleicos se pueden separar del soporte sólido mediante escisión calentada de avidina-biotina.

En algunas realizaciones, la amplificación de ácidos nucleicos se realiza en condiciones sustancialmente isotérmicas. La temperatura óptima para la amplificación varía y puede depender, por ejemplo, de las características del cebador, tales como la longitud de la secuencia, la temperatura de fusión y la elección de la polimerasa. En algunas realizaciones, la temperatura de amplificación es inferior a 60 grados Celsius, tal como inferior a 50 grados Celsius, inferior a 45 grados Celsius, tal como 42, 38, 35, 30, 25 o 20 grados Celsius. En algunas realizaciones preferidas, la temperatura de amplificación es de aproximadamente 38 grados Celsius. En algunas realizaciones, la amplificación isotérmica puede realizarse utilizando amplificación por exclusión cinética (KEA), también denominada amplificación por exclusión (Ex-Amp).

En algunas realizaciones, puede construirse una biblioteca de ácidos nucleicos amplificada/normalizada haciendo reaccionar un reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluyan, cada uno de ellos, una población sustancialmente clonal de amplicones de un ácido nucleico diana individual que se haya sembrado en el sitio. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación continúa hasta que se genera una cantidad suficiente de amplicones para llenar la capacidad del sitio de amplificación respectivo. De esta manera, llenar un sitio ya sembrado hasta su capacidad inhibe la llegada de los ácidos nucleicos diana y su amplificación en el sitio, produciendo así una población clonal de amplicones en el sitio. En algunas realizaciones, la clonalidad aparente puede conseguirse incluso si un sitio de amplificación no se llena hasta su capacidad antes de que un segundo ácido nucleico diana llegue al sitio. En algunas condiciones, la amplificación de un primer ácido nucleico diana puede continuar hasta un punto en que se produce una cantidad suficiente de copias para superar o saturar eficazmente la producción de copias de un segundo ácido nucleico diana que se transporta al sitio. Por ejemplo, en una realización en que se utiliza un proceso de amplificación en puente en un elemento circular (p. ej., una perla) con un diámetro inferior a 500 nm, se ha determinado que después de 14 ciclos de amplificación exponencial para un primer ácido nucleico diana, la contaminación de un segundo ácido nucleico diana en el mismo sitio producirá una cantidad insuficiente de amplicones contaminantes que afecte negativamente al análisis de secuenciación por síntesis en una plataforma de secuenciación Illumina.

En algunas realizaciones, puede producirse exclusión cinética cuando un proceso se produce a una velocidad lo suficientemente rápida como para excluir eficazmente que se produzca otro acontecimiento o proceso. Por ejemplo, una solución de perlas que tenga cebadores universales, donde las perlas se siembran aleatoriamente con ácidos nucleicos diana a partir en una solución y se generan copias de los ácidos nucleicos diana en un proceso de amplificación para llenar cada una de las perlas hasta su máxima capacidad. Según la exclusión cinética, los procesos de siembra y amplificación pueden llevarse a cabo simultáneamente en condiciones en las que la velocidad de amplificación supere la velocidad de siembra. Como tal, la velocidad relativamente rápida a la que se realizan copias en una perla particular que se ha sembrado con un primer ácido nucleico diana excluirá eficazmente la siembra de un segundo ácido nucleico en el sitio para la amplificación. Pueden llevarse a cabo métodos de amplificación de exclusión cinética como se describe en detalle en la descripción de la publicación de solicitud estadounidense N.º 2013/0338042.

En algunas realizaciones, la exclusión cinética puede aprovechar una velocidad relativamente lenta para iniciar la amplificación, tal como una velocidad lenta para hacer una primera copia de un ácido nucleico diana, en comparación con una velocidad relativamente rápida para hacer copias posteriores del ácido nucleico diana o de la primera copia del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la exclusión cinética se produce debido a la velocidad relativamente lenta de siembra de ácido nucleico diana, tal como difusión o transporte relativamente lentos en comparación con la velocidad relativamente rápida a la que se produce la amplificación para llenar el sitio, tal como una perla u otro sitio, con copias de la semilla de ácido nucleico. En otra realización, la exclusión cinética puede producirse debido a un retraso en la formación de una primera copia de un ácido nucleico diana que ha sembrado un sitio, tal como activación retardada o lenta, en comparación con la velocidad relativamente rápida a la que se hacen copias posteriores para llenar el sitio. En algunas realizaciones, puede haberse sembrado un sitio individual con varios ácidos nucleicos diana distintos, tales como varios ácidos nucleicos diana que pueden estar presentes en cada sitio antes de la amplificación. Sin embargo, la primera formación de copias para cualquier ácido nucleico diana dado puede activarse de forma aleatoria, de modo que la velocidad promedio de la primera formación de copias sea relativamente lenta en comparación con la velocidad a la que se generan copias posteriores. En este caso, aunque un sitio individual pueda

haber sembrado con varios ácidos nucleicos diana distintos, la exclusión cinética permitirá que solo se amplifique uno de esos ácidos nucleicos diana. Más específicamente, una vez activado un primer ácido nucleico diana para la amplificación, el sitio se llenará rápidamente a capacidad con sus copias, impidiendo de este modo que se hagan copias de un segundo ácido nucleico diana en el sitio.

Un reactivo de amplificación puede incluir componentes adicionales que faciliten la formación de amplicones y, en algunos casos, aumenten la velocidad de formación de los amplicones. Un ejemplo es una recombinasa. La recombinasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir la invasión/extensión repetida. Más específicamente, la recombinasa puede facilitar la invasión de un ácido nucleico diana por la polimerasa y la extensión de un cebador por la polimerasa utilizando el ácido nucleico diana como molde para la formación de amplicones. Este proceso puede repetirse como una reacción en cadena donde los amplicones producidos a partir de cada ronda de invasión/extensión sirven como moldes en una ronda posterior. El proceso puede producirse más rápidamente que la PCR estándar, ya que no se requiere un ciclo de desnaturalización, tal como mediante calentamiento o desnaturalización química. Como tal, la amplificación facilitada por recombinasa puede llevarse a cabo isotérmicamente. De forma general, es deseable incluir ATP u otros nucleótidos, o, en algunos casos, análogos no hidrolizables de los mismos, en un reactivo de amplificación facilitada por recombinasa para facilitar la amplificación. Una mezcla de recombinasa y proteína de unión monocatenaria (SSB, *single stranded binding*) es especialmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Las formulaciones ilustrativas para la amplificación facilitada por recombinasa incluyen las comercializadas como kits TwistAmp por TwistDx (Cambridge, Reino Unido). En los documentos US 5.223.414 y US 7.399.590, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, se exponen componentes útiles del reactivo de amplificación facilitado por recombinasa y las condiciones de reacción.

Otro ejemplo de un componente que puede incluirse en un reactivo de amplificación para facilitar la formación de amplicones y en algunos casos para aumentar la velocidad de formación de amplicones es una helicasa. La helicasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir una reacción en cadena de la formación de amplicones. El proceso puede producirse más rápidamente que la PCR estándar, ya que no se requiere un ciclo de desnaturalización, tal como mediante calentamiento o desnaturalización química. Como tal, la amplificación facilitada por helicasa puede llevarse a cabo isotérmicamente. Una mezcla de helicasa y proteína de unión monocatenaria (SSB) es especialmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Formulaciones ilustrativas para la amplificación facilitada por helicasa incluyen las comercializadas como kits de IsoAmp de Biohelix (Beverly, MA). Además, se describen ejemplos de formulaciones útiles que incluyen una proteína helicasa en los documentos US 7.399.590 y en US 7.829.284, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación pueden incluir una o más proteínas de unión al origen. Sin quedar ligados a ninguna teoría particular, la inclusión de una proteína de unión al origen en la reacción de amplificación facilita la formación de amplicones y, en algunos casos, aumenta la velocidad de formación de amplicones.

En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación pueden incluir además una polimerasa. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una polimerasa de desplazamiento de hebras, tal como una polimerasa Bst, una polimerasa polD, una polimerasa 9°N o una polimerasa phi29. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, el molde es ARN y la polimerasa puede incluir una transcriptasa inversa.

El mantenimiento de la representación o especificidad de la muestra es útil para muchos métodos de preparación de bibliotecas para varias aplicaciones analíticas posteriores, tales como la secuenciación de nueva generación (NGS) y la secuenciación dirigida. Por ejemplo, para muchas aplicaciones de bibliotecas de ADNc, tales como la búsqueda de genes expresados diferencialmente, resulta útil minimizar la distorsión de la representación del ADNc en una biblioteca con respecto a la población de ARNm inicial. Dicho de otra manera, el contenido de los ADNc individuales en la biblioteca, en algunas aplicaciones posteriores, puede ser proporcional al número de copias de los ARN iniciales. Por el contrario, para algunas otras aplicaciones, se pueden igualar las concentraciones de diferentes ADNc individuales en una biblioteca. Las realizaciones descritas en la presente memoria pueden mantener la complejidad de una biblioteca de ADN de entrada, incluida la proporción entre especies de ADN y posibles identificaciones de frecuencia de alelos menores, con poca o ninguna diferencia observada aparte de la cantidad de la biblioteca que se amplifica y normaliza.

Genotipado por secuenciación

Algunas realizaciones incluyen métodos y sistemas para el genotipado mediante la secuenciación de un ácido nucleico diana para identificar un SNP, una inserción, una delección o una duplicación en el ácido nucleico diana. En algunas de tales realizaciones, se puede preparar una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico diana obteniendo un sustrato que tiene una pluralidad de sondas de captura unidas al mismo. En algunas realizaciones, un sustrato comprende un soporte sólido. En algunas realizaciones, el sustrato es un sustrato plano. En algunas realizaciones, un sustrato plano incluye sitios separados, tales como pocillos. En algunas realizaciones, un sustrato puede incluir una pluralidad de perlas. En algunas realizaciones, las sondas de captura comprenden primeros sitios de amplificación y primeros cebadores específicos de locus. Algunas realizaciones incluyen la hibridación de una pluralidad de ácidos nucleicos diana con los primeros cebadores específicos de locus. En algunas realizaciones, los primeros cebadores específicos de locus se pueden extender para obtener sondas extendidas que contienen segundos sitios de amplificación. En algunas realizaciones, las

sondas extendidas pueden amplificarse y secuenciarse, identificando de este modo un SNP, una inserción, una delección o una duplicación en el ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, extender los primeros cebadores específicos de locus puede incluir hibridar segundos cebadores específicos de locus con los ácidos nucleicos diana y ligar los primeros cebadores específicos de locus con los segundos cebadores específicos de locus. En algunas realizaciones, se puede hibridar un oligonucleótido de extensión con el segundo cebador específico de locus y se puede extender el segundo cebador específico de locus con una polimerasa para incluir secuencias complementarias del oligonucleótido de extensión. En algunas realizaciones, las secuencias complementarias del oligonucleótido de extensión pueden incluir un segundo sitio de amplificación, un segundo cebador de secuenciación y/o un segundo índice.

En algunas realizaciones, las sondas extendidas se pueden amplificar para obtener una cantidad normalizada de productos de amplificación. En algunas realizaciones, la amplificación está limitada por la cantidad de sondas de captura o por la cantidad de cebadores de extensión. En algunas realizaciones, el sustrato comprende una cantidad normalizadora de sondas de captura y la cantidad de cebadores de extensión es igual o mayor que la cantidad normalizadora de sondas de captura. En algunas realizaciones, el sustrato comprende una cantidad normalizadora de cebadores de extensión y la cantidad de sondas de captura es igual o mayor que la cantidad normalizadora de sondas de captura. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión están unidos al sustrato. En algunas realizaciones, los cebadores de extensión están en solución.

En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión son incapaces o son esencialmente incapaces de hibridar entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión no son complementarios entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión comprenden secuencias de nucleótidos no complementarias entre sí. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación comprenden nucleótidos modificados que inhiben la hibridación con los cebadores de extensión. En algunas realizaciones, cada uno de los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión carecen del mismo tipo de nucleótido. En algunas realizaciones, los primeros sitios de amplificación carecen de tipos de nucleótidos complementarios entre sí; y los cebadores de extensión consisten esencialmente en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación. En algunas realizaciones, el primero sitio de amplificación carece de una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y timina (T); o guanina (G) y citosina (C). En algunas realizaciones, el primero sitio de amplificación consiste en una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y guanina (G); adenina (A) y citosina (C); citosina (C) y timina (T); o guanina (G) y timina (T). En algunas realizaciones, el primer sitio de amplificación consiste en una combinación de nucleótidos de adenina (A) y guanina (G).

Soportes sólidos

Algunas realizaciones incluyen uno o más sustratos, tales como soportes sólidos. Los soportes sólidos adecuados para los métodos descritos en la presente memoria generalmente pueden ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de cualquiera de múltiples materiales conocidos. Preferiblemente, el soporte sólido usado en las realizaciones descritas en la presente memoria puede ser de cualquier tipo adecuado que proporcione una capacidad de unión conocida, lo que da lugar a una cantidad sustancialmente no fluctuante de ácidos nucleicos unidos por cantidad fija de soporte sólido. Los ejemplos de tales materiales incluyen: polímeros inorgánicos, naturales y polímeros sintéticos. Los ejemplos específicos de estos materiales incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, gelatina, poliestireno, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similares, poliacrilamidas, geles de látex, silicio, plásticos, nitrocelulosa, poliestireno, dextrano, caucho, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poros de control, metales, dextranos reticulados (p. ej., Sephadex™), gel de agarosa (Sepharose™) y otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, los soportes en fase sólida pueden incluir soportes poliméricos sintéticos, tales como poliestireno, polipropileno, poliestireno sustituido (p. ej., poliestireno carboxilado o aminado), poliamidas, poliacrilamidas, poli(cloruro de vinilo) y similares, o cualquier material útil en cromatografía de afinidad de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la fase sólida puede ser una superficie plana, una superficie curva, un pocillo o parte de un dispositivo microfluídico.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el soporte sólido puede incluir perlas. Las perlas pueden tener cualquiera de una amplia variedad de formas, tales como esféricas, generalmente esféricas, ovaladas, discoidales, cúbicas, amorfas y otras formas tridimensionales. Las perlas pueden fabricarse utilizando una amplia variedad de materiales, incluidos, por ejemplo, resinas y polímeros. Las perlas pueden tener cualquier tamaño adecuado, incluyendo, por ejemplo, microperlas, micropartículas, nanopérlas y nanopartículas. En algunos casos, las cuentas reaccionan magnéticamente; en otros casos las cuentas reaccionan magnéticamente de forma significativa. Para perlas magnéticamente reactivas, el material magnéticamente reactivo puede constituir sustancialmente la totalidad de una perla, una parte de una perla o solo un componente de una perla. El resto de la perla puede incluir, entre otras cosas, material polimérico, recubrimientos y restos que permitan la unión de un reactivo de ensayo. Los ejemplos de perlas adecuadas incluyen microperlas de citometría de flujo, micropartículas y nanopartículas de poliestireno, micropartículas y nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, micropartículas y nanopartículas de poliestireno recubiertas, microperlas de sílice, microesferas y nanoesferas fluorescentes,

microesferas y nanoesferas fluorescentes funcionalizadas, microesferas y nanoesferas fluorescentes recubiertas, micropartículas y nanopartículas teñidas de color, micropartículas y nanopartículas magnéticas, micropartículas y nanopartículas superparamagnéticas (p. ej., partículas DYNABEADS®, disponibles en Invitrogen Group, Carlsbad, CA), micropartículas y nanopartículas fluorescentes, micropartículas y nanopartículas magnéticas recubiertas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas recubiertas y las descritas en el n.º de publicación de patente US-20050260686; el n.º de publicación de patente US-20030132538; el n.º de publicación de patente US-20050118574; el n.º de publicación de patente US-20050277197; el n.º de publicación de patente US-20060159962. Las perlas pueden estar preacopladas con una biomolécula u otra sustancia que sea capaz de unirse y formar un complejo con una biomolécula. Las perlas pueden estar preacopladas con un anticuerpo, proteína o antígeno, sonda de ADN/ARN o cualquier otra molécula con afinidad por una diana deseada. Las características de las perlas se pueden emplear en realizaciones de aspectos de multiplexación. Se pueden encontrar ejemplos de perlas que tienen características adecuadas para multiplexación, así como métodos para detectar y analizar señales emitidas por dichas perlas, en el n.º de publicación de patente US-20080305481; el n.º de publicación de patente US-20080151240; el n.º de publicación de patente US-20070207513; el n.º de publicación de patente US-20070064990; el n.º de publicación de patente US-20060159962; el n.º de publicación de patente US-20050277197; el n.º de publicación de patente US-20050118574.

En algunas realizaciones, las perlas pueden ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de cualquiera de múltiples materiales conocidos. En algunas realizaciones, la perla puede ser, por ejemplo, perlas magnéticas, perlas paramagnéticas, perlas de plástico, perlas de poliestireno, perlas de vidrio, perlas de agarosa y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, las perlas son perlas de aproximadamente 2 a 100 µm de diámetro o de 10 a 80 µm de diámetro, más preferiblemente de 20 a 40 µm de diámetro. En algunas realizaciones, las perlas se pueden proporcionar en solución. En algunas realizaciones, las perlas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En algunas realizaciones, el soporte sólido puede incluir estreptavidina. En algunas realizaciones, el soporte sólido es, o puede incluir, perlas recubiertas con estreptavidina. En algunas realizaciones, el soporte sólido es o puede incluir perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina. En algunas realizaciones donde el soporte de fase sólida incluye estreptavidina, las moléculas de ácido nucleico se pueden biotinilar para facilitar la unión de los ácidos nucleicos al soporte sólido.

Ácidos nucleicos de entrada

En algunas realizaciones, una muestra de ácido nucleico de entrada incluye ácidos nucleicos monocatenarios. En algunas realizaciones, al menos un ácido nucleico diana en una muestra de ácido nucleico de entrada puede ser bicatenario o puede hacerse al menos parcialmente bicatenario usando procedimientos apropiados. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico de entrada incluye una mezcla de moléculas de ácido nucleico monocatenario y moléculas de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico diana pueden ser lineales. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico diana pueden ser circulares o incluir una combinación de regiones lineales y circulares.

