

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 055**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009** E 13180255 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** EP 2669387

54 Título: **Métodos para seleccionar y amplificar polinucleótidos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SABOT, ANDREA;
RIGATTI, ROBERTO y
SHEN, MIN-JUI RICHARD**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 595 055 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 para seleccionar y amplificar polinucleótidos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la amplificación de ácidos nucleicos. Más específicamente, las presentes realizaciones proporcionan métodos para la selección de una o más regiones de una muestra de ácido nucleico sobre un soporte sólido y el crecimiento de grupos de ácido nucleico directamente en el soporte sólido, eliminando la necesidad de múltiples etapas de titulación de la muestra.

Antecedentes de la invención

[0002] En esta solicitud se hace referencia a varias publicaciones y documentos de patente con el fin de describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

[0003] Varios de los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento se basan en una reacción de amplificación universal, por lo que una muestra de ADN se fragmenta al azar, a continuación se trata de manera que los extremos de los diferentes fragmentos contengan todos la misma secuencia de ADN. Los fragmentos con extremos universales pueden ser amplificados en una sola reacción con un solo par de oligonucleótidos de amplificación. La separación de la biblioteca de fragmentos a nivel de una sola molécula antes de la amplificación garantiza que las moléculas amplificadas forman poblaciones discretas que se pueden analizar aún más. Tales separaciones pueden realizarse ya sea en emulsiones, o sobre una superficie. En otra alternativa, es posible diseñar oligonucleótidos de amplificación que son específicos de ciertas porciones de la muestra de ácido nucleico y, por lo tanto, eliminan la necesidad de modificar los extremos de la muestra.

[0004] Las micromatrices de polinucleótidos se han formado basándose en la amplificación de ácidos nucleicos 'en fase sólida'. Por ejemplo, se puede utilizar una reacción de amplificación en puente, en la que un molde inmovilizado sobre un soporte sólido se amplifica y los productos de amplificación se forman en el soporte sólido para formar micromatrices que comprenden grupos o 'colonias' de ácido nucleico. Cada grupo o colonia en una micromatriz de este tipo se forma a partir de una pluralidad de cadenas idénticas de polinucleótidos inmovilizados y una pluralidad de cadenas idénticas de polinucleótidos complementarios inmovilizados. Las micromatrices así formadas se denominan generalmente en el presente documento como 'micromatrices agrupadas'

[0005] Al igual que en otras técnicas de amplificación, la amplificación en puente en fase sólida utiliza oligonucleótidos de amplificación directos e inversos que incluyen secuencias de nucleótidos 'específicas del molde' que son capaces de hibridar con las secuencias en el molde a amplificar, o el complemento de las mismas, en las condiciones de las etapas de hibridación de la reacción de amplificación. Las secuencias del molde con las que hibridan los cebadores en las condiciones de reacción de amplificación pueden ser referidas en la presente memoria como secuencias de 'unión al cebador'.

[0006] Ciertas realizaciones de los métodos de agrupación utilizan cebadores 'universales' para amplificar una porción de molde variable que se va a amplificar y que está flanqueada en 5' y 3' por secuencias de unión al cebador comunes o 'universales'. Los cebadores directos e inversos 'universales' incluyen secuencias capaces de hibridar con las secuencias de unión al cebador 'universales' en la construcción del molde. La parte del molde variable o 'diana' puede ser una secuencia conocida, desconocida o parcialmente conocida. Este enfoque tiene la ventaja de que no es necesario el diseño de un par específico de cebadores para cada secuencia diana a amplificar; se pueden usar los mismos cebadores para la amplificación de diferentes moldes siempre que cada molde se modifique mediante la adición de las mismas secuencias de unión al cebadores universales a sus extremos 5' y 3'. Por tanto, la secuencia diana variable puede ser cualquier fragmento de ADN de interés. Se puede usar un enfoque análogo para amplificar una mezcla de moldes (dianas con extremos conocidos), tales como una pluralidad o biblioteca de moléculas de ácido nucleico diana (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico), utilizando un solo par de cebadores universales directos e inversos, siempre que cada molécula de molde en la mezcla esté modificada por la adición de las mismas secuencias de unión a cebadores universales.

[0007] Estos enfoques en los que se utiliza un 'cebador universal' para la amplificación por PCR, y, en particular, la amplificación en puente en fase sólida, son ventajosos ya que permiten amplificar múltiples moléculas de molde de la misma o diferente, conocida o desconocida secuencia en una reacción única de amplificación, la cual se puede llevar a cabo sobre un soporte sólido que lleva un solo par de cebadores 'universales'. La amplificación simultánea de una mezcla de moldes de secuencias diferentes puede llevarse a cabo de otro modo con una pluralidad de pares de cebadores, siendo cada par complementario con un único molde en la mezcla. La generación de una pluralidad de pares de cebadores para cada molde individual puede ser incómoda y cara en el caso de mezclas complejas de moldes. En ciertas aplicaciones, tales como la detección de la presencia de una infección viral o microbiana, o para la caracterización de una población de microbios, los oligonucleótidos de amplificación se pueden diseñar de tal manera que solo se amplifica el ácido nucleico de los microbios.