En algunas realizaciones, la cantidad de un ácido nucleico de entrada puede ser de aproximadamente 0,01 ng a 100 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 0,1 ng, 0,2 ng, 0,3 ng, 0,4 ng, 0,5 ng, 0,6 ng, 0,7 ng, 0,8 ng, 0,9 ng, 1 ng, 1,1 ng, 1,2 ng, 1,3 ng, 1,5 ng, 2,0 ng, 2,5 ng, 3,0 ng, 3,5 ng, 4,0 ng, 4,5 ng, 5,0 ng o está en un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. En algunas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 5,5 ng, 6,0 ng, 6,5 ng, 7,0 ng, 7,5 ng, 8,0 ng, 8,5 ng, 9,0 ng, 9,5 ng, 10,0 ng, 11,0 ng, 11,5 ng, 12,0 ng, 12,5 ng, 13,0 ng, 13,5 ng, 14,0 ng, 15,0 ng, 15,5 ng, 16,0 ng, 16,5 ng, 17,0 ng, 18,0 ng, 18,5 ng, 19,0 ng, 19,5 ng, 20,0 ng o está en un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. En algunas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 21,0 ng, 22,0 ng, 22,5 ng, 23,0 ng, 23,5 ng, 24,0 ng, 24,5 ng, 25,0 ng, 26,0 ng, 27,0 ng, 28,0 ng, 29,0 ng, 30,0 ng, 32,5 ng, 35,0 ng, 37,5 ng, 40,0 ng, 42,5 ng, 45,0 ng, 47,5 ng, 50,0 ng, 52,5 ng, 55,0 ng, 60,0 ng, 65,0 ng, 70,0 ng, 75,0 ng, 80,0 ng, 85,0 ng, 90,0 ng o está en un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. En algunas realizaciones, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 0,08, 0,4, 2,0, 10,0 o 50,0 ng.

En algunas realizaciones, se realiza una etapa de amplificación en una única biblioteca de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se realiza una etapa de amplificación en una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los productos de amplificación de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan para formar una biblioteca de ácidos nucleicos combinada agrupada. En algunas realizaciones, los productos de amplificación derivados de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan después de eliminarlos del soporte en fase sólida. En algunas realizaciones, los productos de amplificación de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan antes de eliminarlos del soporte en fase sólida. En algunas realizaciones, la pluralidad de muestras de ácido nucleico de entrada se combina antes de la etapa de amplificación. En algunas realizaciones, la cantidad de cada muestra de ácido nucleico de entrada no está normalizada en la pluralidad de muestras de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la biblioteca se genera a partir de ADN. En algunas realizaciones, la biblioteca se genera a partir de ARN. En algunas realizaciones, la biblioteca se genera a partir de proteínas. En algunas realizaciones, la biblioteca se genera a partir de una combinación de ADN, ARN y proteína. Por ejemplo, se pueden usar conjugados

de anticuerpo-oligo para generar una biblioteca en un soporte sólido y posteriormente normalizarse mediante amplificación limitada en un soporte sólido.

En algunas realizaciones, la pluralidad de muestras de ácido nucleico de entrada comprende al menos 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 200, 384, 400, 500, 100, 1500 o un número de muestras de ácido nucleico de entrada dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los números antes mencionados.

En algunas realizaciones, la representación relativa de cada población de productos de amplificación constituyentes se puede ajustar de forma ventajosa en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. Por “ajustar de forma ventajosa”, como se utiliza en la presente memoria, se entiende que la cantidad de cada producto de amplificación constituyente en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada se puede controlar o predeterminar. En algunas realizaciones, la cantidad de cada producto de amplificación constituyente está representada de manera sustancialmente uniforme en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. Como alternativa, la pluralidad de productos de amplificación constituyentes pueden estar presentes en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada en concentraciones diferentes y predeterminadas. Esto se puede lograr ensamblando diferentes cantidades de los soportes de fase sólida con los productos de amplificación que permanecen fijados sobre ellos o reuniendo diferentes cantidades de la pluralidad de productos de amplificación constituyentes después de recuperarse del soporte de fase sólida. Dicho de otra manera, el ajuste ventajoso puede incluir ajustar selectivamente tanto la representación proporcional como el número de población de productos de amplificación constituyentes en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. En algunas realizaciones, un ajuste ventajoso puede incluir someter una muestra de productos de amplificación constituyentes a al menos una etapa de procesamiento, además de recuperar productos de amplificación del soporte de fase sólida.

Indexación por extensión

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria incluyen la indexación de bibliotecas de ácidos nucleicos mediante la extensión de oligonucleótidos de indexación hibridados con secuencias comunes en moléculas de ácido nucleico. Algunos protocolos para la indexación de bibliotecas de ADN pueden incluir múltiples etapas enzimáticas y de purificación, o pueden realizarse en una etapa final de amplificación por PCR. Dichos protocolos de indexación también pueden depender de un único ciclo de indexación, por lo que no admiten la indexación combinatoria que puede incluir el marcaje individual de una gran cantidad de moléculas en una sola muestra con una combinación individual de índices. De forma ventajosa, las realizaciones proporcionadas en la presente memoria pueden incluir indexación tanto individual como combinatoria, tal como múltiples niveles de indexación. Algunas realizaciones incluyen indexar ácidos nucleicos en solución o indexar ácidos nucleicos unidos a un sustrato, tales como perlas. Algunas realizaciones incluyen indexación de ácidos nucleicos, tales como ADN, tal como cromatina en bruto unida a perlas. Algunas realizaciones incluyen indexación en el sitio de ácidos nucleicos, tales como ADN presente en el interior de células/núcleos.

Algunas realizaciones para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos indexados incluyen añadir adaptadores Y a una pluralidad de ácidos nucleicos diana. En algunas realizaciones, un adaptador Y incluye un ácido nucleico bicatenario que comprende una parte o extremo en el que ambas cadenas se hibridan entre sí, y una parte o extremo en el que las cadenas no se hibridan entre sí. En algunas realizaciones, los adaptadores Y se añaden al primer y segundo extremo de cada ácido nucleico diana y cada adaptador Y comprende una primera cadena que comprende un primer sitio de unión del cebador y un elemento de mosaico, y una segunda cadena que comprende un segundo sitio de unión del cebador y un complemento del elemento de mosaico. Algunas realizaciones también incluyen la hibridación de un primer oligonucleótido de extensión con el segundo sitio de unión del cebador, en donde el primer oligonucleótido de extensión comprende un primer índice y un tercer sitio de unión del cebador. Algunas realizaciones también incluyen extender la segunda cadena que comprende el segundo sitio de unión del cebador, añadiendo de este modo el primer índice a los ácidos nucleicos diana.

En algunas realizaciones, un extremo 5' de la primera cadena del adaptador Y es resistente a la degradación por nucleasa. Por ejemplo, el extremo 5' de la primera cadena del adaptador Y puede incluir un enlace fosforotioato entre al menos dos nucleótidos consecutivos. En algunas realizaciones, un extremo 5' de la segunda cadena del adaptador Y está fosforilado.

En algunas realizaciones, añadir adaptadores Y a una pluralidad de ácidos nucleicos diana incluye poner en contacto la pluralidad de ácidos nucleicos diana con una pluralidad de transposomas, en donde cada transposoma comprende un adaptador Y y una transposasa. En algunas realizaciones, los transposomas comprenden un dímeros. En algunas realizaciones, la transposasa comprende una transposasa Tn5. En algunas realizaciones, los transposomas están unidos a un sustrato. En algunas realizaciones, el sustrato comprende una pluralidad de perlas. En algunas realizaciones, las perlas son magnéticas.

En algunas realizaciones, se bloquea un extremo 3' del primer oligonucleótido de extensión. En algunas realizaciones, un extremo 5' del primer oligonucleótido de extensión está fosforilado. En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido de extensión está unido a una perla. Algunas realizaciones también incluyen escindir el primer oligonucleótido de extensión de la perla antes de extender la segunda cadena que comprende el segundo sitio de unión del cebador.

En algunas realizaciones, extender la segunda cadena que comprende el segundo sitio de unión del cebador comprende extensión con polimerasa y/o extensión con una ligasa. En algunas realizaciones, la extensión con una ligasa comprende: hibridar un oligonucleótido de ligamiento con el primer oligonucleótido de extensión hibridado con el segundo sitio de unión del cebador; y ligar el oligonucleótido de ligamiento con la segunda cadena que comprende el segundo sitio de unión del cebador. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de ligamiento comprende un índice adicional. En algunas realizaciones, el oligonucleótido de ligamiento comprende un sitio de unión del cebador adicional.

Algunas realizaciones también incluyen eliminar el primer oligonucleótido de extensión después de extender la segunda cadena que comprende el segundo sitio de unión del cebador. En algunas realizaciones, la eliminación comprende un tratamiento con exonucleasa. En algunas realizaciones, el primer oligonucleótido de extensión comprende nucleótidos de uracilo y la eliminación comprende la degradación del primer oligonucleótido de extensión con una enzima reactiva de escisión específica de uracilo (USER).

Algunas realizaciones también incluyen añadir un segundo índice a los ácidos nucleicos diana que comprenden el primer índice. En algunas realizaciones, añadir el segundo índice comprende: hibridar un segundo oligonucleótido de extensión con el tercer sitio de unión del cebador de los ácidos nucleicos diana que comprenden el primer índice, en donde el segundo oligonucleótido de extensión comprende el segundo índice; y extender la segunda cadena que comprende el tercer sitio de unión del cebador, añadiendo de este modo el segundo índice a los ácidos nucleicos diana que comprenden el primer índice. En algunas realizaciones, se bloquea un extremo 3' del segundo oligonucleótido de extensión. En algunas realizaciones, un extremo 5' del segundo oligonucleótido de extensión está fosforilado.

En algunas realizaciones, extender la segunda cadena que comprende el tercer sitio de unión del cebador comprende extensión con polimerasa. En algunas realizaciones, extender la segunda cadena que comprende el tercer sitio de unión del cebador comprende extensión con una ligasa. Algunas realizaciones también incluyen eliminar el segundo oligonucleótido de extensión después de extender el tercer sitio de unión del cebador.

Algunas realizaciones también incluyen añadir un tercer índice a los ácidos nucleicos diana que comprenden el segundo índice. Algunas realizaciones también incluyen añadir un índice adicional a los ácidos nucleicos diana que comprenden el tercer índice.

Algunas realizaciones también incluyen amplificar los ácidos nucleicos diana que comprenden uno o más índices, tales como un primer índice, un segundo índice, un tercer índice o más. En algunas realizaciones, la amplificación comprende hibridar cebadores de amplificación con los primeros sitios de unión del cebador y con un tercer, cuarto o quinto sitio de unión del cebador. En algunas realizaciones, los sitios de unión del cebador pueden incluir secuencias genéricas tales como una secuencia P5 o P7 o un complemento de las mismas. En algunas realizaciones, la amplificación comprende una PCR. En algunas realizaciones, la amplificación comprende amplificación en puente. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana comprenden ADN genómico.

Algunas realizaciones incluyen un método de indexación combinatoria de una pluralidad de ácidos nucleicos diana. Algunas realizaciones incluyen (a) obtener un conjunto de ácidos nucleicos indexados primarios, que comprende: añadir un primer índice a una pluralidad de subpoblaciones de ácidos nucleicos diana, en donde se añade un primer índice diferente a cada subpoblación, y combinar las subpoblaciones que comprenden los primeros índices diferentes para obtener el conjunto de ácidos nucleicos indexados primarios, en donde el primer índice se añade a una subpoblación de ácidos nucleicos diana según cualquiera de las realizaciones anteriores; (b) dividir el conjunto en una pluralidad de subpoblaciones de ácidos nucleicos indexados primarios; y (c) obtener un conjunto de ácidos nucleicos indexados secundarios, que comprende: añadir un segundo índice a la pluralidad de subpoblaciones de ácidos nucleicos indexados primarios, en donde se añade un segundo índice diferente a cada subpoblación, y combinar las subpoblaciones que comprenden los segundos índices diferentes para obtener el conjunto de ácidos nucleicos indexados secundarios. Algunas realizaciones también incluyen repetir (b) y (c) y añadir índices adicionales a subpoblaciones indexadas. En algunas realizaciones, la adición de un primer índice a una subpoblación de ácidos nucleicos diana se realiza en un compartimento seleccionado entre un pocillo, un canal o una gotícula.

En la FIG. 14, se presenta un ejemplo de una indexación de un solo nivel por extensión de ADN tagmentado en solución. En resumen, la FIG. 14 muestra indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en solución. El ADN se tagmenta en solución mediante Y-TSM, seguido de la inactivación de TSM, la hibridación de oligos de indexación y la extensión. Si es necesario, se realiza un tratamiento con exonucleasa y una amplificación final por PCR. De este modo, en una primera etapa, el ADN genómico se tagmenta con un transposoma (TSM), de modo que el transposoma se inserta en el ADN y lo fragmenta. El transposoma incluye ácidos nucleicos que contienen secuencias de extremos en mosaico (ME) y secuencias comunes CS1 y CS2'. La inserción de las secuencias transposómicas en el ADN da lugar a que el ADN tenga un extremo con un adaptador en Y. Cada fragmento de ADN puede estar flanqueado por diferentes secuencias comunes en cada extremo. En algunas realizaciones, varios nucleósidos en el extremo 5' de los ácidos nucleicos del transposoma, tales como la cadena de transferencia, pueden incluir enlaces fosforotioato resistentes a la degradación por nucleasas. Como se muestra en la FIG. 14, se puede detener la tagmentación y se pueden eliminar los transposomas, tal como mediante tratamiento con SDS. Un oligo de indexación, tal como el oligo de indexación CS3_i1_CS2, se puede hibridar con el adaptador Y. Se puede usar una mezcla de ADN polimerasa y ligasa para llenar y ligar el hueco de 9 bases generado durante la tagmentación en la cadena sin transferencia y para extender sobre el

oligo de indexación hibridado. Se puede añadir un cóctel o una única exonucleasa 5' para eliminar el exceso de oligonucleótidos de indexación. La PCR se puede realizar con cebadores adaptadores de secuenciación que contienen secuencias CS1 y CS3. Sin embargo, el tratamiento con exonucleasas se puede omitir si se han usado concentraciones relativamente bajas de oligonucleótidos de indexación o si se han hibridado primero oligonucleótidos de indexación con ADN tagmentado todavía unido a Tn5. El ADN se puede purificar usando una columna antes de la reacción de extensión. En algunas realizaciones, los cebadores de indexación se pueden sintetizar con bases de uracilo en lugar de timina y después eliminarse mediante degradación con una enzima, tal como la enzima de reactivo de escisión específico de uracilo (USER). En algunas realizaciones que incluyen un flujo de trabajo sin PCR, CS1 y CS3 pueden contener secuencias P5 y P7 que pueden utilizarse para agruparse en una celda de flujo.

En la FIG. 15, se muestran algunas realizaciones de un flujo de trabajo de indexación aplicado para ADN tagmentado en perlas. En resumen, la FIG. 15 muestra una realización de indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en perlas en la que el ADN está tagmentado mediante transposomas con adaptadores Y unidos previamente a perlas magnéticas y se realizan todas las etapas consiguientes, incluida la inactivación de TSM, hibridación de oligos de indexación y llenado/ligamiento/extensión de huecos mediante resuspensión y granulación de las perlas en diferentes tampones. Se puede observar una ventaja de realizar la indexación por extensión en los flujos de trabajo de indexación combinatoria, tales como la adición de múltiples índices por etapas en una serie de reacciones de división y agrupamiento. Dependiendo del número de niveles de indexación, la indexación combinatoria puede incluir la indexación individual de millones de moléculas, tales como las de una sola célula, con un conjunto relativamente pequeño, tal como cientos, de índices iniciales.

En la FIG. 16 y FIG. 17, se representan algunas realizaciones que incluyen la adición de múltiples índices a una molécula de ADN. La FIG. 16 representa una realización ilustrativa de la adición de índices por extensión al ADN tagmentado en perlas. En algunas realizaciones, Tn5 se elimina durante una etapa de tagmentación de parada y los huecos de una cadena sin transferencia se rellenan y ligan simultáneamente con la indexación de primer nivel. La eliminación de oligonucleótidos de indexación se logra mediante lavado de perlas con NaOH, seguido de neutralización e hibridación del cebador de indexación del siguiente nivel. La FIG. 17 representa una realización que incluye tagmentación en solución. En algunas realizaciones, se realizan etapas de extensión de indexación con Tn5 unido al filamento de ADN para mantener la contigüidad del ADN. La eliminación de Tn5 y el ligamiento y relleno de huecos de cadenas sin transferencia se realizan en la última etapa del flujo de trabajo, justo antes de la PCR. Los cebadores de indexación se liberan mediante tratamiento con exonucleasa específica 5' o se sintetizan con uracilo en lugar de timina, y los complejos posteriores a la extensión se tratan con enzima USER. Los que no se muestra en la FIG. 16 y la FIG. 17 son ciclos de división-agrupamiento incluidos en realizaciones de un flujo de trabajo de indexación combinatoria. En las realizaciones representadas en la FIG. 16 y la FIG. 17, después de la adición del primer índice, los oligonucleótidos de indexación se pueden eliminar por lavado, tal como en un flujo de trabajo basado en perlas de la FIG. 16, o degradarse, tal como en un flujo de trabajo en solución de la FIG. 17. Puede tener lugar un segundo nivel de indexación en el que se pueden hibridar oligonucleótidos de segundo nivel, seguido de su extensión y retirada. En algunas realizaciones, los ciclos de hibridación/extensión/retirada del cebador de indexación se pueden repetir varias veces dependiendo de la complejidad requerida del ensayo.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden degradarse con un número creciente de ciclos. Para reducir la degradación de ácidos nucleicos, tales como oligonucleótidos, algunas realizaciones pueden incluir una o más etapas del método representados en la FIG. 18. En algunas realizaciones, se puede realizar una indexación de tres niveles usando múltiples hibridaciones-etapas individuales de extensión/ligamiento en solución. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células tagmentadas con Tn5 unida se distribuyen en pocillos de una placa de microtitulación. El contenido de cada pocillo se puede hibridar con oligonucleótidos de indexación fosforilados en 5' de primer nivel individuales. Se puede eliminar el exceso de oligonucleótidos de indexación no hibridados. Las células se pueden agrupar y dividir en pocillos de una placa de microtitulación con un conjunto de segundos oligonucleótidos de indexación fosforilados en 5'. Los segundos oligonucleótidos de indexación se pueden hibridar con los extremos 5' pegajosos de los primeros oligonucleótidos de indexación, seguido de la retirada de Tn5 y el ligamiento y relleno de huecos de ambos huecos en la cadena sin transferencia. Los elementos de la biblioteca se pueden agrupar y utilizar en un flujo de trabajo de indexación de dos niveles sin PCR o dividirse para la amplificación por PCR con cebadores de indexación, para añadir el tercer nivel de indexación. Mediante el uso de oligonucleótidos de indexación fosforilados en 5' en cada etapa de indexación, este protocolo se puede ampliar de tres a múltiples niveles de indexación. Este flujo de trabajo se puede utilizar con ATAC-seq de células individuales, ya que el exceso de oligonucleótidos de indexación se puede eliminar por lavado en las etapas de agrupación de células. Algunas realizaciones incluyen el uso de protocolos similares con ADN tagmentado en perlas para aplicaciones de lecturas ligadas largas.