- [0008]** En la preparación de una micromatriz agrupada, generalmente cuanto mayor es la concentración del molde, mayor será la densidad de grupos producidos en una micromatriz agrupada. Si la densidad de los grupos es demasiado grande, puede ser difícil resolver individualmente cada grupo y se pueden formar colonias solapantes. Se puede realizar una titulación para determinar la concentración óptima del molde para lograr una densidad óptima del grupo en la micromatriz en la que cada grupo se puede resolver por separado. Sin embargo, tales titulaciones pueden conducir a una pérdida de canales de celdas de flujo valiosos debido a una densidad de grupo demasiado alta o demasiado baja, una pérdida de muestra de molde, un aumento en el nivel de los reactivos necesarios o un aumento en el tiempo de procesamiento de la muestra.
- 10 **[0009]** Por lo tanto, hay una necesidad de un método para controlar y conseguir la densidad deseada del grupo que sea independiente de la concentración de la muestra de ácido nucleico original y que evite los pasos de titulación del ácido nucleico. La presente invención satisface esta necesidad y además proporciona otras ventajas.

Sumario de la invención

- 15 **[0010]** La invención proporciona un método de selección y amplificación de polinucleótidos tal como se define en las reivindicaciones. El método incluye (a) proporcionar una muestra de ácido nucleico que tiene una pluralidad de polinucleótidos molde; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido en el que la pluralidad de oligonucleótidos incluye (i) una pluralidad de oligonucleótidos de captura que tienen cada uno una secuencia diferente capaz de hibridar con una región seleccionada de la muestra de ácido nucleico y (ii) una pluralidad de oligonucleótidos de amplificación, en el que los oligonucleótidos de captura se inmovilizan a una densidad más baja que los oligonucleótidos de amplificación; (c) aplicar los polinucleótidos molde al soporte sólido en condiciones tales que los polinucleótidos molde se hibridan selectivamente con los oligonucleótidos de captura; (d) extender los oligonucleótidos de captura para generar productos de extensión complementarios con los polinucleótidos molde y (e) amplificar los productos de extensión usando las una o más secuencias de amplificación inmovilizadas sobre el soporte sólido.

- [0011]** La descripción divulga además un método para controlar la secuencia y la densidad de las colonias de polinucleótidos monocatenarios amplificados formados en un soporte sólido. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos molde; (b) proporcionar una pluralidad de al menos tres oligonucleótidos inmovilizados en un soporte sólido en el que al menos uno de los oligonucleótidos es un oligonucleótido de captura es capaz de hibridar con los polinucleótidos molde, y al menos dos de los oligonucleótidos son oligonucleótidos de amplificación que son incapaces de hibridar con los polinucleótidos molde, en el que los oligonucleótidos de captura se inmovilizan a una densidad más baja que los oligonucleótidos de amplificación y los oligonucleótidos de captura son selectivos para una porción de la pluralidad de polinucleótidos molde; (c) aplicar los polinucleótidos molde al soporte sólido en condiciones adecuadas tales que las moléculas de polinucleótido molde hibridan selectivamente con los oligonucleótidos de captura; (d) extender los oligonucleótidos de captura utilizando una polimerasa de ácido nucleico para generar los productos de extensión bicatenarios complementarios con los polinucleótidos molde monocatenarios; (e) desnaturalizar los productos de extensión bicatenarios para eliminar las moléculas de molde polinucleotídico monocatenarias hibridadas de los productos de extensión para producir moléculas de molde monocatenarias inmovilizadas sobre el soporte sólido y (f) amplificar las moléculas molde monocatenarias inmovilizadas sobre el soporte sólido usando los dos o más oligonucleótidos de amplificación inmovilizados sobre el soporte sólido; en el que la densidad de las colonias inmovilizadas se controla por la densidad de los oligonucleótidos de captura en lugar de la concentración de los polinucleótidos molde monocatenarios.

- [0012]** La descripción describe además una celda de flujo uniformemente injertada con una pluralidad de oligonucleótidos, en el que la pluralidad incluye cuatro especies de oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, en el que dos de las cuatro especies (p. ej., una primera y una segunda especie) están presentes a una densidad más baja que las otras dos especies (p.ej., una tercera y una cuarta especie).

Breve descripción de los dibujos

- [0013]**
- 55 La Figura 1 muestra un método de la invención en el que el oligonucleótido de captura es más largo que los oligonucleótidos de amplificación y el molde se hibrida selectivamente con el oligonucleótido de captura que se extiende más allá del oligonucleótido de amplificación. El oligonucleótido de captura se extiende frente a la cadena molde y la cadena molde se desnaturaliza y se elimina. La copia del molde inmovilizado puede hibridar con uno de los oligonucleótidos de amplificación inmovilizados y el oligonucleótido de amplificación puede extenderse. El oligonucleótido de captura también comprende una secuencia que corresponde a uno de los oligonucleótidos de amplificación y, por lo tanto, en la síntesis de un dúplex de la copia del molde inmovilizada, ambos extremos del dúplex inmovilizados pueden comprender secuencias complementarias a uno de los oligonucleótidos de amplificación.