En algunas realizaciones, la indexación por hibridación-extensión se puede realizar en compartimentos individuales que contienen una única perla de indexación de un gran conjunto de perlas cubiertas por oligonucleótidos de indexación escindibles únicos. Los ejemplos de compartimentos incluyen pocillos en una placa de micropocillos, canales de tipo Fluidigm o gotículas. Para proporcionar información sobre fases o resolución de células individuales, el ADN tagmentado para indexación puede estar preunido a perlas o estar contenido dentro de una envoltura nuclear. En la FIG. 19, se representa una realización ilustrativa de indexación en un solo nivel de ADN tagmentado unido a perlas mediante hibridación-extensión en gotículas. La indexación de un solo nivel mediante hibridación-extensión en gotículas puede incluir ADN tagmentado con transposomas adaptadores Y unidos previamente a perlas que se

emulsionan con un conjunto de perlas/partículas de hidrogel cubiertas individualmente por oligonucleótidos de indexación escindibles y otros componentes necesarios para la escisión y extensión de oligonucleótidos. Se pueden generar gotículas mediante un generador de gotículas o con reactivos de emulsión con el objetivo de encapsular una perla de tagmentación y una perla de indexación por recipiente. Tras la encapsulación, los oligonucleótidos de indexación se liberan, se hibridan con ADN tagmentado y se extienden. El ADN indexado se amplifica por PCR después de romper la emulsión.

En algunas realizaciones, se pueden usar gotículas para una etapa de hibridación. En algunas realizaciones, las etapas de extensión posteriores se pueden realizar a granel después de liberarse el contenido de las gotículas. La FIG. 20 representa una realización que incluye indexación de un solo nivel mediante hibridación en extensión a granel en gotículas. En algunas realizaciones, el ADN tagmentado se emulsiona con un conjunto de perlas/partículas de hidrogel cubiertas individualmente por oligonucleótidos de indexación escindibles y solo se incluyen componentes para la escisión de oligo. Tras la encapsulación, los oligonucleótidos de indexación se liberan y se hibridan con ADN tagmentado. Las siguientes etapas, incluida la extensión de los oligonucleótidos de indexación, se pueden realizar después de romper la emulsión.

Algunas realizaciones también incluyen moléculas de ADN enriquecidas en perlas injertadas con oligonucleótidos que contienen secuencias específicas de locus. En resumen, se añade un oligonucleótido de indexación de muestra a la mezcla de enriquecimiento/hibridación y se extiende al mismo tiempo que se sella el hueco entre los oligonucleótidos de enriquecimiento específicos de locus en la etapa posterior al enriquecimiento. Como se muestra en la FIG. 21, el ADN genómico amplificado se desnaturaliza y se hibrida con una sonda específica de locus (LSP1) en una perla de captura, diseñada inmediatamente corriente arriba del SNP de interés. Simultáneamente, los oligonucleótidos de LSP2 fosforilados en 5' que contienen la secuencia CS2' se hibridan a una o varias bases en dirección corriente abajo del mismo SNP. La mezcla de hibridación también se complementa con un oligonucleótido de indexación, que contiene una secuencia índice flanqueada por secuencias comunes CS2 y P7. La biblioteca no unida, el exceso de LSP2 y los oligonucleótidos de indexación se lavan mediante lavados rigurosos, seguidos de la extensión de LSP1 y LSP2 sobre el SNP y los oligonucleótidos de indexación, respectivamente. La construcción extendida y ligada se lava en condiciones desnaturizantes para eliminar el ADN genómico hibridado y el oligo de indexación antes de la reacción de normalización/amplificación.

Aumento de la eficiencia de las reacciones de polimerización

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos incluyen el uso de polimerasas que extienden los cebadores incorporando trifosfatos de desoxinucleósidos (dNTP) en los extremos 3' de los cebadores en presencia de metales catalíticos, tales como Mg^{2+} . Una reacción de polimerización directa incluye la adición de un nucleótido a un cebador para generar un cebador extendido y pirofosfato inorgánico (PPi); sin embargo, es posible la reacción inversa y cantidades crecientes de PPi pueden inhibir la polimerización.

La acumulación de PPi aumenta cuando las condiciones de reacción producen grandes cantidades de ADN, tal como $>0,4 \text{ ug/ul}$ durante reacciones isotérmicas de amplificación del genoma completo. La acumulación de un complejo de PPi de magnesio se puede visualizar como un precipitado blanco visible. El grado de precipitado observado depende del tiempo y aumenta con el tiempo en las reacciones de amplificación del genoma completo. Sin embargo, la precipitación en reacciones de amplificación puede interferir con aplicaciones en las que se desea un alto rendimiento de ADN, tales como aplicaciones de genómica unicelular. La extensión del ADN en los nanopocillos puede verse afectada porque la concentración local puede elevarse debido a los volúmenes confinados, tales como los grupos de ADN en los nanopocillos que se utilizan durante los acontecimientos químicos de SBS.

Algunas realizaciones de los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria incluyen modificar un ácido nucleico que comprende: amplificar o extender el ácido nucleico en presencia de una polimerasa. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión se realizan en condiciones adecuadas para eliminar PPi, para inhibir la pirofosforólisis y/o inhibir la formación de un complejo de Mg^{2+} -PPi. En algunas realizaciones, el PPi es soluble. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión se realizan en presencia de una pirofosfatasa inorgánica. En algunas realizaciones, la tasa de alcance de un rendimiento de un producto de amplificación y/o extensión aumenta en presencia de la pirofosfatasa inorgánica en comparación con una tasa de alcance de un rendimiento de un producto de amplificación y/o extensión en la ausencia de la pirofosfatasa inorgánica. En algunas realizaciones, la velocidad para lograr un rendimiento de un producto de la amplificación y/o la extensión aumenta al menos 2 veces, al menos 3 veces o al menos 5 veces. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión se realizan en condiciones isotérmicas. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión comprenden realizar una reacción seleccionada de una PCR, una amplificación en puente, una amplificación del genoma completo, una amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), una amplificación de ácidos nucleicos obtenidos de una sola célula, una reacción de secuenciación por síntesis (SBS) y una amplificación por exclusión (ExAmp).

En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión comprenden realizar una amplificación a partir de ácidos nucleicos obtenidos de una sola célula o de ácidos nucleicos sin células. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión comprenden realizar una reacción de secuenciación por síntesis (SBS). En algunas realizaciones, la amplificación y/o la extensión comprenden realizar una amplificación en puente.

En la SBS, para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde, se controla la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico (p. ej., un ácido nucleico o amplicón del mismo). El proceso químico subyacente puede ser la polimerización (p. ej., catalizada por una enzima polimerasa). En una realización particular de SBS basada en polimerasa, se añaden nucleótidos etiquetados con fluorescencia a un cebador (extendiéndose de ese modo el cebador) de una manera dependiente del molde, de modo que, para determinar la secuencia del molde, pueda utilizarse la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador. En algunas realizaciones, la SBS incluye pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de PPi a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico incipiente (Ronaghi, y col., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi y col. *Science* 281(5375), 363 (1998); patentes US- n.º 6.210.891; 6.258.568 y 6.274.320). En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar convirtiéndolo en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfúrilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar mediante fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede controlar a través de un sistema de detección de luminiscencia. Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para alojar moléculas de ácido nucleico amplificadas producidas mediante algunos métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria. Una o más moléculas de ADN amplificadas en dicho formato pueden someterse a una SBS o a otra técnica de detección que implique el suministro repetido de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más nucleótidos marcados, una ADN polimerasa, etc., pueden fluir hacia/a través de una cubeta de lectura que contenga una o más moléculas de ácido nucleico amplificado. Pueden detectarse aquellos sitios en los que la extensión del cebador provoque la incorporación de un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que finalice la extensión adicional del cebador una vez que se haya añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, a un cebador se le puede añadir un análogo de nucleótido que tenga una fracción de terminación reversible, de modo que no se pueda producir la extensión posterior hasta que se suministre un agente desbloqueante para eliminar la fracción. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, puede suministrarse un reactivo de desbloqueo a la célula de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados pueden llevarse a cabo entre las diversas etapas de suministro. A continuación, el ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando de este modo una secuencia de longitud n. Se describen procedimientos de SBS, sistemas de fluidos y plataformas de detección ilustrativos que pueden adaptarse fácilmente para su uso con métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria, por ejemplo, en Bentley y col., *Nature* 456:53-59 (2008), documento WO 04/018497; patentes US- n.º 7.057.026; patentes US- n.º 7.329.492; patentes US- n.º 7.211.414; patentes US- n.º 7.315.019; patentes US- N.º 7.405.281.

Otras realizaciones incluyen la amplificación y/o extensión de ácidos nucleicos que comprenden extensión y ligamiento de oligonucleótidos, amplificación por círculo rodante (RCA) (Lizardi y col., *Nat. Genet.* 19:225-232 (1998)) y ensayo de ligadura de oligonucleótidos (OLA). Véanse, p. ej., las patentes US- n.º 7.582.420, 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; documentos EP 0320308; EP 0336731; EP 0439182; WO 90101069; WO 89/12696; y WO 89109835. Se apreciará que estas metodologías de amplificación se pueden diseñar para amplificar fragmentos de ácido nucleico inmovilizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir amplificación de sonda de ligamiento o reacciones de ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir una reacción de extensión de cebador por ligamiento que contiene cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. Como ejemplo no limitativo de cebador de extensión y cebadores de ligamiento que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores utilizados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, CA) como se ilustra en las patentes estadounidenses n.º 7.582.420 y 7.611.869.

Los métodos de amplificación isotérmica ilustrativos incluyen la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) como se ilustra, por ejemplo, en Dean y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5261-66 (2002) o amplificación isotérmica de ácido nucleico por desplazamiento de cadena ilustrada, por ejemplo, en la patente US- 6.214.587. Otros métodos no basados en PCR que pueden utilizarse en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, *strand displacement amplification*) que se describe, por ejemplo, en Walker y col., *Molecular Methods for Virus Detection*, Academic Press, Inc., 1995; patentes US- 5.455.166 y US-5.130.238, y en Walker y col., *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992) o amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada que se describe, por ejemplo, en Lage y col., *Genome Research* 13:294-307 (2003).

Algunas realizaciones incluyen amplificación tal como la amplificación en puente. Se describen ejemplos de amplificación en puente en los documentos U.S. 20200181686, U.S. 20190374923, U.S. 20180291444 y U.S. 20170342406. En algunas realizaciones, la amplificación en puente puede incluir amplicones bicatenarios o parcialmente bicatenarios inmovilizados sobre un soporte sólido y producidos a partir de una reacción de extensión, que se desnaturalizan y la cadena inmovilizada se hibrida con un cebador de captura universal mediante hibridación con un adaptador. La estructura resultante se inmoviliza en ambos extremos para crear un puente y el cebador de captura universal se puede extender y después amplificar usando, por ejemplo, una región del cebador universal contenida en el cebador de captura específico de la diana. Este segundo cebador de captura universal puede ser diferente del primer cebador universal complementario de la secuencia adaptadora. La cadena que no está inmovilizada puede, por ejemplo, eliminarse mediante lavado. La amplificación en puente puede dar lugar a un número uniforme de grupos o colonias para amplicones dentro de una pluralidad. En algunas realizaciones, la amplificación puede incluir una amplificación por exclusión. Véanse, p. ej., los documentos U.S. 20200181686 y U.S. 20190374923.

Ejemplos

Se desarrolló un método que utilizaba un sistema de cebadores “GGA/AAG”. Un cebador GGA tenía la secuencia de la Id de sec. n.º 03 (AAAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAA); un cebador AAG tenía la secuencia de la Id de sec. n.º 04 (AAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAA). En este método, ni un cebador en la perla (sonda de captura) ni un cebador en solución (cebador de extensión) incluían nucleótidos T o C y se usaron para impulsar la amplificación isotérmica con Ex-amp. Los cebadores no pudieron interactuar consigo mismos ni entre sí y, como resultado, no formaron oligodímeros en la superficie de la perla.

Ejemplo 2: Eficiencia de la normalización en perlas de GGA/AAG

Tabla 1

20

Sistema de cebadores	P5/P7	GGA/AAG
Relación de salida (alta:baja)	9,1X	2,9X

5 Las bibliotecas se hibridaron con perlas durante 1 hora o durante la noche, para diversas cantidades del ADN de entrada de la biblioteca. La FIG. 12 muestra que la hibridación durante la noche usando el sistema P5/P7 dio lugar a una cantidad significativa de subproductos.

10 Ejemplo 3: Genotipado mediante secuenciación con sistemas de cebadores GGA/AAG o P5/P7

Los sistemas de cebadores GGA/AAG o P5/P7 se compararon en un estudio con grupos de perlas de 12 bibliotecas. En resumen, se utilizaron repeticiones de 4,8 M de perlas/condición (800 K de cada tipo de perla) para cada conjunto de perlas. Se amplificó el genoma completo de ADN humano y se hibridaron aproximadamente 50 µg del ADN amplificado durante la noche en formamida al 24 % a temperatura ambiente con sondas de captura en las perlas. Se lavó el ADN no hibridado de las perlas, se extendieron las sondas de captura, se eliminó el ADN hibridado de las sondas de captura extendidas y se amplificaron las sondas de captura usando cebadores P7 o AAG en solución. Los productos amplificados se analizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR). La FIG. 13 muestra productos de qPCR ilustrativos con y sin amplificación en perlas. Se observaron mayores rendimientos de amplificación utilizando el sistema de cebadores GGA/AAG.

20 Ejemplo 4: Genotipado mediante secuenciación con sistema de cebadores GGA/AAG

Se proporciona un protocolo ilustrativo sustancialmente similar al protocolo utilizado en el ejemplo 3. La nomenclatura de los cebadores es coherente con la FIG. 5 y la FIG. 6. Las etapas incluyeron una hibridación durante la noche; una ligadura de relleno de huecos; normalización de exAMP; exAMP de una sola etapa y/o exAMP de dos etapas; y secuenciación.

Hibridación durante la noche: (1) Se hibridó LSP2 y cebador índice en una relación 10:9 (la relación LSP2:índice correspondió a 5 µM: 4,5 µM) en tampón de hibridado 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM) y se mantuvo en hielo. (2) Se preparó un conjunto de perlas LSP1 mezclando cantidades iguales de un panel de perlas unidas previamente individualmente con oligos de captura para loci genómicos específicos y un oligo de "amplificación de GGA" (Id de sec. n.º: 05) que sirvió en etapas posteriores como cebador para la normalización de ExAMP. (3) Se añadió a cada tubo de muestras la cantidad deseada de conjunto de perlas LSP1 (ejemplo: 500 perlas LSP1/locus) y se elevó el número total de perlas en cada tubo a 5 millones con perlas de PMP vacías. Las perlas de PMP vacías se utilizaron para disminuir la pérdida de perlas. (4) En un tubo separado se mezclaron 5 µl de ADN con amplificación de genoma completo (WGA) previamente preparado, 17 µl de tampón Illumina RA1 y se desnaturizó con calor a 95 °C durante 5 minutos. (5) Durante la desnaturización del ADN WGA, se magnetizaron las perlas, se retiró el sobrenadante y se transfirieron 22 µl del ADN WGA desnaturizado en tampón RA1 a gránulos de perlas y se resuspendieron. (6) Se añadieron 2 µl de dúplex de LSP2:índice 5:4,5 µM. El dúplex de LSP2:índice estaba a ~400:360 nM final. (7) Se realizó una hibridación durante la noche a 48 °C con rotación constante o agitación frecuente.

Ligamiento y relleno de huecos: (1) Después de la incubación, se magnetizaron las perlas y se descartó el sobrenadante. (2) Se resuspendieron las perlas en 100 µl de tampón RA1 precalentado a 42 °C. Las perlas se incubaron a 42 °C durante 5 min. (3) Se repitió la etapa de lavado con calentamiento 2 veces más. (4) Se lavó 1 vez con 100 µl de tampón de lavado GBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween20 al 0,1 %). (5) Se magnetizaron las perlas, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 20 µl de mezcla Illumina ELM3. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. (6) Después de la incubación, se magnetizaron las perlas y se descartó el sobrenadante. (7) Se lavó 2 veces con 100 µl de tampón de lavado GBS. (8) Se magnetizaron las perlas, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las perlas en 20 µl de NaOH 0,1 N. Las perlas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. (9) Se magnetizaron las perlas, se eliminó el sobrenadante y se lavaron 3 veces con 100 µl de tampón de lavado GBS.

Normalización de ExAMP: (1) Los reactivos de ExAMP se prepararon de la siguiente manera (para 8 muestras): Se mezclaron 140 µl de EPX1, 20 µl de EPX2, 74 µl de EPX3, cebador 'AAGGGT' en solución final 200 nM (Id de sec. n.º: 06). (2) Se magnetizaron las perlas, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las perlas en 5 µl de RSB y se añadieron 20 µl de mezcla de cebadores en solución/EPX a las perlas. Se continuó con el protocolo ExAMP de una sola etapa o de dos etapas.

ExAMP de una sola etapa: (1) Se incubaron las perlas a 38 °C durante 15 min. Después de 15 minutos, se añadieron cebadores adaptadores finales 'P5-GGA' (Id de sec. n.º: 07) 350 nM y 'AAGGGT-P7' 350 nM (Id de sec. n.º: 08). (2) Se incubaron las perlas durante 45 minutos más a 38 °C con rotación.

ExAMP de dos etapas: (1) Se incubaron las perlas a 38 °C durante 1 hora. (2) Después de la incubación, se prepararon nuevos reactivos de ExAMP de la siguiente manera (para 8 muestras): Se mezclaron 140 µl de EPX1, 20 µl de EPX2, 74 µl de EPX3, cebador 'P5-GGA' 500 nM (Id de sec. n.º: 07) y cebador 'AAGGGT-P7' 500 nM (Id de sec. n.º: 08). (3) Se magnetizaron las perlas, se eliminó el sobrenadante y se lavaron 1 vez con de tampón de lavado GBS. (4) Las

perlas se resuspendieron con 5 µl de RSB y 20 µl de nueva mezcla de cebadores/ExAMP. (5) Se incubaron las perlas durante 1 hora más a 38 °C con rotación.