65

La Figura 2 muestra un ejemplo de método de preparación de una biblioteca de molde monocatenario adecuado para la amplificación.

La Figura 3 muestra un ejemplo de método de la invención en el que uno de los oligonucleótidos de amplificación se bloquea inicialmente para el alargamiento de la cadena. Después de extender la cadena molde inmovilizada, el bloque se retira y la muestra puede someterse a ciclos de amplificación en puente.

La Figura 4 muestra un ejemplo de soporte sólido con dos especies diferentes de oligonucleótidos de amplificación inmovilizados y una especie de oligonucleótido de captura.

La Figura 5 muestra una muestra de ácido nucleico fragmentado en una pluralidad de polinucleótidos que contienen una región diana seleccionada. Tras la fragmentación, algunos fragmentos contienen la región diana, proporcionando de este modo moldes para la captura posterior, mientras que otros fragmentos no contienen una región diana y no pueden por lo tanto convertirse en moldes. Los fragmentos pueden someterse a la ligadura de un adaptador en un extremo. El adaptador puede ser complementario a, o igual que uno de los oligonucleótidos de amplificación en el soporte.

La Figura 6 muestra la hibridación de una muestra de polinucleótidos molde de la figura 5 a un soporte. La muestra se hibrida con el oligonucleótido de captura a través de la región diana y las moléculas restantes de la muestra, que no contienen la región diana no se hibridan y se pueden lavar del soporte. Las moléculas capturadas sobre el soporte se pueden utilizar como polinucleótidos molde.

La Figura 7 muestra que los oligonucleótidos de captura que han capturado los polinucleótidos molde de la Figura 6 se pueden extender para hacer productos de extensión complementarios a los polinucleótidos molde. Los polinucleótidos molde se pueden desnaturalizar. Si los moldes llevan una secuencia de adaptador, la secuencia adaptadora se copia como parte de la extensión. Si la copia de la secuencia adaptadora es complementaria a un oligonucleótido de amplificación, los productos de extensión se pueden amplificar usando los oligonucleótidos de amplificación en el soporte.

La Figura 8 muestra un ensayo para el análisis de una población de microbios utilizando la secuenciación del ARN ribosómico 16S. Los oligonucleótidos de captura del soporte se muestran selectivos para dos de las regiones constantes del gen del ARN ribosómico 16S bacteriano (8F y 553R). Estos dos cebadores se pueden usar para amplificar aproximadamente 500 pares de bases del gen de aproximadamente 1500 pares de bases, e incluyen las regiones variables V1, V2 y V3. Los oligonucleótidos de captura se producen por extensión de los oligonucleótidos de amplificación P5 y P7. Los oligonucleótidos de captura se utilizan entonces para capturar específicamente los fragmentos de los genes de ARNr 16S de la muestra. Los oligonucleótidos de captura se extienden a continuación. Cada oligonucleótido de captura extendido se puede convertir en un grupo mediante amplificación en fase sólida utilizando los oligonucleótidos de amplificación. La secuenciación de los grupos da información acerca de los miembros de la población de microbios debido a las diferentes regiones de ARN 16S capturadas y secuenciadas, ya que cada microbio tiene una secuencia de genes 16S característicos.

Descripción detallada de la invención

[0014] La invención se refiere en determinadas realizaciones a métodos para seleccionar y controlar la densidad de diferentes especies moleculares derivatizadas en una superficie. En realizaciones particulares, la especie molecular son ácidos nucleicos que tienen secuencias diferentes. La invención es particularmente útil para controlar la densidad de grupos de ácido nucleico producidos sobre un soporte sólido. Una ventaja de los métodos es la reducción o incluso la eliminación de la necesidad de múltiples etapas de titulación de la muestra para el control de la densidad de las moléculas en las superficies. Otra ventaja de la invención es la capacidad de seleccionar una porción de la muestra de ácido nucleico a través de la hibridación selectiva de la secuencia con el oligonucleótido de captura.

[0015] Los métodos presentados en la presente memoria se pueden utilizar con los descritos en la solicitud de los Estados Unidos 12/395229 incluyendo, por ejemplo, los métodos de control de la densidad de los grupos mediante el uso de oligonucleótidos de captura sobre un soporte sólido. En realizaciones particulares, los métodos presentados en la presente memoria incluyen el uso de los oligonucleótidos de captura para seleccionar un subconjunto de la muestra de ácido nucleico y, por lo tanto, para controlar tanto la secuencia de los grupos como el número o la densidad, de grupos sobre el soporte.

[0016] En realizaciones en las que las superficies se derivatizan con ácidos nucleicos para la posterior formación de grupos amplificados, la densidad del grupo sobre el soporte se puede controlar por la densidad de uno de los cebadores inmovilizados utilizados para capturar las muestras molde. La densidad de los cebadores en cada chip se puede controlar durante la fabricación, simplemente por la relación entre los oligonucleótidos de captura y los oligonucleótidos de amplificación y, por tanto, la densidad de los grupos puede ser independiente de la concentración o dilución de la muestra molde. Por ejemplo, se pueden utilizar condiciones en las que el molde está

en un exceso molar con respecto a los cebadores, de forma que la densidad de los grupos será sustancialmente la misma incluso si la concentración del molde se incrementa aún más. Esta independencia de la concentración elimina la necesidad de medir con precisión la concentración inicial del molde bicatenario y es independiente de la dilución precisa de la muestra. La densidad de los grupos en varios chips puede hacerse sustancialmente uniforme controlando la relación y la concentración de los oligonucleótidos de captura a la amplificación de los oligonucleótidos unidos a la superficie del chip. Dado que los cebadores generalmente se pueden sintetizar y manipular en condiciones más controladas que las muestras molde que se derivan de diferentes fuentes biológicas, los métodos expuestos en la presente memoria proporcionan una mayor reproducibilidad en la creación de micromatrices de grupo. Otras ventajas son proporcionadas por la creación de conjuntos de cebadores en una relación deseada que pueden ser reutilizados para crear múltiples micromatrices de grupo que tienen una densidad reproducible.

[0017] De acuerdo con los métodos presentados en la presente memoria, se puede inmovilizar en un soporte sólido una pluralidad de oligonucleótidos. La pluralidad puede incluir diferentes especies de molécula de oligonucleótido que tienen cada una una secuencia diferente. Por ejemplo, una pluralidad de oligonucleótidos puede incluir al menos dos especies diferentes de oligonucleótidos, al menos tres especies diferentes, al menos cuatro especies diferentes o más, en la que una primera especie tiene una secuencia diferente de la otra especie en la pluralidad. Se comprenderá que diferentes especies de oligonucleótido pueden compartir una secuencia común siempre que haya una diferencia de secuencia entre al menos una parte de las diferentes especies. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, las dos especies identificadas como P5' y P5'HibBloq comparten una secuencia común pero la especie P5'HibBloq tiene una secuencia de formación de horquilla adicional que no se encuentra en la especie P5'.

[0018] El término 'inmovilizado', como se usa en la presente memoria se pretende que abarque la unión directa o indirecta a un soporte sólido a través de un enlace(s) covalente o no covalente. En ciertas realizaciones de la invención, se puede utilizar la unión covalente, pero generalmente todo lo que se requiere es que las moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas a un soporte en condiciones en las cuales se haya previsto utilizar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieren la amplificación y/o secuenciación del ácido nucleico. Generalmente los oligonucleótidos que se utilizan como oligonucleótidos de captura u oligonucleótidos de amplificación se inmovilizan de manera que un extremo 3' está disponible para la extensión enzimática y al menos una porción de la secuencia es capaz de hibridarse con una secuencia complementaria. La inmovilización puede ocurrir a través de la hibridación con un oligonucleótido unido a la superficie, en cuyo caso el oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado puede estar en la orientación 3'-5'. Como alternativa, la inmovilización puede ocurrir por medios distintos de la hibridación de apareamiento de bases, tales como la unión covalente expuesta anteriormente.

[0019] La expresión 'soporte sólido' tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustrato insoluble o micromatriz a la cual las moléculas se pueden unir, como por ejemplo perlas de látex, perlas de dextrano, superficies de poliestireno, superficies de polipropileno, gel de poli(acrilamida), superficies de oro, superficies de vidrio y obleas de silicio. El soporte sólido puede ser una superficie de vidrio plana. El soporte sólido puede estar montado en el interior de una celda de flujo para permitir la interacción con las soluciones de los diversos reactivos.

[0020] En ciertas realizaciones, el soporte sólido puede comprender un sustrato inerte o micromatriz que ha sido 'funcionalizado', por ejemplo por la aplicación de una capa o recubrimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente a las moléculas tales como polinucleótidos. A modo de ejemplo no limitante, tales soportes pueden incluir capas de hidrogel de poli(acrilamida) en un sustrato inerte tal como vidrio. En tales realizaciones, las moléculas (por ejemplo, polinucleótidos) pueden estar directamente unidas covalentemente a la capa intermedia (por ejemplo, un hidrogel), pero la capa intermedia puede ella misma no estar covalentemente unida a otras capas del sustrato o micromatriz (por ejemplo, un sustrato de vidrio). La unión covalente a un soporte sólido debe interpretarse en consecuencia como que abarca este tipo de disposición.

[0021] 'Oligonucleótidos cebadores' u 'oligonucleótidos de amplificación' son secuencias de oligonucleótidos que son capaces de hibridar específicamente con una secuencia de polinucleótido monocatenaria a amplificar en las condiciones que se dan en una etapa de hibridación del cebador de una reacción de amplificación. En general, las expresiones 'ácido nucleico', 'polinucleótido' y 'oligonucleótido' se usan indistintamente en la presente memoria. Las diferentes expresiones no están destinadas a denotar cualquier diferencia en particular en tamaño, secuencia u otra propiedad, salvo que se indique específicamente lo contrario. Para claridad de la descripción, las expresiones pueden ser utilizadas para distinguir una especie de molécula de otra cuando se describe un método o composición particular que incluye varias especies moleculares.