Secuenciación: (1) Después de la incubación, las muestras se limpiaron con una columna Zymo de 5 µg, se cuantificaron con Qubit y se agruparon para la secuenciación. (2) La secuenciación se realizó con una única lectura y un único ciclo de índice de la siguiente manera: Lectura 1: 76 pb con cebador de lectura 1 'P5-GGA' (Id de sec. n.º: 07). Índice 1: 8 pb con el cebador de Índice 1 de CS' (Id de sec. n.º: 09). La TABLA 2 enumera secuencias de determinados cebadores.

Tabla 2

Id de sec. n.º	Cebador	Secuencia
Id. de sec. n.º: 05	Amplificación por GGA	AAAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAA
Id. de sec. n.º: 06	Cebador 'AAGGGGT'	GGGAAGAAGTAAGAAGAATGAAGTAAGAAG ATAGAAA
Id. de sec. n.º: 07	P5-GGA	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGG AGGAGGAGGAGGAGGAGGAAAA
Id. de sec. n.º: 08	AAGGGGT-P7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGGAAG AAGTAAGAAGAATGAAGTAAGAAGATAGAA A
Id. de sec. n.º: 09	Cebador de índice 1 de CS'	CTCCACACTACCTCAACCATCACT

Ejemplo 5: Amplificación de ácidos nucleicos acelerada y eficiente

En este ejemplo, se realizó una reacción de amplificación del genoma completo para determinar si la acumulación de PPi tenía un efecto adverso sobre la cinética de la reacción e inhibía la polimerización. El rendimiento de ADN durante la amplificación se midió con un kit de cuantificación de ADNbc PicoGreen (Molecular Probes). El rendimiento de ADN alcanzó 80 µg después de 3 horas a 37 °C y permaneció sustancialmente constante hasta 24 horas. El aumento de la cantidad de dNTP no aumentó la velocidad de la reacción.

Se acumuló un precipitado insoluble en los tubos de reacción durante la amplificación del ADN. Se planteó la hipótesis de que el material insoluble era un precipitado de PPi. El precipitado se trató con 0,1 a 1 unidad de pirofosfatasa inorgánica (iPPasa) (New England Biolabs, M0361L) después de la amplificación del ADN. Sin embargo, los intentos de hidrolizar el precipitado no tuvieron éxito. La actividad iPPasa puede haber sido suprimida por el sustrato de PPi insoluble y/o la iPPasa puede carecer de actividad con un complejo de pirofosfato de magnesio en comparación con un sustrato de PPi sin complejo. Se planteó la hipótesis de que la acumulación de un complejo PPi de magnesio podría inhibir la cinética de la reacción a través de los dos mecanismos siguientes: (1) iones PPi que impulsan la reacción en la dirección de la pirofosforólisis; y (2) agotamiento de iones Mg²⁺ debido a la formación de las especies de pirofosfato de magnesio.

Para disminuir la generación de PPi, minimizar la pirofosforólisis y la formación de complejos de PPi de magnesio, se añadió iPPasa a reacciones isotérmicas de amplificación del genoma completo de modo que la iPPasa hidrolizara el PPi a medida que se generaba en tiempo real. Las reacciones de amplificación del genoma completo se incubaron de 0,5 a 3 horas en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) con 200 ng de ADN de entrada. La FIG. 22 es un gráfico del rendimiento total de ADN para reacciones de amplificación realizadas en presencia o ausencia de IPP y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Para las reacciones que no contenían iPPasa, se observó un rendimiento de 80 µg de ADN después de 3 horas y se mantuvo sustancialmente constante con el tiempo. Para las reacciones que contenían iPPasa, se logró un rendimiento de 80 µg de ADN después de 1 hora y se mantuvo sustancialmente constante con el tiempo. Estas observaciones fueron coherentes con la generación de PPi durante la amplificación de todo el genoma, lo que provocó efectos adversos, incluidos niveles elevados de pirofosforólisis y formación de complejos de PPi de magnesio.

Las reacciones de amplificación se repitieron con 100 ng de ADN. El ADN se procesó con un flujo de trabajo Infinium EX para medir el rendimiento del genotipado funcional con un contenido de 60 K SNP por pocillo de muestra. Se midieron las intensidades de los colorantes Xraw e Yraw que se originan a partir de colorantes espectralmente únicos después de la tinción (FIG. 23). La FIG. 23 representa un gráfico de intensidad de fluorescencia para reacciones de amplificación realizadas con un beadchip Infinium EX de 60 K y en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Como se muestra en la FIG. 23, los valores de intensidad de Xraw e Yraw con formulaciones que contenían iPPasa fueron mayores en tiempos de amplificación más cortos (30 min y 1 h) e iguales a 2 h y 3 h. En la FIG. 24 se representan las tasas de éxito para reacciones de amplificación realizadas en presencia o ausencia de iPPasa (IPP) y muestreadas en tiempos de incubación de 0,5 horas, 1 hora, 2 horas y 3 horas. Como se muestra en la FIG. 24, las tasas de éxito, una métrica clave del genotipo, fueron más altas para las formulaciones que contenían iPPasa a los 30 minutos y 1 h de

amplificación del ADN. Las tasas de acierto superaron el límite de especificación inferior ($LSL = 0,995$) al cabo de 1 h; mientras que la formulación sin iPPasa requirió un mínimo de 2 h de tiempo de amplificación. Por lo tanto, la presencia de iPPasa en las reacciones de amplificación aumentó sustancialmente la eficiencia de la reacción.

- 5 El término “comprende” tal como se utiliza en la presente memoria, es sinónimo de “incluye”, “contiene” o “caracterizado por” y es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de método adicionales no enumerados.

- 10 La descripción anterior describe varios métodos y materiales de la presente invención. Esta invención puede someterse a modificaciones en los métodos y materiales, así como a alteraciones en los métodos y equipos de fabricación. Tales modificaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la presente descripción o la práctica de la invención descrita en la presente memoria. En consecuencia, no se pretende que esta invención se limite a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria.

- 15 En la medida en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente citadas contradigan la descripción contenida en la memoria descriptiva, se pretende que esta reemplace y/o tenga prioridad sobre cualquier material contradictorio de ese tipo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para normalizar una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende ácidos nucleicos diana, que comprende:
 - (a) obtener un sustrato que tiene una cantidad normalizadora de sondas de captura unidas al mismo, en donde las sondas de captura comprenden primeros sitios de amplificación;
 - (b) hibridar una pluralidad de ácidos nucleicos diana con las sondas de captura;
 - (c) extender las sondas de captura para obtener sondas extendidas, en donde las sondas extendidas comprenden segundos sitios de amplificación; y
 - (d) amplificar las sondas extendidas hibridando cebadores de extensión con los segundos sitios de amplificación, en donde la cantidad de cebadores de extensión es igual o mayor que la cantidad normalizadora de sondas de captura, en donde la amplificación se realiza de manera que sustancialmente todas las sondas de captura se extiendan, obteniendo de este modo una cantidad normalizadora de ácidos nucleicos diana amplificados;
 en donde los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión son incapaces o son esencialmente incapaces de hibridar entre sí; y en donde:
 - (i) cada uno de los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión carecen del mismo tipo de nucleótido, o
 - (ii) los primeros sitios de amplificación carecen de tipos de nucleótidos complementarios entre sí y cada cebador de extensión consiste esencialmente en los mismos tipos de nucleótidos que el primer sitio de amplificación, o
 - (iii) los primeros sitios de amplificación carecen de al menos un tipo de nucleótido seleccionado entre adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) y, opcionalmente, en donde los primeros sitios de amplificación carecen de una combinación de nucleótidos seleccionada entre: adenina (A) y timina (T); o guanina (G) y citosina (C).
2. El método de la reivindicación 1, en donde los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión no son complementarios entre sí.
3. El método de la reivindicación 1, en donde los primeros sitios de amplificación y los cebadores de extensión comprenden secuencias de nucleótidos no complementarias entre sí.
4. El método de la reivindicación 1, en donde los primeros sitios de amplificación comprenden nucleótidos modificados que inhiben la hibridación con los cebadores de extensión.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los cebadores de extensión están en solución.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde las sondas de captura comprenden primeros índices o primeros sitios de cebadores de secuenciación.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las sondas de captura comprenden primeros cebadores específicos de locus; opcionalmente, en donde la pluralidad de ácidos nucleicos diana hibridan con los primeros cebadores específicos de locus; opcionalmente, en donde la pluralidad de ácidos nucleicos diana hibridan con los primeros cebadores específicos de locus; y, opcionalmente, en donde extender las sondas de captura comprende ligar los primeros cebadores específicos de locus con los segundos cebadores específicos de locus.
8. El método de la reivindicación 7, en donde extender las sondas de captura comprende:
 - (i) hibridar segundos cebadores específicos de locus con los ácidos nucleicos diana; y
 - (ii) ligar los primeros cebadores específicos de locus con los segundos cebadores específicos de locus.
9. El método de la reivindicación 8, en donde los segundos cebadores específicos de locus comprenden los segundos sitios de amplificación; opcionalmente, en donde los segundos cebadores específicos de locus comprenden segundos índices o segundos sitios cebadores de secuenciación.
10. El método de la reivindicación 8, que comprende además:
 - (iii) hibridar oligonucleótidos de extensión con los segundos cebadores específicos de locus; y
 - (iv) extender los segundos cebadores específicos de locus con secuencias complementarias de los oligonucleótidos de extensión mediante extensión por polimerasa; y, opcionalmente,

en donde los oligonucleótidos de extensión comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación, complementarios de los segundos índices o complementarios de los segundos sitios cebadores de secuenciación.

- | | | |
|----|-----|--|
| 5 | 11. | El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde los ácidos nucleicos diana comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación y la extensión comprende extensión por polimerasa de los primeros cebadores específicos de locus con secuencias complementarias de los ácidos nucleicos diana; opcionalmente, que comprende además preparar los ácidos nucleicos diana añadiendo adaptadores a un extremo de los ácidos nucleicos diana, en donde los adaptadores comprenden sitios complementarios de los segundos sitios de amplificación; opcionalmente, en donde la adición de adaptadores comprende una reacción de tagmentación. |
| 10 | | |
| | 12. | El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sustrato comprende una pluralidad de perlas. |
| 15 | 13. | El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sustrato una celda de flujo. |
| | 14. | El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la amplificación se realiza en condiciones tales que la cantidad normalizadora de sondas de captura limite la cantidad de productos de amplificación. |
| 20 | 15. | El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende además secuenciar los ácidos nucleicos diana amplificados. |