[0022] Una secuencia de polinucleótidos que se va a copiar o amplificar generalmente se denomina en la presente memoria 'molde'. Un molde puede incluir sitios de unión al cebador que flanquean una secuencia molde que se va a amplificar. Un molde hibridado con un oligonucleótido de captura puede contener bases que se extienden más allá del extremo 5' del oligonucleótido de captura de tal manera que no todo el molde es susceptible de extensión. En realizaciones particulares, como se expone en más detalle a continuación, una pluralidad de polinucleótidos molde incluye diferentes especies que difieren en sus secuencias molde, pero que tienen sitios de unión al cebador que son los mismos para dos o más de las diferentes especies. Los dos sitios de unión al cebador que pueden flanquear

una secuencia molde en particular pueden tener la misma secuencia, tal como una secuencia palindrómica o secuencia homopolimérica, o los sitios de unión al cebador pueden tener secuencias diferentes. De acuerdo con ello, una pluralidad de diferentes polinucleótidos molde puede tener la misma secuencia de unión al cebador o dos secuencias de unión al cebador diferentes en cada extremo de la secuencia molde. Por lo tanto, las especies en una pluralidad de polinucleótidos molde pueden incluir regiones de secuencia conocida que flanquean regiones de secuencia desconocida que van a ser evaluadas, por ejemplo, por secuenciación. Los polinucleótidos molde pueden llevar una sola especie de adaptador que sirve como una secuencia de unión al cebador en un único extremo del cebador. En los casos en los que los moldes llevan un adaptador en un solo extremo, este puede ser el extremo 3' o el extremo 5'. Los polinucleótidos molde se pueden utilizar sin ningún adaptador, en cuyo caso la secuencia de unión al cebador procede directamente de una secuencia existente en la muestra de ácido nucleico.

[0023] En general, las reacciones de amplificación utilizan al menos dos oligonucleótidos de amplificación, a menudo denominados 'directos' e 'inversos'. En general, los oligonucleótidos de amplificación son estructuras monocatenarias de polinucleótidos. También pueden contener una mezcla de bases naturales o no naturales y cualquier modificación no natural no impida de forma permanente o irreversible su función como cebador, siendo definida esta como la capacidad para hibridar con una cadena de polinucleótidos molde durante las condiciones de una reacción de extensión o amplificación y para actuar como un punto de iniciación para la síntesis de una nueva cadena de polinucleótidos complementaria a la cadena molde hibridada. Dicho esto, en ciertas realizaciones la presente invención puede implicar el uso de un subconjunto de cebadores, ya sea directos o inversos, que se han modificado para impedir la hibridación con una cadena de polinucleótidos molde, alterando o revertiendo la modificación en algún momento de tal manera que ya no se evite la hibridación.

[0024] Los cebadores pueden comprender adicionalmente modificaciones químicas no nucleotídicas, por ejemplo, para facilitar la unión covalente del cebador a un soporte sólido. Ciertas modificaciones químicas pueden por sí mismas mejorar la función de la molécula como un cebador o pueden proporcionar alguna otra funcionalidad útil, tal como proporcionar un sitio de escisión que permite al cebador (o una cadena de polinucleótido extendida derivada de la misma) escindirse de un soporte sólido. Las modificaciones químicas útiles también pueden proporcionar modificaciones reversibles que impiden la hibridación o extensión del cebador hasta que la modificación se elimina o se invierte. Del mismo modo, otras moléculas unidas a una superficie de acuerdo con la invención pueden incluir restos enlazadores escindibles y/o modificaciones reversibles que alteran una actividad química particular de la función de la molécula.

[0025] Una pluralidad de oligonucleótidos usados en los métodos presentados en la presente memoria puede incluir especies que funcionan como oligonucleótidos de captura. Los oligonucleótidos de captura pueden incluir una 'porción específica de molde', es decir, una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una región seleccionada de la muestra de ácido nucleico en una molécula de polinucleótido de interés, tales como las que se van a amplificar. Los oligonucleótidos de captura pueden comprender una secuencia que es específica de un subconjunto de las moléculas en una muestra de ácido nucleico. Por lo tanto, en estas y otras realizaciones relacionadas, solo se puede seleccionar un subconjunto de las moléculas de la muestra por los oligonucleótidos de captura para convertirse en polinucleótidos molde. Los oligonucleótidos de captura pueden comprender una sola especie de oligonucleótido o pueden comprender dos o más especies con una secuencia diferente. Así, el oligonucleótido de captura puede ser de dos o más secuencias, 10 o más secuencias, 100 o más secuencias, 1.000 o más secuencias o 10.000 o más secuencias. Las secuencias de unión al cebador serán generalmente de secuencia conocida y, por lo tanto, serán complementarias a una región de secuencia conocida de la molécula de polinucleótido monocatenario. Los oligonucleótidos de captura pueden incluir un oligonucleótido de captura y un oligonucleótido de amplificación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, un oligonucleótido de captura puede ser de mayor longitud que los oligonucleótidos de amplificación que se unen a el mismo sustrato, en cuyo caso el extremo 5' de los oligonucleótidos de captura puede comprender una región con la misma secuencia que uno de los oligonucleótidos de amplificación. Una parte de un molde, tal como el extremo 3' del molde, puede ser complementario con el extremo 3' de los oligonucleótidos de captura. El extremo 5' del molde puede contener una región que comprende una secuencia idéntica a uno de los oligonucleótidos de amplificación de manera que tras la copia del molde, la copia puede hibridar con el oligonucleótido de amplificación inmovilizado. Por lo tanto, una especie de oligonucleótido que es útil en los métodos presentados en la presente memoria puede tener un oligonucleótido de captura, un oligonucleótido de amplificación o ambos. Por el contrario, una especie de oligonucleótido puede carecer de un oligonucleótido de captura, un oligonucleótido de amplificación o ambos. De esta manera la especificidad de hibridación de las especies de oligonucleótidos se puede adaptar para una aplicación particular de los métodos.

[0026] La longitud de las secuencias de unión al cebador no tiene por qué ser la misma que la de las secuencias conocidas de moléculas de molde de polinucleótido y puede ser más corta en ciertas realizaciones, por ejemplo, es particularmente de 16-50 nucleótidos, más particularmente 16-40 nucleótidos y aún más particularmente de 20-30 nucleótidos de longitud. La longitud deseada de los oligonucleótidos cebadores dependerá de una serie de factores. Sin embargo, los cebadores son generalmente lo suficientemente largos (complejos) para que la probabilidad de hibridación con secuencias distintas a la secuencia de unión al cebador sea muy baja. Por consiguiente, las secuencias que flanquean una secuencia molde pueden incluir una porción de unión al cebador y otras porciones,

tales como un oligonucleótido de captura, una secuencia de etiqueta o una combinación conocida de los mismos.

[0027] 'Amplificación en fase sólida' cuando se usa en referencia a ácidos nucleicos, se refiere a cualquier reacción de amplificación de ácidos nucleicos realizada en o en asociación con un soporte sólido. Generalmente, la totalidad o una parte de los productos amplificados se sintetizan por extensión de un cebador inmovilizado. En particular, la expresión abarca las reacciones de amplificación en fase sólida análogas a las amplificaciones en fase de solución estándar, excepto que al menos uno de los oligonucleótidos de amplificación está inmovilizado en el soporte sólido.

[0028] Como apreciará el lector experto, una reacción de amplificación de ácido nucleico dada puede llevarse a cabo con al menos un tipo de cebador directo y al menos un tipo de cebador inverso específico del molde a amplificar. Sin embargo, en ciertas realizaciones, los cebadores directos e inversos pueden incluir porciones específicas de molde de secuencia idéntica. En otras palabras, es posible llevar a cabo la amplificación en fase sólida utilizando un solo tipo de cebador y tales métodos de cebadores individuales están abarcados dentro del alcance de la invención. Un tipo de cebador puede incluir (a) un subconjunto(s) de cebador(es) modificado(s) que se han modificado para impedir la hibridación con una cadena de polinucleótidos molde, eliminando, alterando o revertiendo la modificación en algún momento de modo que ya no esté impedida la hibridación. Otras realizaciones pueden utilizar cebadores directos e inversos que contienen secuencias específicas de molde idénticas pero que difieren en algunas características estructurales. Por ejemplo, un tipo de cebador puede contener una modificación no nucleotídica que no está presente en el otro. En otra realización, las secuencias específicas molde son diferentes y solo se usa un cebador en un método de amplificación lineal. En otras realizaciones de la invención, los cebadores directos e inversos pueden contener porciones específicas de secuencia diferente.

[0029] En ciertas realizaciones de la invención, los oligonucleótidos de amplificación para la amplificación en fase sólida se inmovilizan mediante unión covalente al soporte sólido en o cerca del extremo 5' del cebador, de modo que una porción del cebador está libre para hibridarse con su molde cognado y el grupo hidroxilo 3' hidroxilo está libre para participar en la extensión del cebador. Una vez más, en ciertas realizaciones, se proporciona un subconjunto de cebadores modificados en los que está impedida la hibridación y/o extensión hasta que se elimina, revierte o altera la modificación. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos de amplificación serán incapaces de hibridación con el molde monocatenario inicial. En tales realizaciones, la hibridación del molde monocatenario será generalmente específico para los oligonucleótidos de captura de tal manera que la cantidad de oligonucleótidos de captura en la superficie determina la cantidad de molde capturado y por lo tanto la densidad de los grupos amplificados resultantes.

[0030] La química de unión elegida dependerá generalmente de la naturaleza del soporte sólido y de cualquier funcionalización o derivatización aplicada. En el caso de las realizaciones de ácidos nucleicos, el propio cebador puede incluir un resto que puede ser una modificación química no nucleotídica para facilitar la unión. Por ejemplo, el cebador puede incluir un nucleófilo que contiene azufre tal como un fosfortioato o tiofosfato en el extremo 5'. En el caso de hidrogeles de poli(acrilamida) en soporte sólido, este nucleófilo puede unirse a un grupo de bromo acetamida presente en el hidrogel. En una realización, los medios de unión de los cebadores al soporte sólido se hace a través de la unión fosfortioato en 5' a un hidrogel comprendido de acrilamida polimerizada y N-(5-bromoacetamidilpentil)acrilamida (BRAPA).