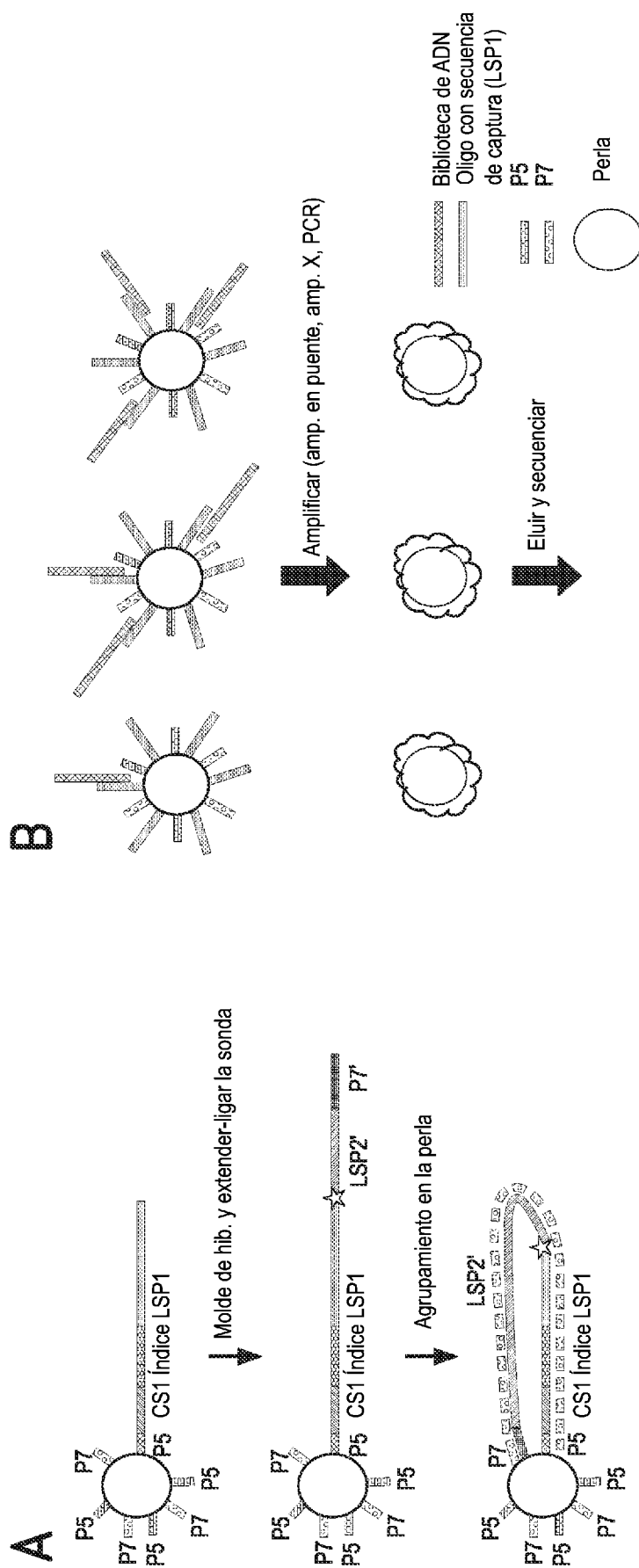


FIGURA 1

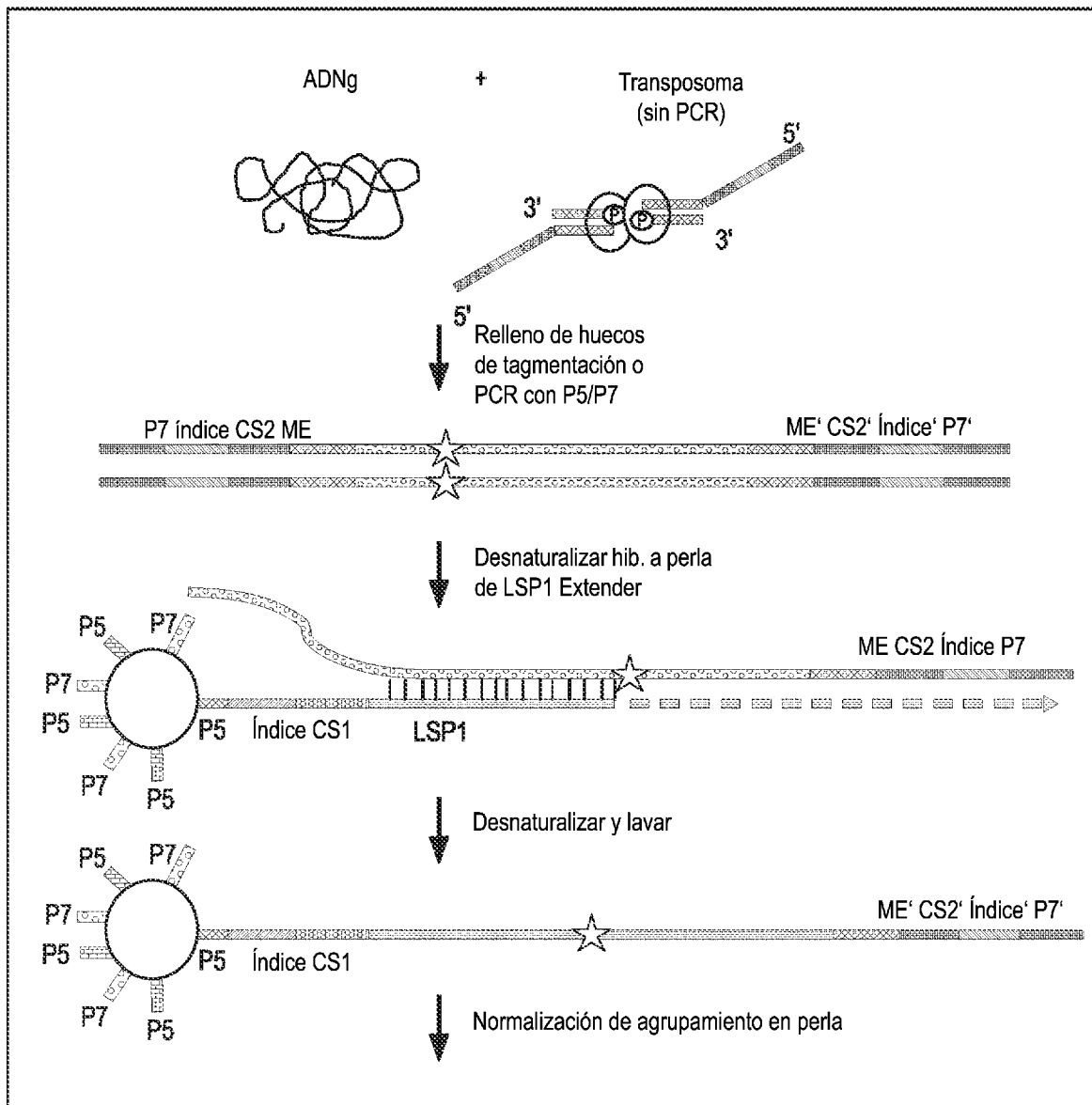


FIGURA 2

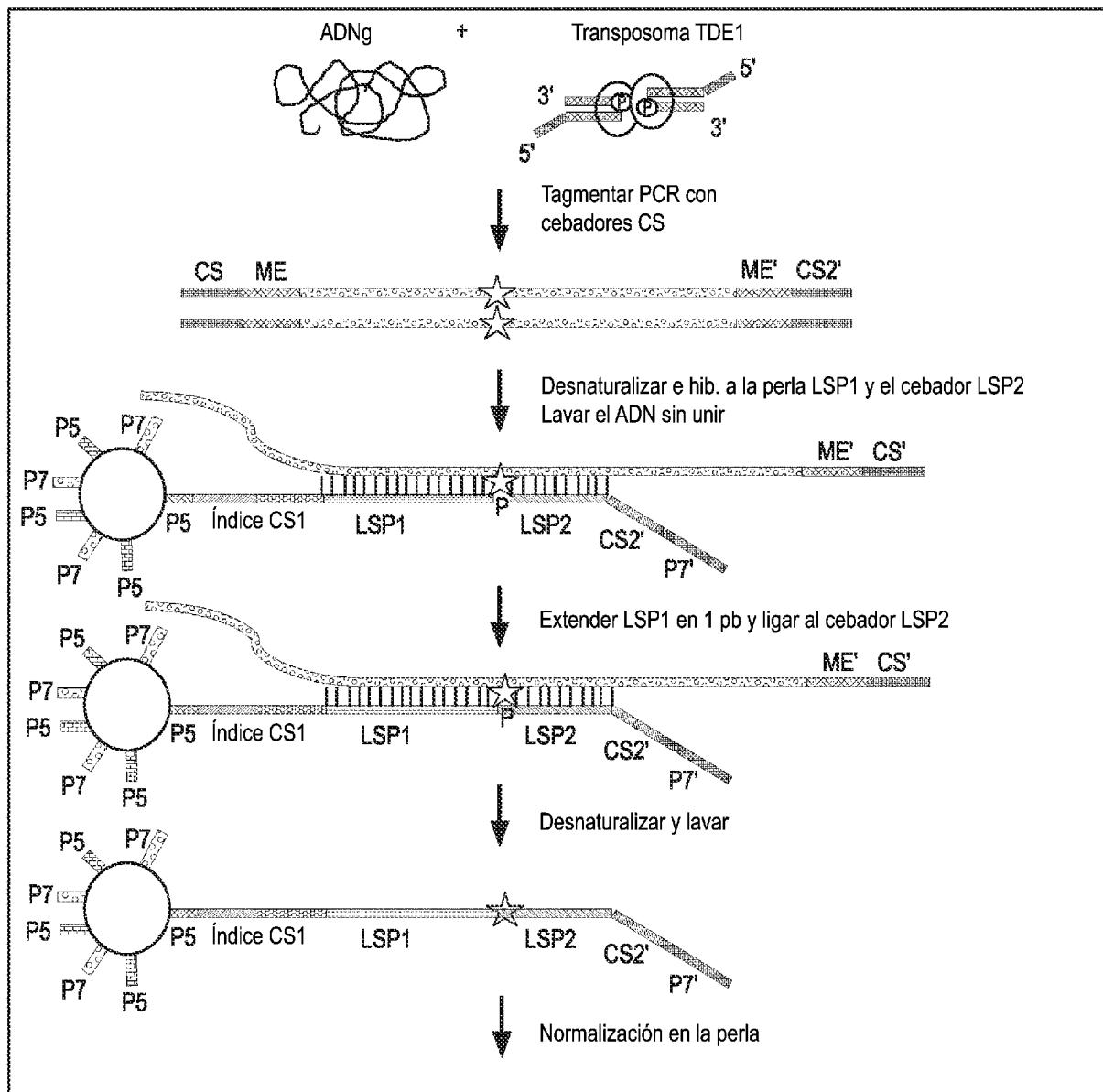


FIGURA 3

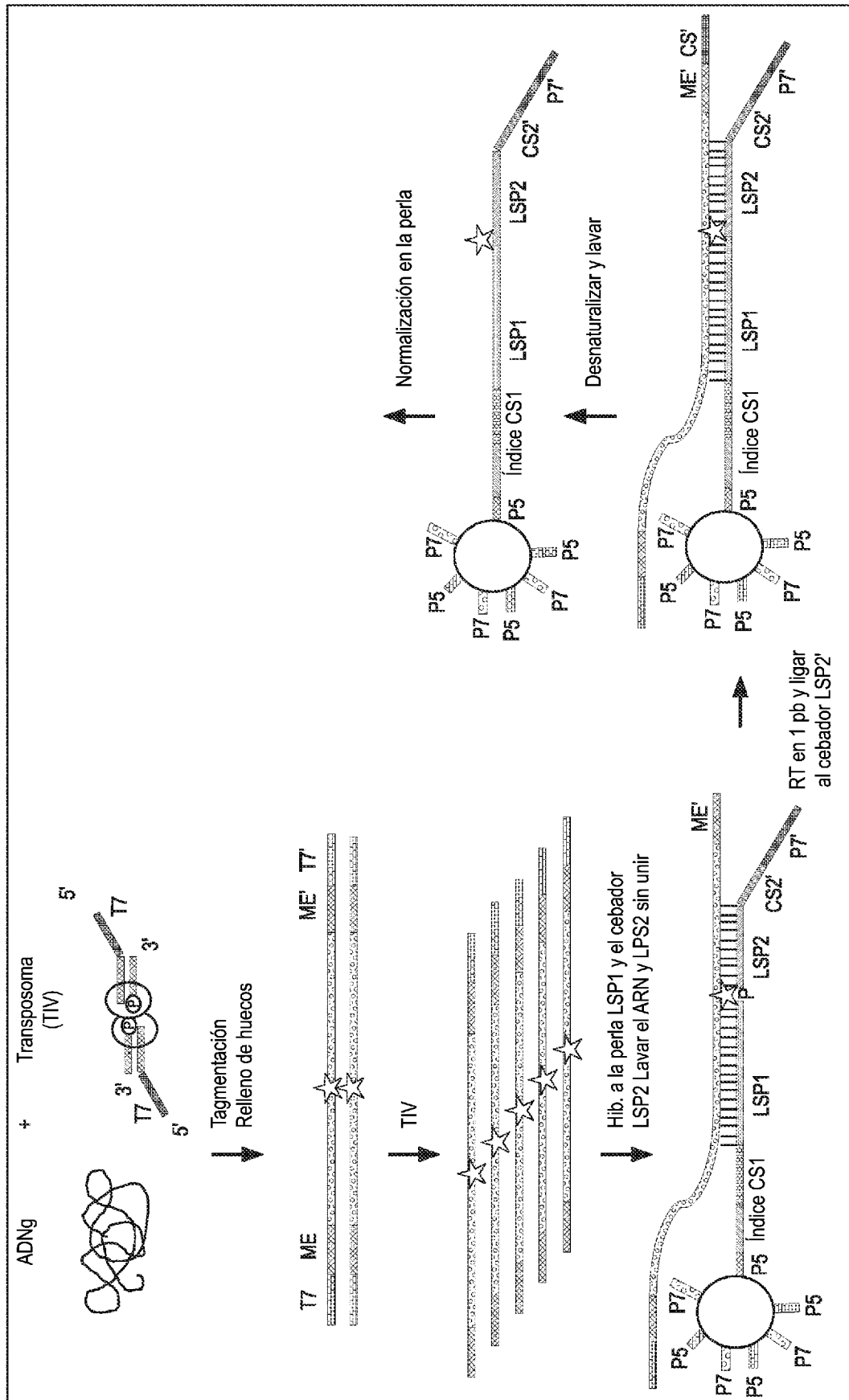


FIGURA 4A

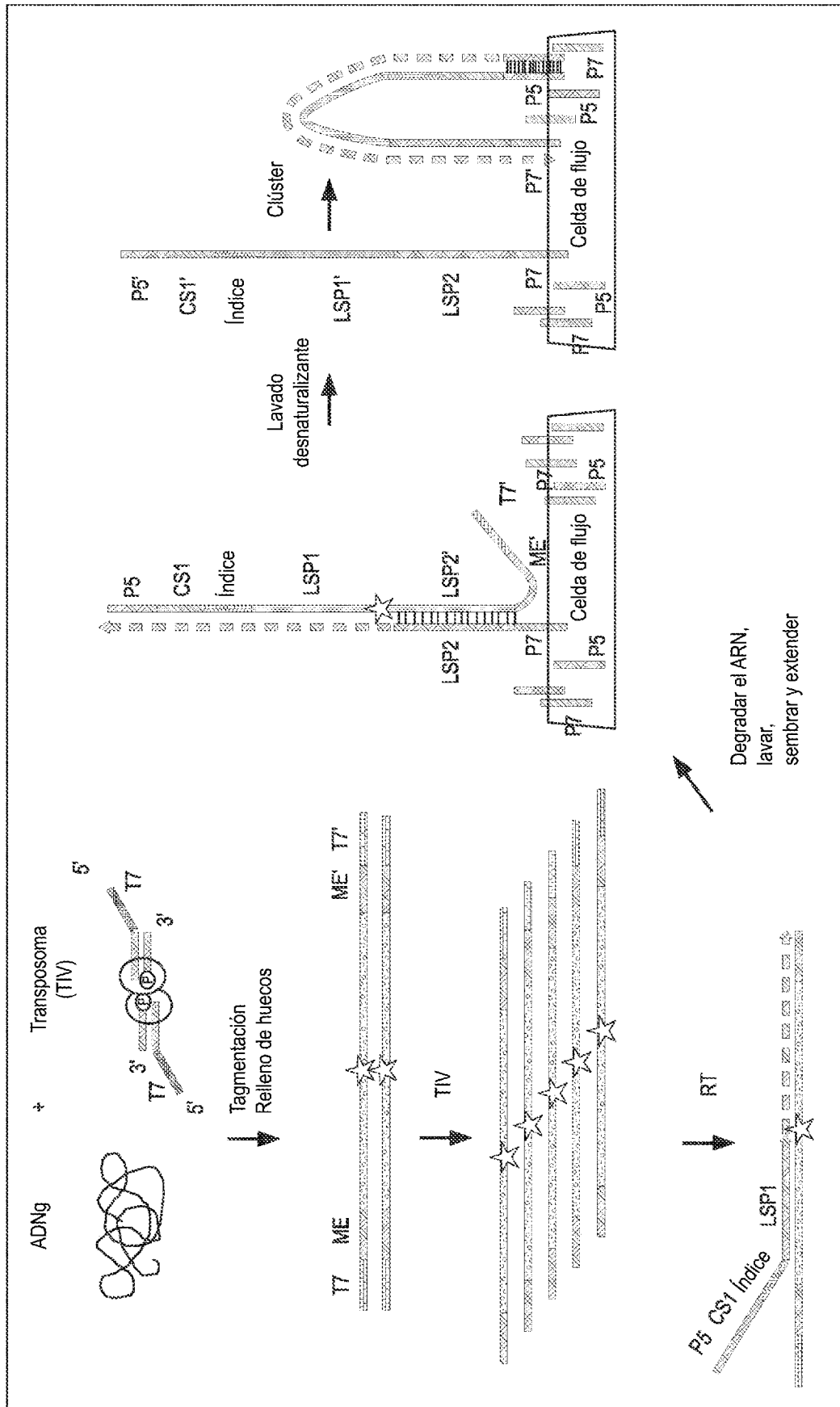


FIGURA 4B

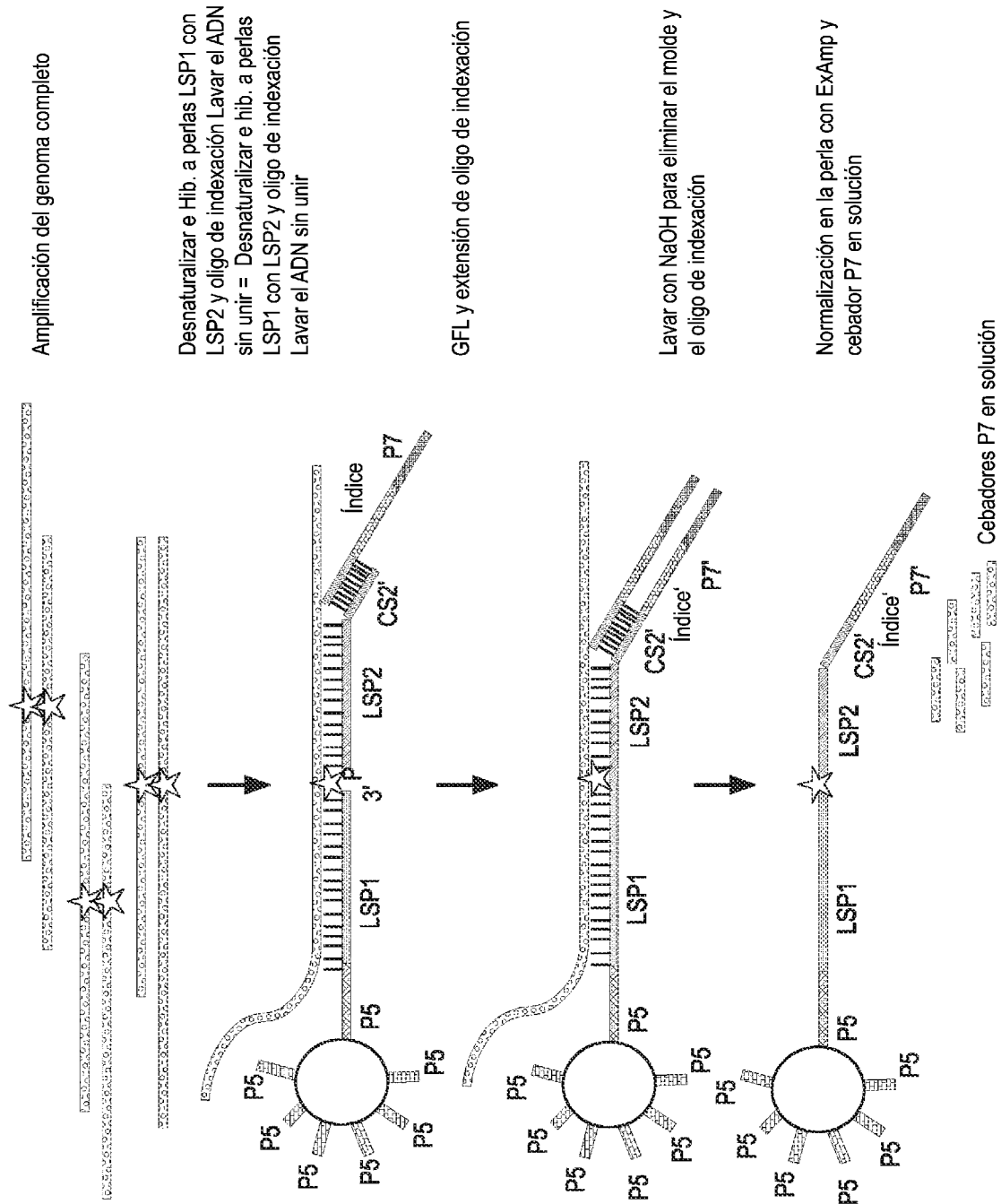