[0031] Se puede formar un 'césped' homogéneamente distribuido de oligonucleótidos inmovilizados mediante el acoplamiento (injerto) de una solución de especies de oligonucleótidos sobre el soporte sólido. La solución puede contener una población homogénea de oligonucleótidos pero contendrá generalmente una mezcla de diferentes especies de oligonucleótidos. La mezcla puede incluir, por ejemplo, al menos dos, tres o más especies diferentes de oligonucleótido. Cada superficie que está expuesta a la solución, por tanto, reacciona con la solución para crear una densidad uniforme de las secuencias inmovilizadas sobre la totalidad del soporte sólido expuesto. Como tal, una parte de la superficie que tiene una mezcla de diferentes secuencias inmovilizadas puede estar rodeada por un área de la superficie que tiene una mezcla de las mismas secuencias inmovilizadas. Una densidad adecuada de oligonucleótidos de amplificación es de al menos 1 fmol/mm^2 (6×10^{10} por cm^2), o más óptimamente al menos 10 fmol/mm^2 (6×10^{11} por cm^2). La densidad de los oligonucleótidos de captura puede ser controlada para dar una densidad óptima de grupo de 10^6 - 10^9 grupos por cm^2 . La relación entre las especies de oligonucleótidos de captura y las especies de oligonucleótidos de amplificación puede ser cualquier valor deseado, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos, 1:100, 1:1.000 o 1:100.000 dependiendo de la densidad y brillo del grupo deseados. Se pueden usar densidades o proporciones similares de otras especies moleculares en realizaciones en las que se unen a una superficie moléculas distintas de ácidos nucleicos.

[0032] Los oligonucleótidos de captura se pueden depositar sobre el soporte sólido, al mismo tiempo que los oligonucleótidos de amplificación. En otra alternativa, especialmente en situaciones en las que los polinucleótidos molde no llevan secuencias complementarias a las de los oligonucleótidos de amplificación, los oligonucleótidos de captura se pueden producir usando un soporte sólido que lleva únicamente oligonucleótidos de amplificación mediante la extensión de una porción de los oligonucleótidos de amplificación usando una copia de los oligonucleótidos de captura como un molde. Por ejemplo, se puede preparar una población de sondas de oligonucleótidos que contienen una secuencia complementaria con uno de los oligonucleótidos de amplificación y

una secuencia que se extiende más allá de los oligonucleótidos de amplificación. Esta población de oligonucleótidos puede hibridar con los oligonucleótidos de amplificación en el soporte a una densidad suficientemente baja como para que solo una porción de los oligonucleótidos de amplificación en el soporte se hibride. Por ejemplo, las moléculas hibridadas pueden ser individualmente resolubles de tal manera que la distancia media entre moléculas vecinas sea lo suficientemente grande como para que las dos moléculas se puedan detectar por separado mediante microscopía óptica. La porción de los oligonucleótidos de amplificación con las moléculas hibridadas puede someterse después a extensión, por ejemplo, usando una polimerasa y trifosfatos de nucleósidos. Esto tiene la ventaja de que los oligonucleótidos de captura se pueden producir a partir de un soporte sólido común estándar que contiene solo los oligonucleótidos de amplificación, es decir, el mismo soporte sólido puede ser preparado para su uso en todas las aplicaciones, sin necesidad de fabricar un soporte diferente cada vez que se altera la secuencia de los oligonucleótidos de captura y los oligonucleótidos de captura se diseñan por separado y se añaden al soporte.

[0033] Con anterioridad, la densidad de moléculas unidas de polinucleótidos monocatenarias y por lo tanto la densidad de los grupos se controlaba mediante la alteración de la concentración de las moléculas de polinucleótidos molde aplicadas a un soporte. Mediante la utilización de un cebador u oligonucleótido de captura modificado tal como se expone en la presente memoria, la densidad de grupos en la micromatriz amplificada puede ser controlada sin depender de un ajuste cuidadoso de la concentración de partida de la cadena de polinucleótidos molde aplicada al soporte sólido. Esto tiene la ventaja significativa de que los métodos no necesitan basarse en las mediciones de concentración precisas y las diluciones de las moléculas de polinucleótido molde, lo que conduce a un aumento de la fiabilidad, reducción de los errores de dilución y una reducción en el tiempo y la cantidad de reactivos necesarios en los procesos de etapas posteriores. Para cada soporte sólido que contiene demasiados o demasiados pocos grupos, hay una reducción en la cantidad de datos generados para un análisis de los grupos. Esto puede significar que la generación de la profundidad de la cobertura requerida de la muestra puede requerir procesos analíticos adicionales que no serían necesarios si la densidad del grupo fuese óptima. Demasiados grupos producen saturación óptica y un aumento de la superposición entre dos moléculas amplificadas; demasiados pocos grupos dan grandes cantidades indeseables de espacio oscuro que no generan ningún dato, desperdiciando con ello reactivos que se utilizan de manera más eficiente con una superficie densamente poblada.