FIGURA 5

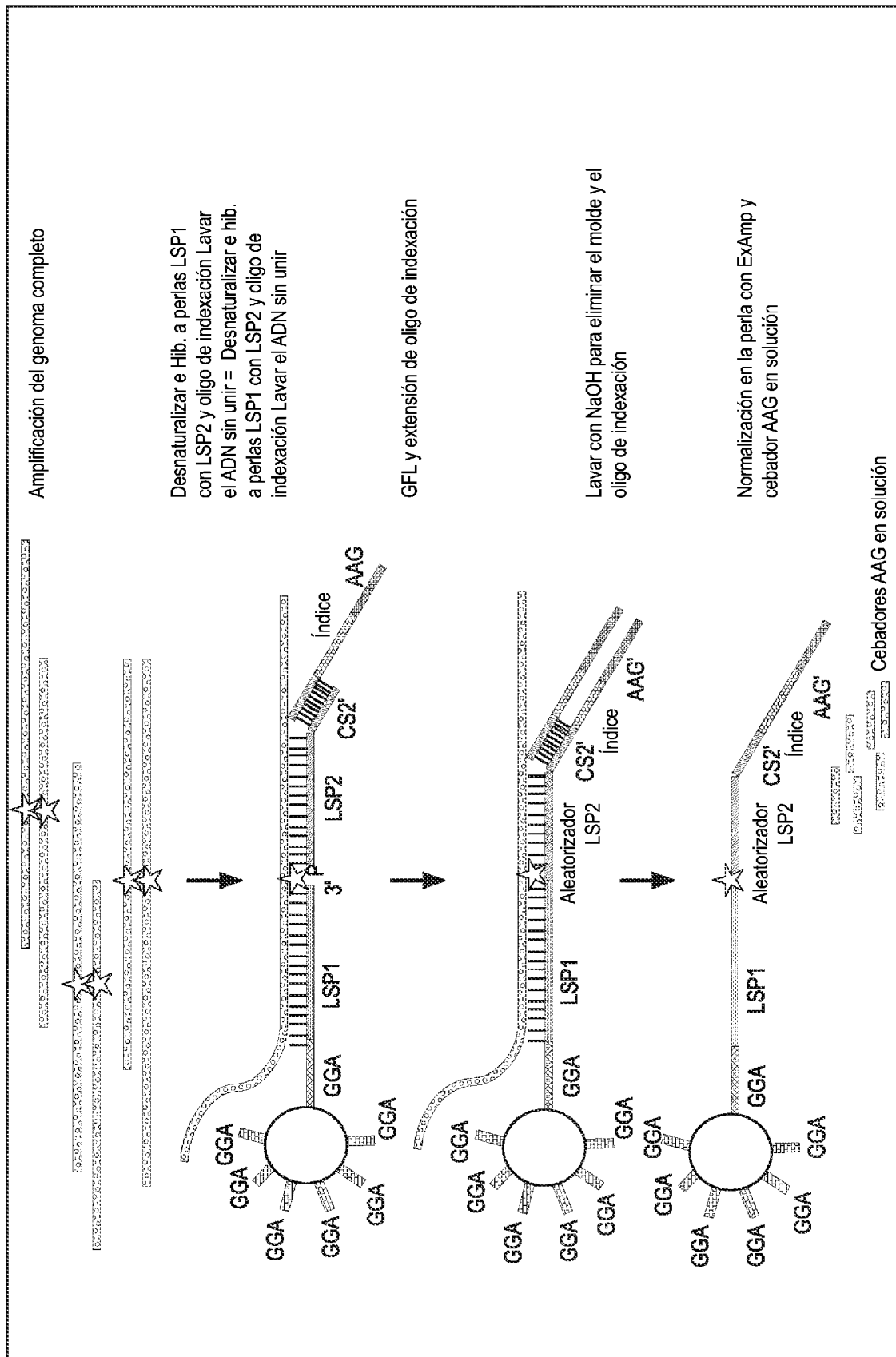


FIGURA 6

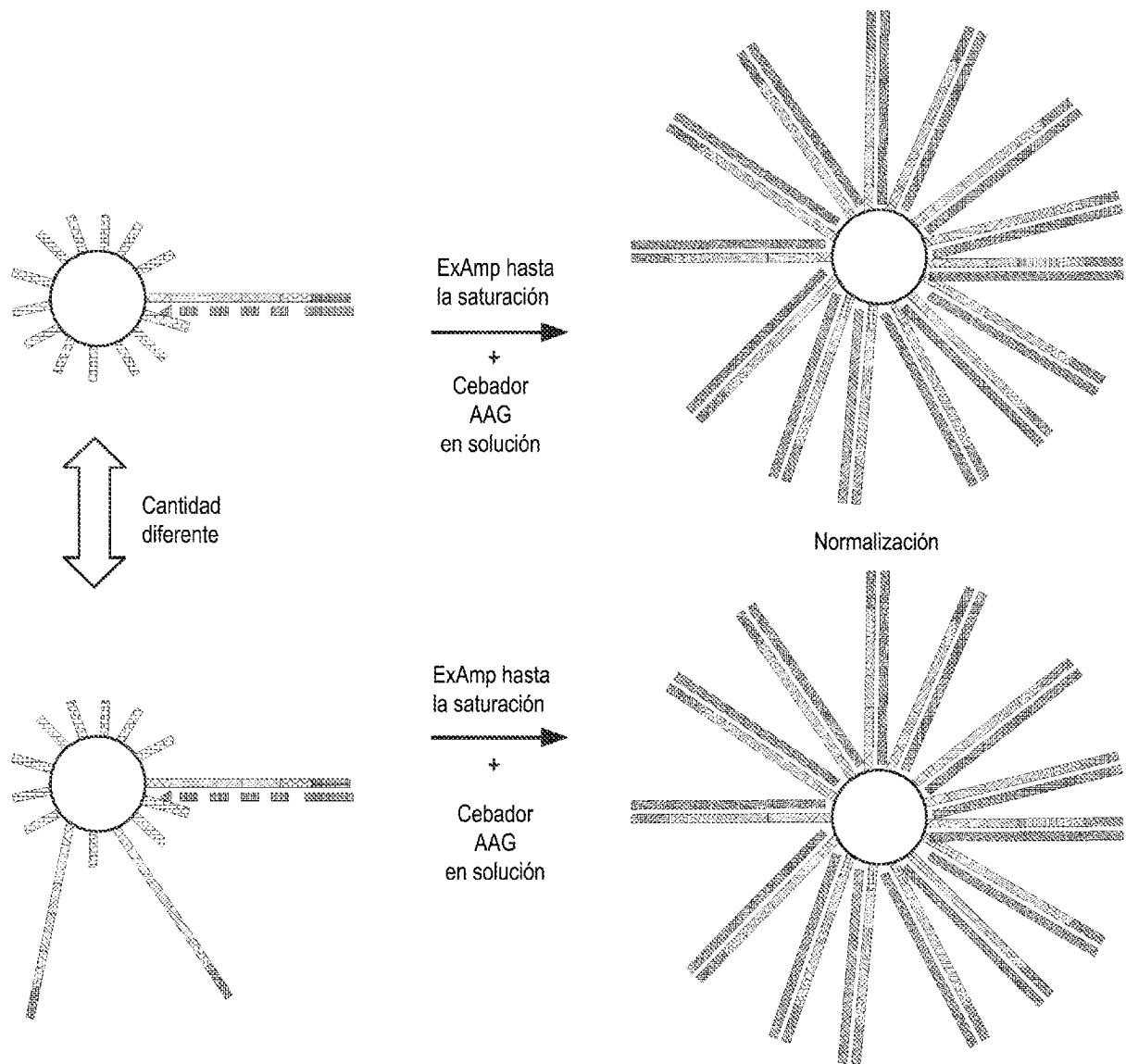


FIGURA 7

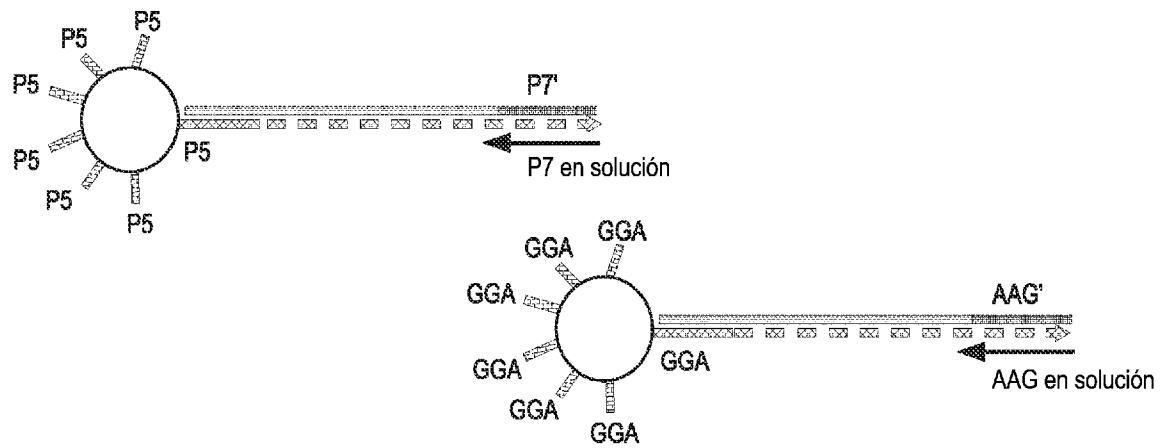


FIGURA 8

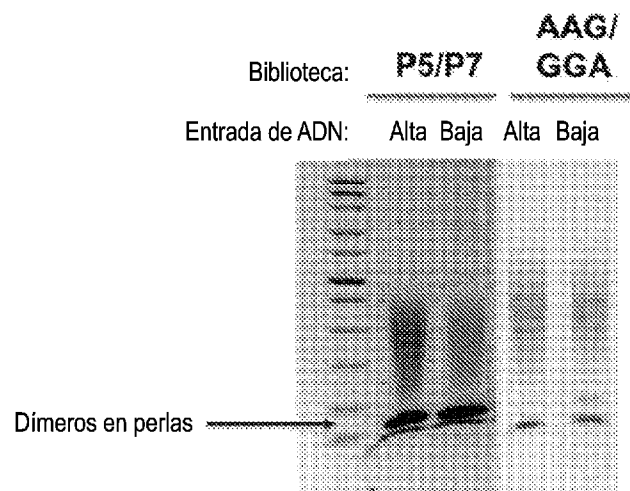


FIGURA 9

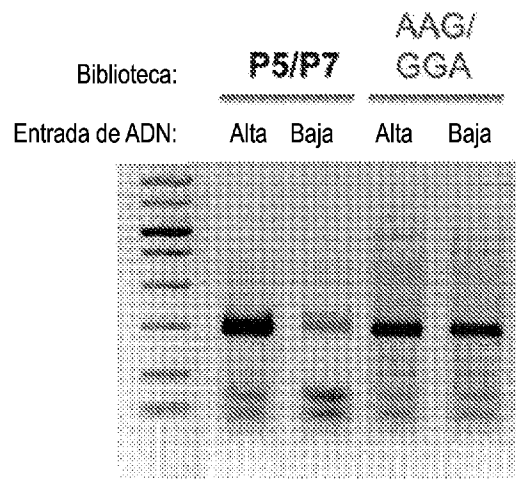


FIGURA 10

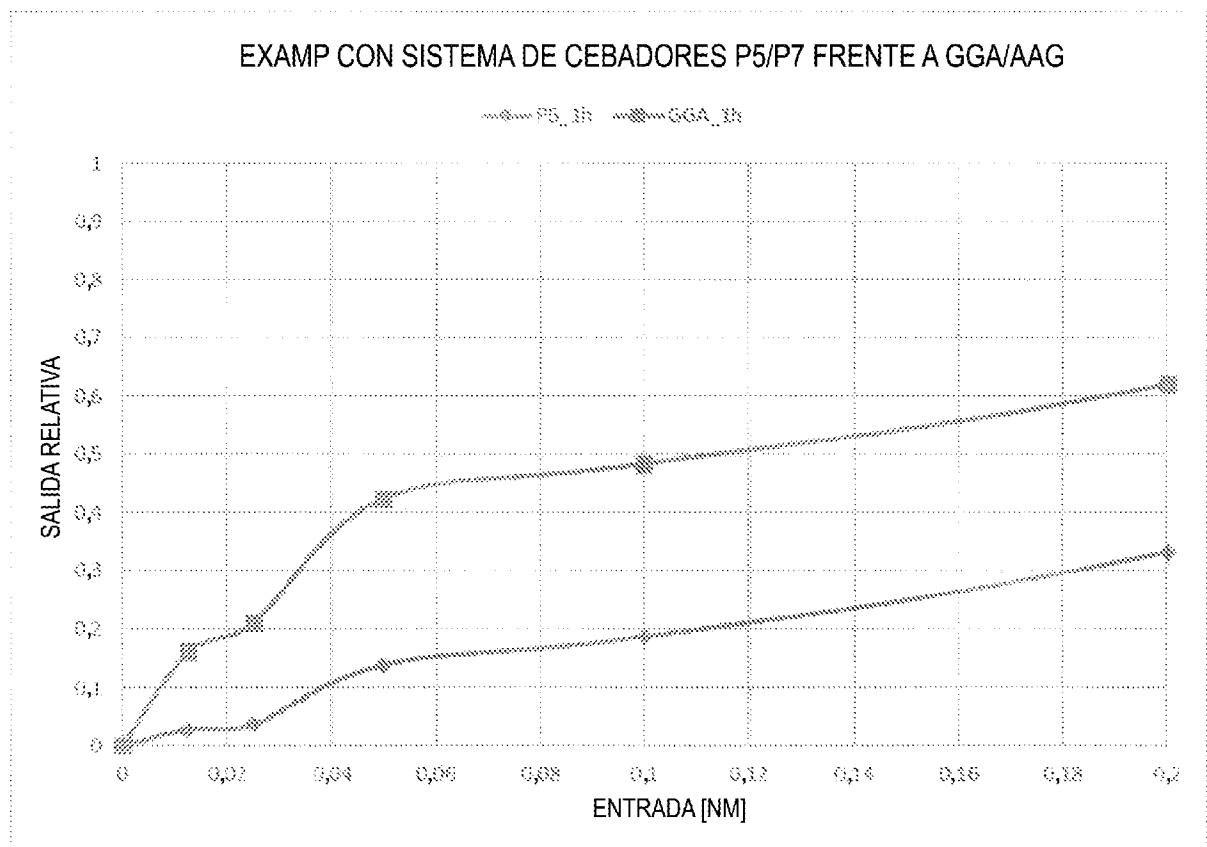


FIGURA 11

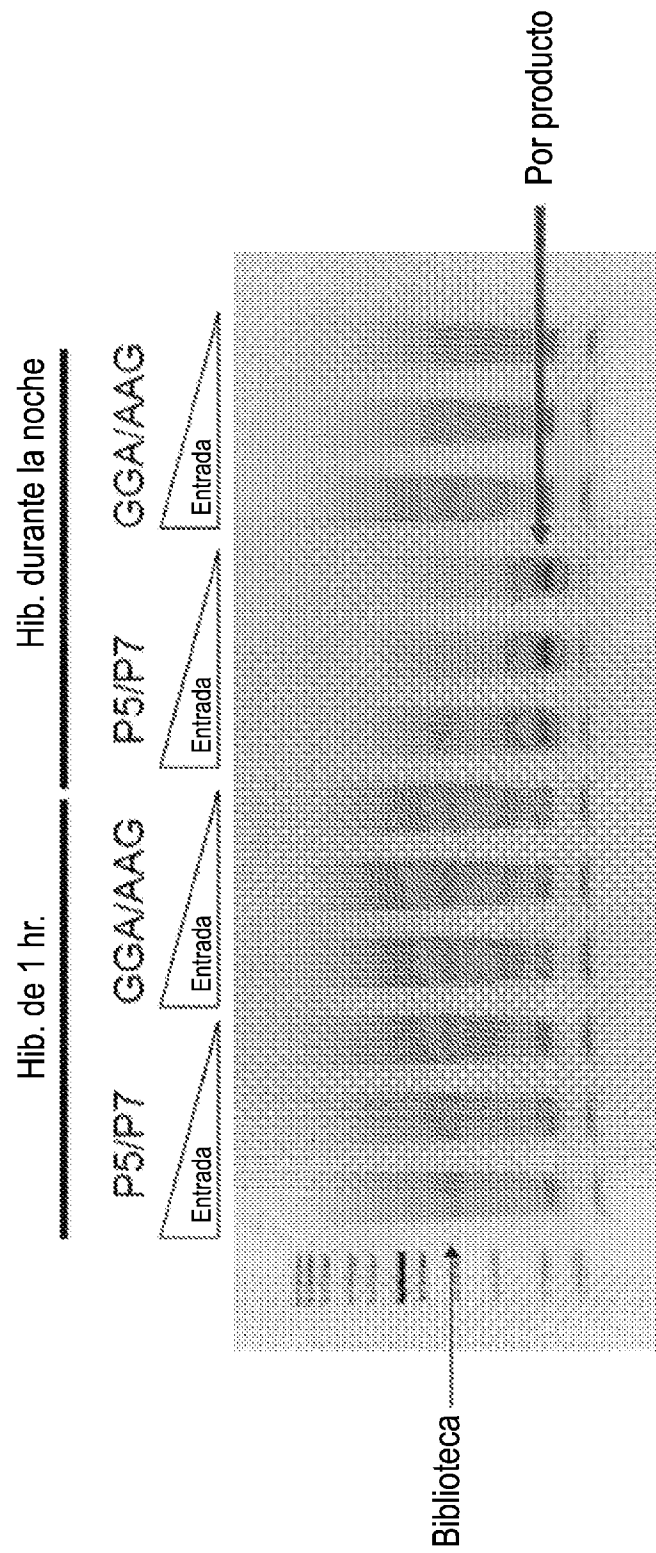


FIGURA 12

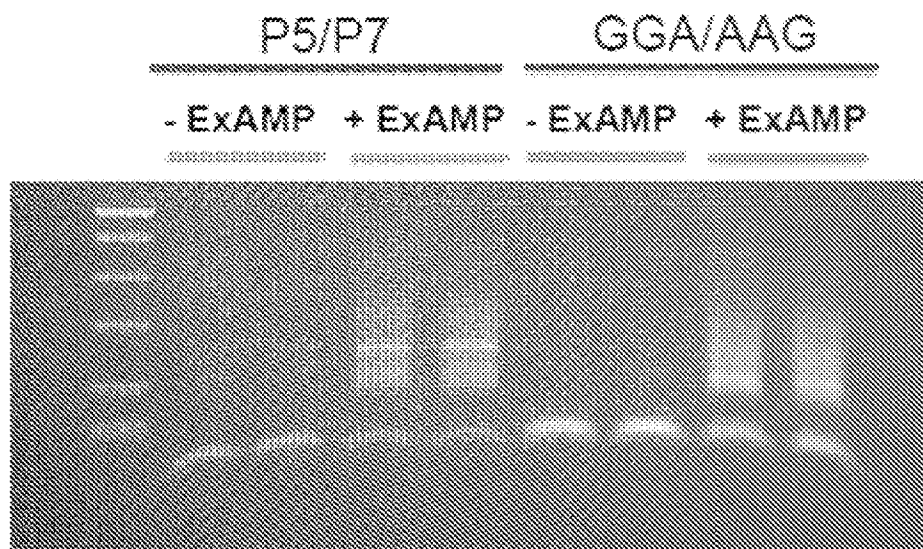


FIGURA 13

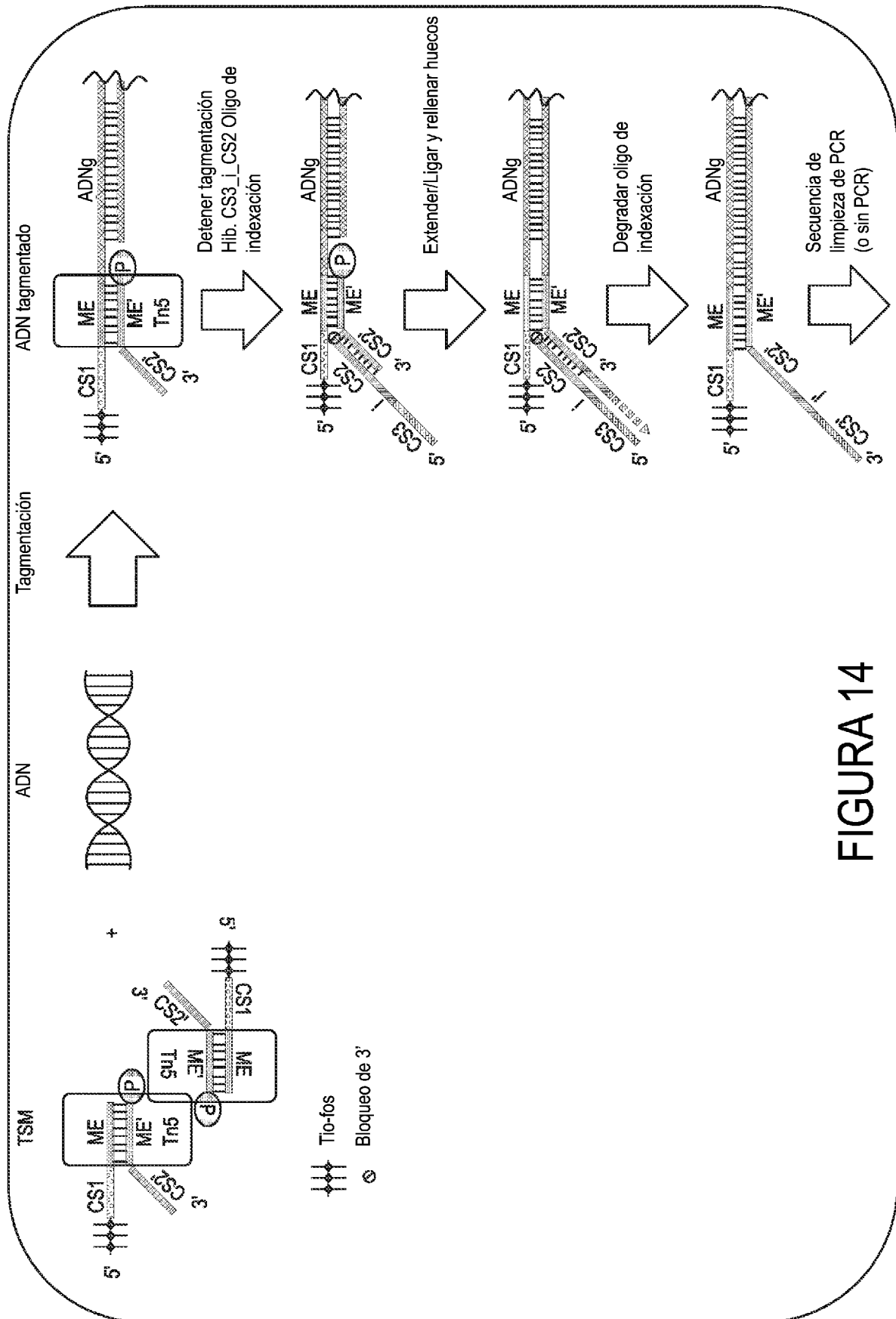


FIGURA 14

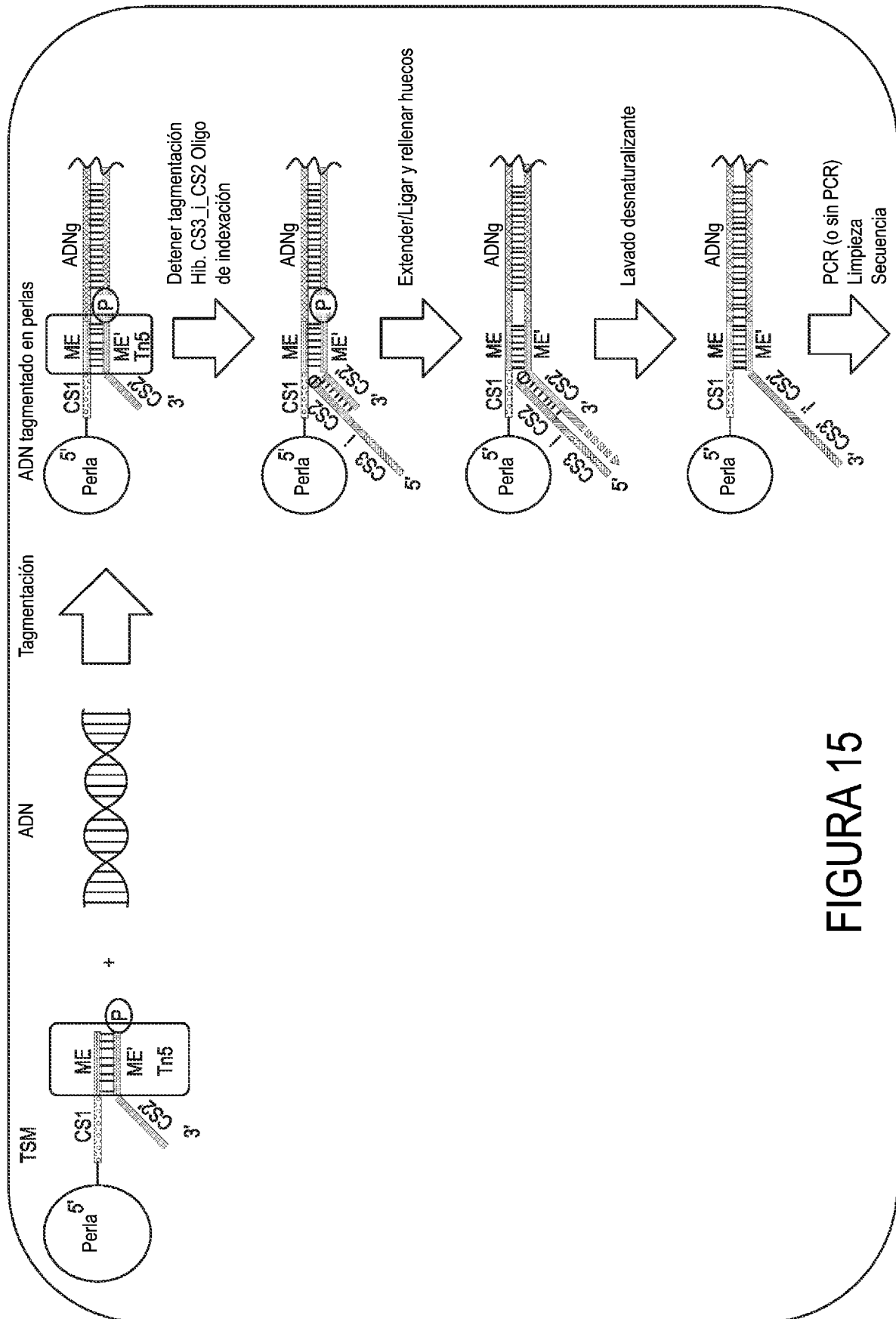
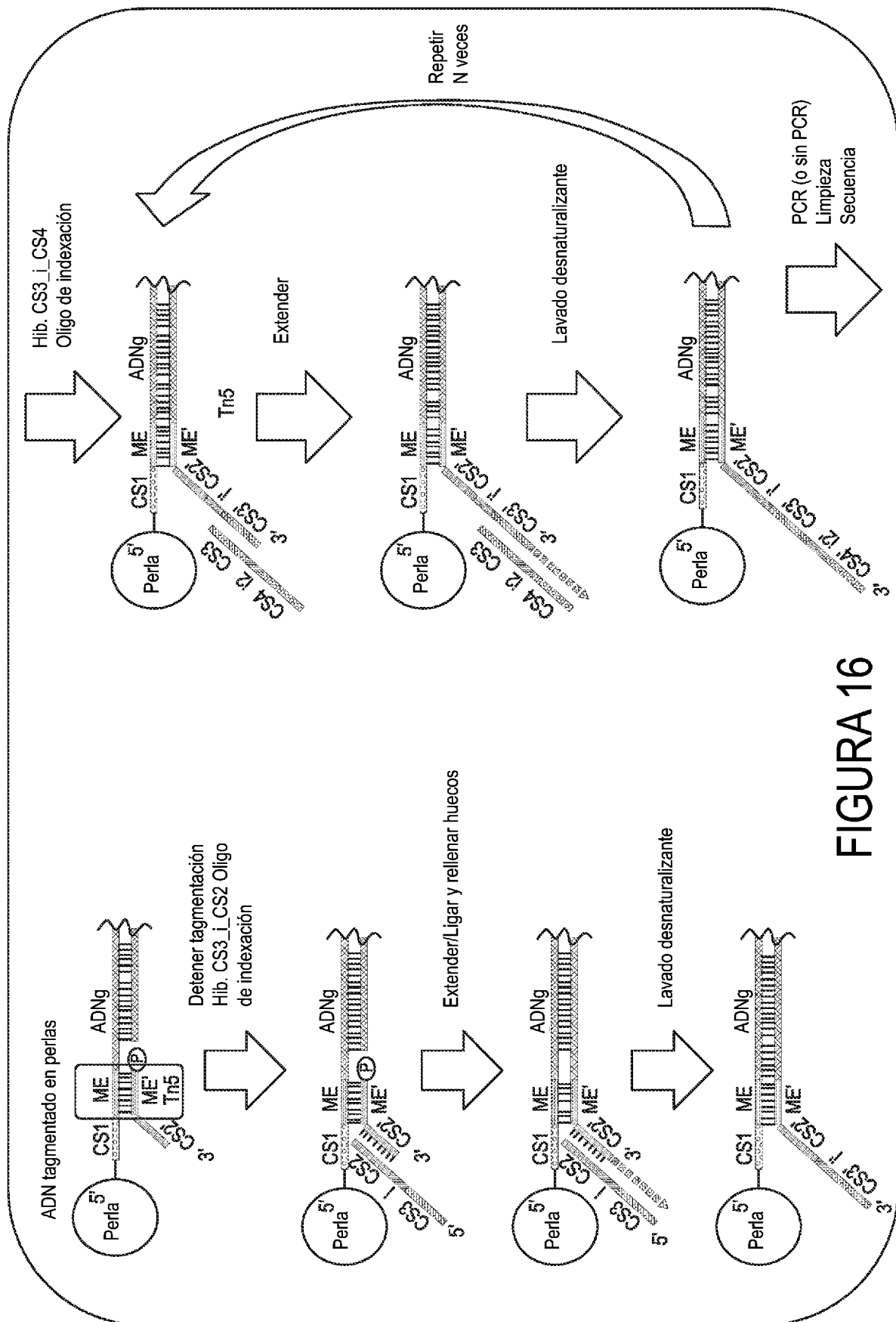


FIGURA 15



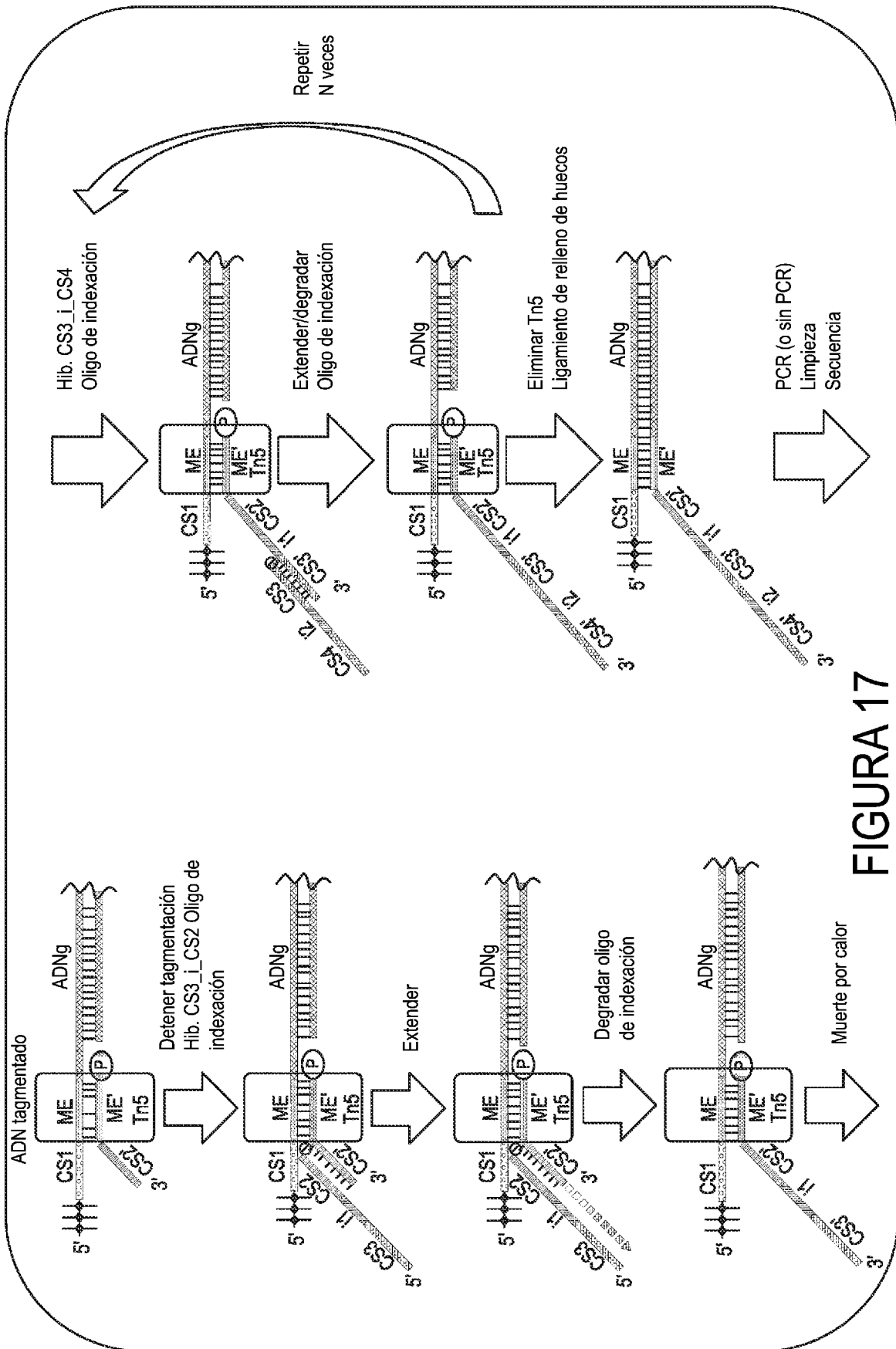


FIGURA 17

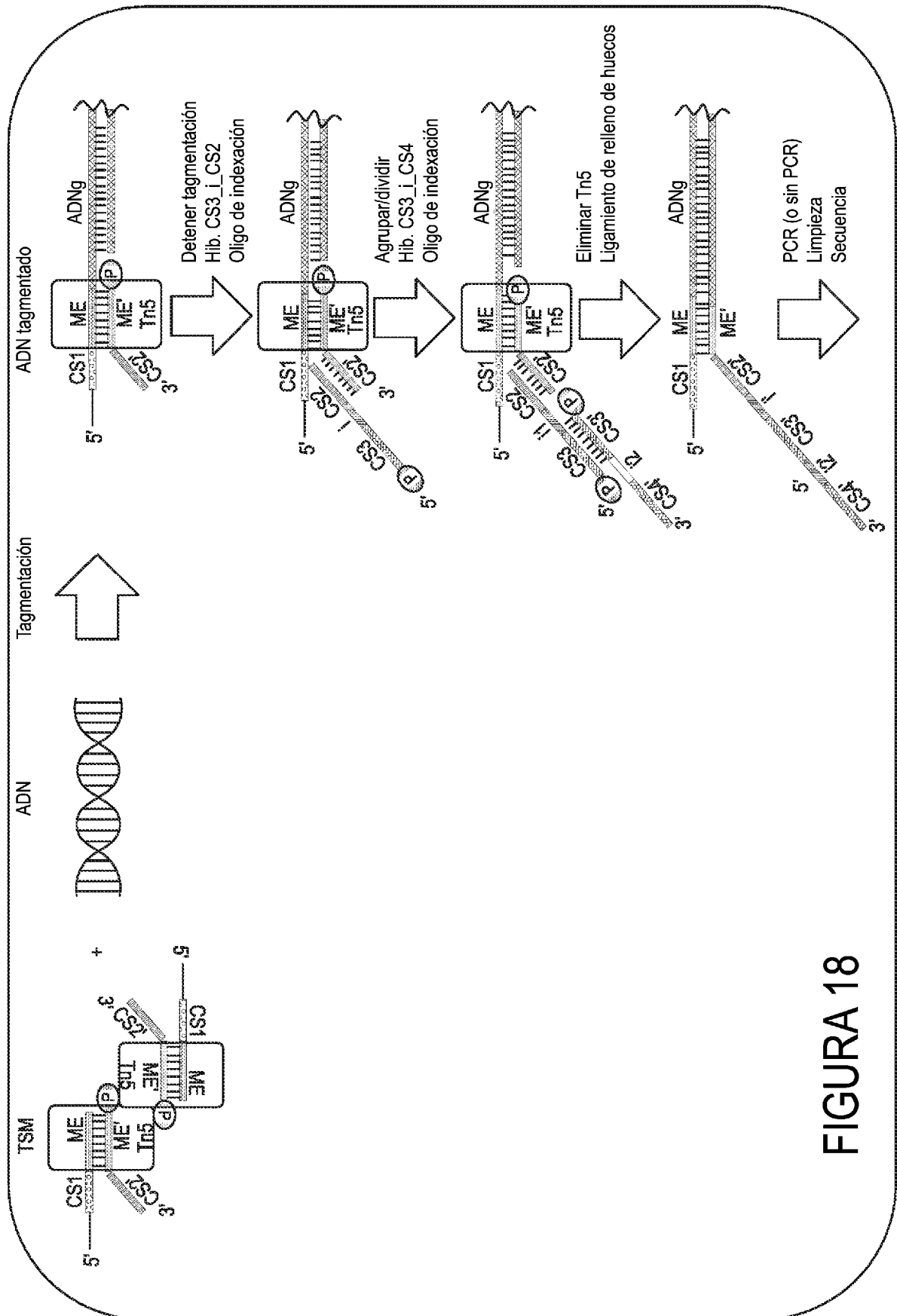


FIGURA 18

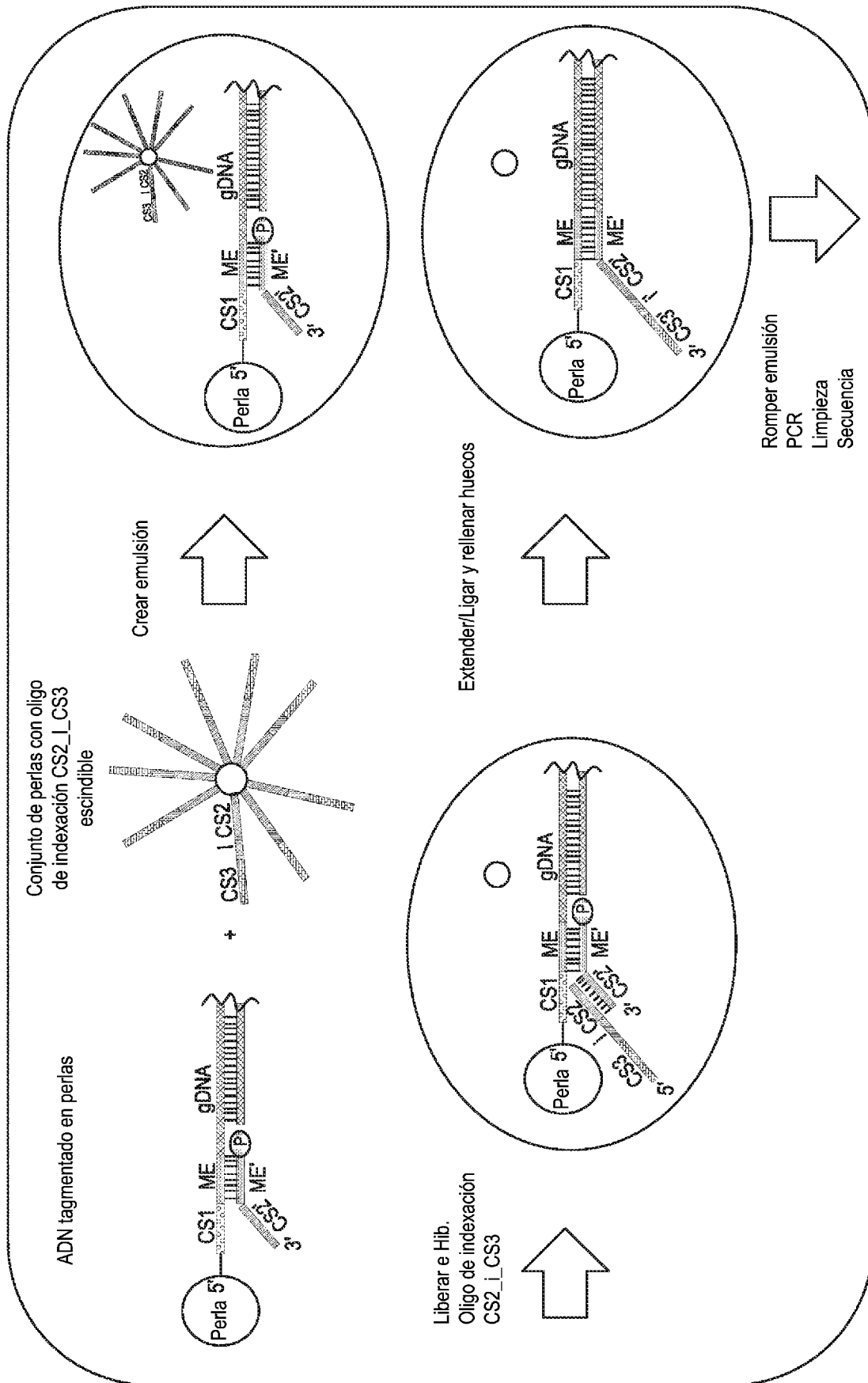


FIGURA 19

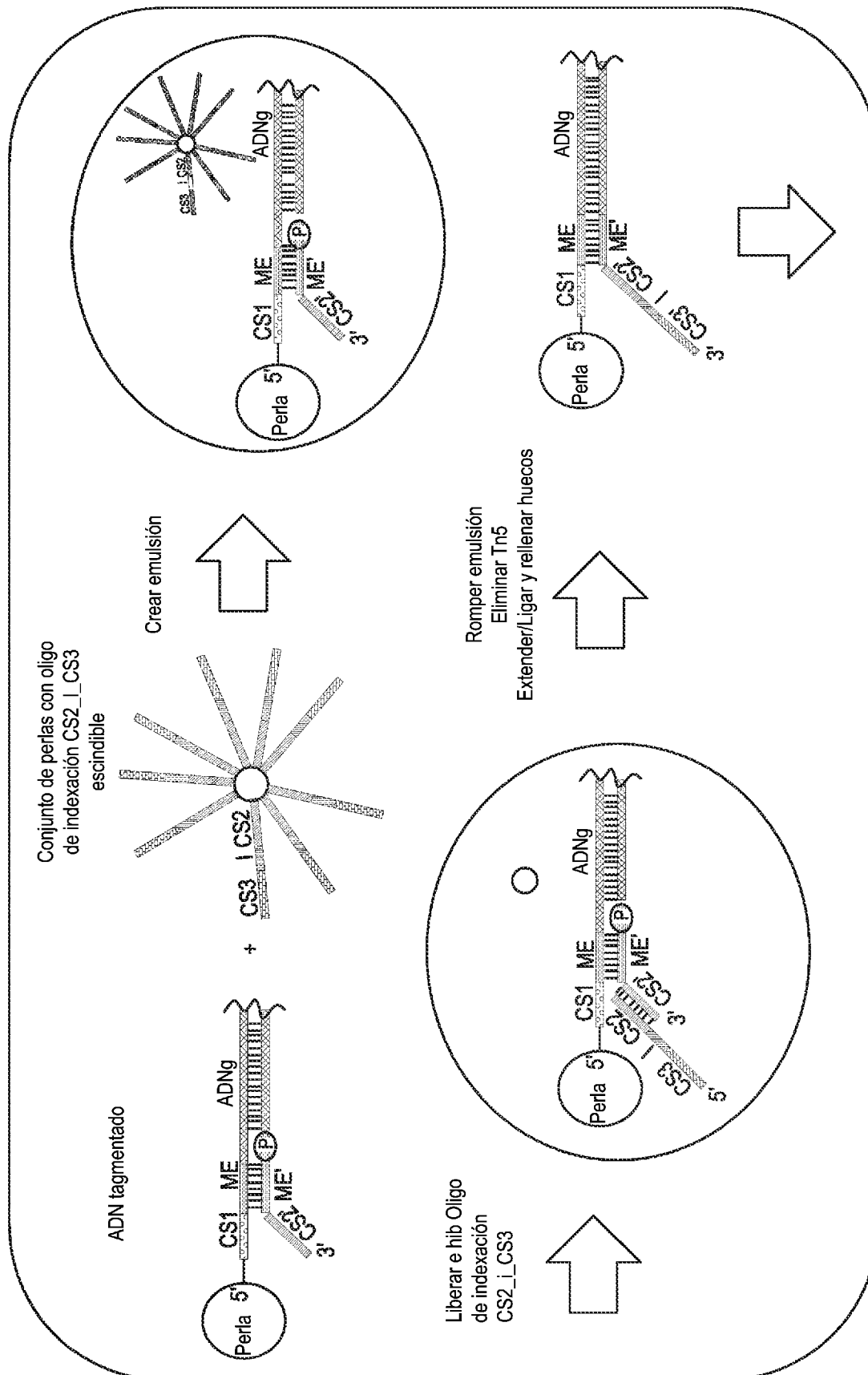


FIGURA 20

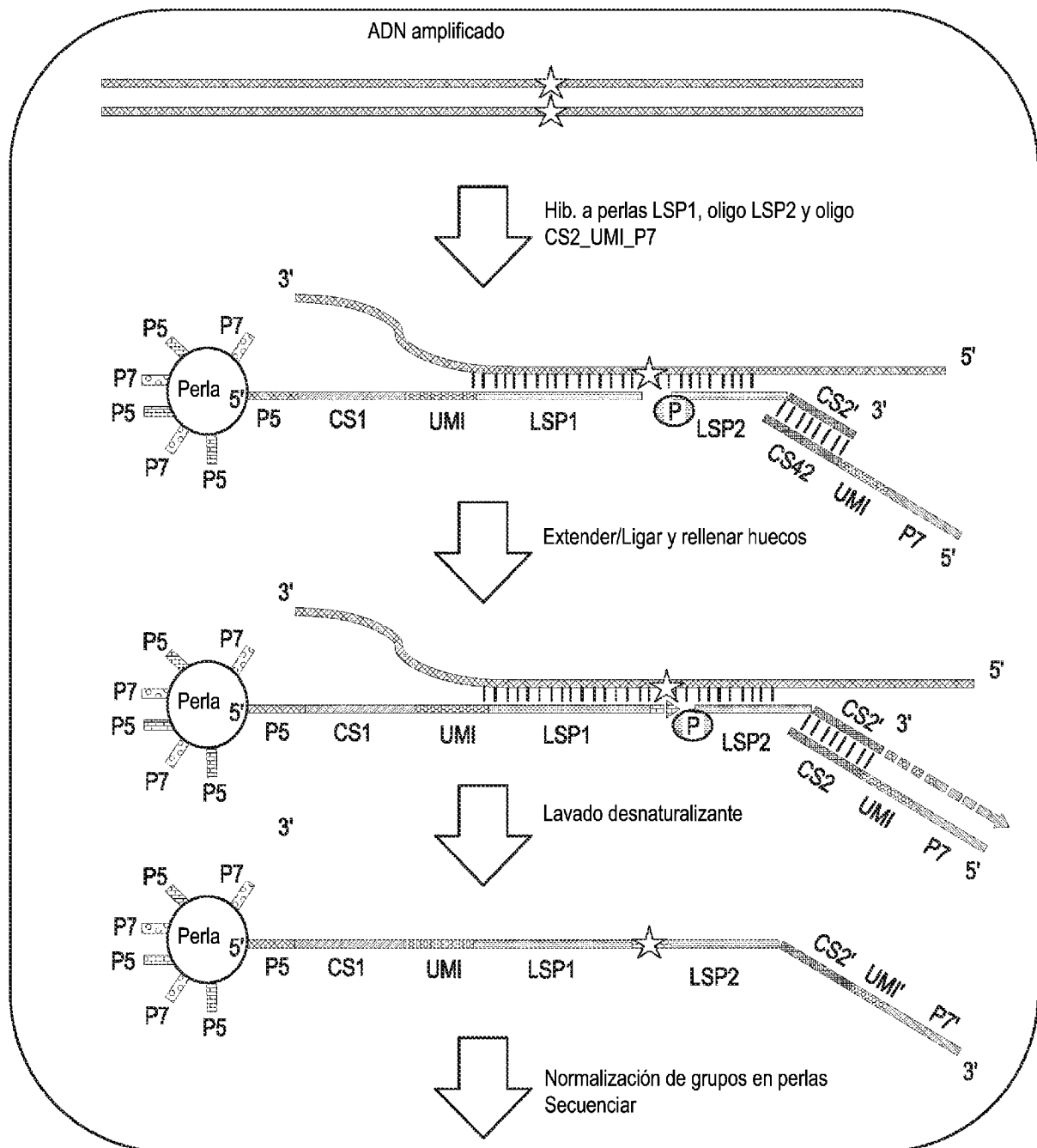


FIGURA 21

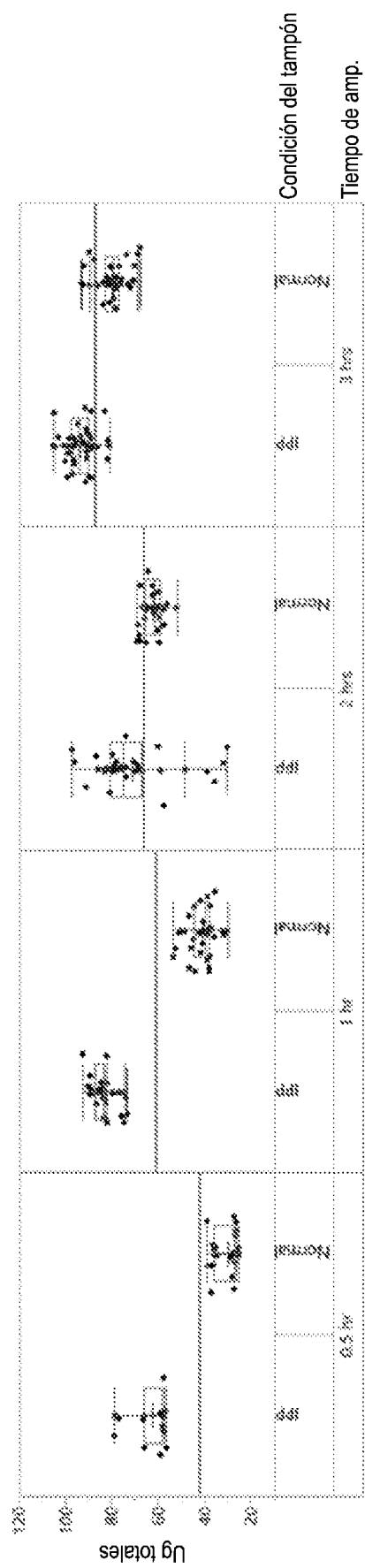


FIGURA 22

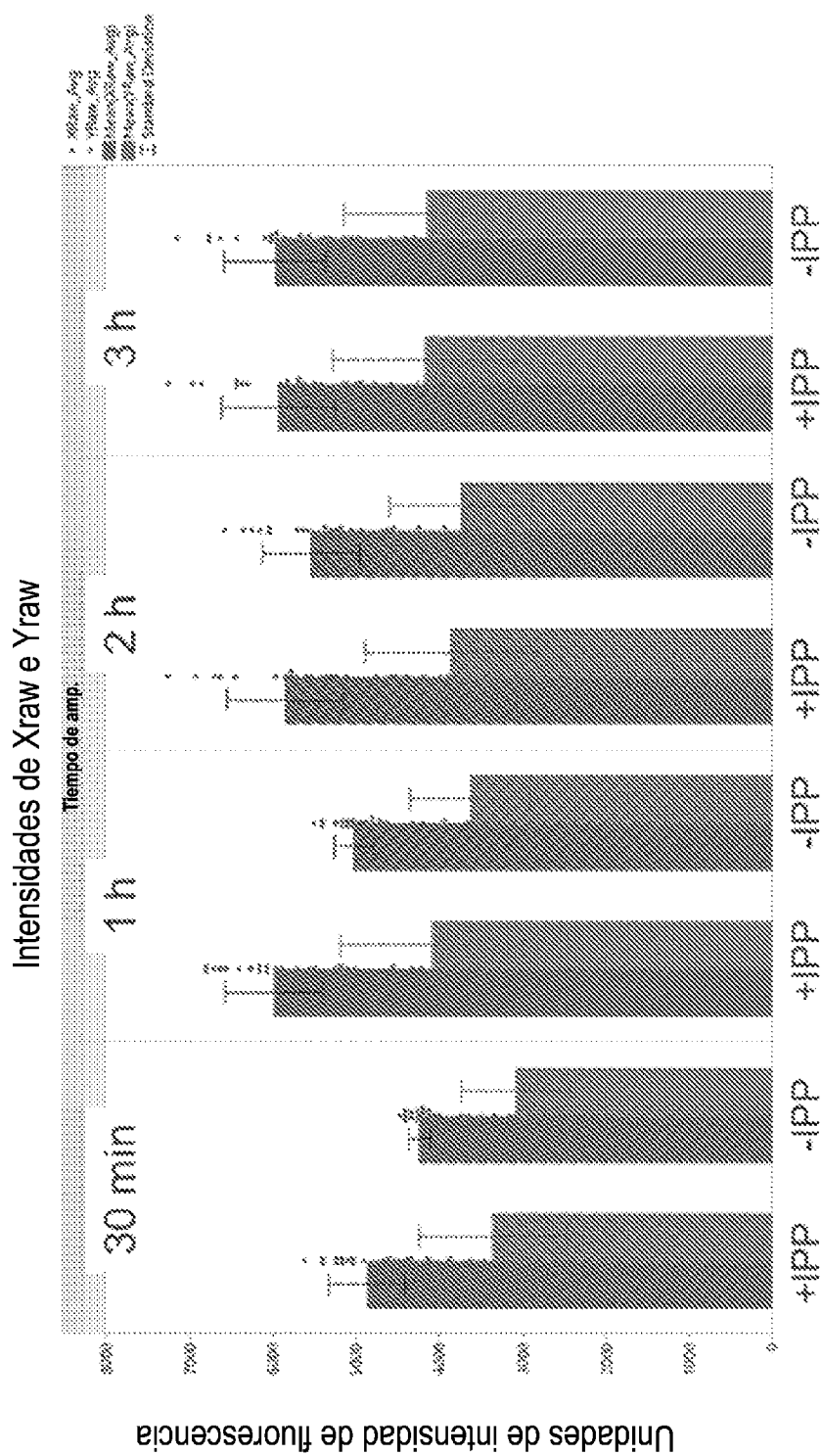


FIGURA 23

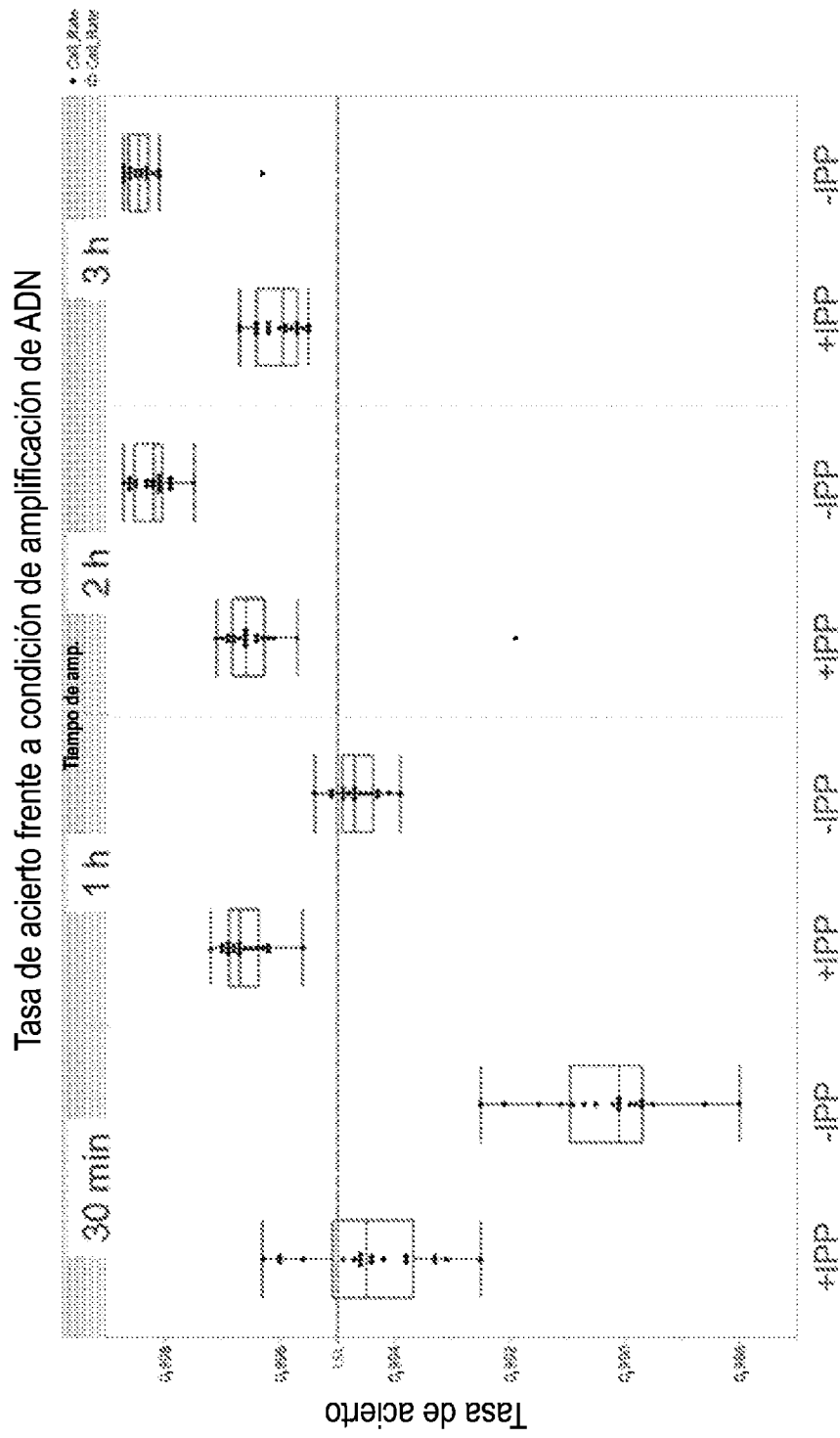


FIGURA 24