[0034] En una realización particular, para cada grupo, se une una copia complementaria inmovilizada de una molécula molde de polinucleótido monocatenario al soporte sólido mediante un método de hibridación y extensión del cebador. Los métodos de hibridación para la formación de dúplex estables entre secuencias complementarias por medio del apareamiento de bases de Watson-Crick son conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos de captura inmovilizados pueden incluir una región de secuencia que es complementaria a una región o porción específica del molde de la molécula de polinucleótido molde monocatenaria. A continuación, puede llevarse a cabo una reacción de extensión en la que el oligonucleótido de captura se extiende mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar una copia complementaria de la secuencia de polinucleótido monocatenario unido al soporte sólido a través del oligonucleótido de captura. La secuencia de polinucleótido monocatenario no inmovilizado en el soporte se puede separar de la secuencia complementaria en condiciones desnaturalizantes y eliminarse, por ejemplo, por lavado.

[0035] Los términos 'separada' y 'separación' cuando se utilizan en referencia a las cadenas de un ácido nucleico, se refieren a la disociación física de las bases de ADN que interactúan dentro de, por ejemplo, un dúplex de ADN de Watson-Crick de la secuencia de polinucleótido monocatenario y su complemento. Los términos también se refieren a la separación física de estas cadenas. Por lo tanto, el término puede referirse al proceso de crear una situación en la que es posible la hibridación de otra secuencia de oligonucleótido o polinucleótido cebador con una de las cadenas de un dúplex. Después de la primera reacción de extensión, el dúplex se inmoviliza a través de una única unión 5' y, por lo tanto, la separación de la cadena puede tener como resultado la pérdida de una de las cadenas de la superficie. En los casos en los que se inmovilizan las dos cadenas del dúplex, la separación de las cadenas implica que el dúplex se convierte en dos cadenas individuales inmovilizadas.

[0036] En un aspecto de la invención, uno o más de los oligonucleótidos de amplificación se pueden modificar para impedir la hibridación de una región o porción específica molde de la molécula de polinucleótido monocatenaria. Alternativa o adicionalmente, se puede modificar uno o más de los oligonucleótidos de amplificación para evitar la extensión del cebador durante una o más reacciones de extensión, lo que impide la copia de los moldes de hibridación. Estas modificaciones pueden ser temporales o permanentes.

[0037] En general, los oligonucleótidos de captura incluirán una región de la misma secuencia que la pluralidad de oligonucleótidos de amplificación. Una vez que el extremo 3' de la copia del molde inmovilizado extendido se ha hibridado con uno de los oligonucleótidos de amplificación y se ha extendido, el dúplex resultante se inmovilizará en ambos extremos y todas las bases de la secuencia de oligonucleótido de captura se habrán copiado. Por lo tanto, el oligonucleótido de captura puede incluir tanto la secuencia del oligonucleótido de amplificación, más una secuencia adicional que es complementaria con la región final o central del molde. Generalmente, la secuencia complementaria con el molde no estará presente en ninguno de los oligonucleótidos de amplificación. Como alternativa, los oligonucleótidos de amplificación pueden contener las secuencias complementarias de los moldes, pero los oligonucleótidos de amplificación se pueden bloquear de manera reversible para impedir la hibridación y/o extensión

durante una o más etapas de extensión, tal como una primera etapa de extensión en un proceso de amplificación particular.

[0038] De acuerdo con un aspecto de la invención, uno o más de los oligonucleótidos de amplificación pueden incluir una modificación que actúa como un bloqueo reversible a cualquier hibridación o extensión del molde o ambos. A modo de ejemplo no limitativo, tales modificaciones pueden manifestarse como la presencia de una secuencia adicional de nucleótidos que es complementaria al oligonucleótido de amplificación. Esta secuencia adicional puede estar presente en una porción del oligonucleótido de amplificación y por lo tanto actúa como un dúplex de horquilla intramolecular, o un grupo de bloqueo 3' que impide la extensión del cebador. Como alternativa, la secuencia adicional puede encontrarse en un oligonucleótido separado que se hibrida con el oligonucleótido de amplificación. Una característica particular de tal modificación es que puede ser eliminada, alterada o revertida de tal manera que la funcionalidad del oligonucleótido cebador modificado se restaura y el cebador es capaz de someterse a hibridación y extensión durante las etapas posteriores de los métodos. Entre otros ejemplos, el grupo de bloqueo puede ser una especie química pequeña tal como un resto 3' fosfato que se puede eliminar enzimáticamente, puede ser un nucleótido abásico de tal manera que el extremo 3' del cebador no es capaz de hibridación (y por lo tanto de extensión) o puede ser una secuencia de nucleótidos que se puede escindir selectivamente de las cadenas inmovilizadas, por ejemplo, utilizando endonucleasas de restricción que escinden selectivamente secuencias particulares o desglucosilasas que escinden selectivamente oligonucleótidos que tienen bases exógenas tales como desoxirribonucleótidos uracilo u 8-oxoguanina.

[0039] En una realización, una pluralidad de tres tipos de oligonucleótidos (por ejemplo que comprenden oligonucleótidos de captura, oligonucleótidos de amplificación directa e inversa) se inmovilizan en un soporte sólido. Como alternativa, los tres oligonucleótidos pueden ser de amplificación directa, amplificación directa bloqueada y amplificación inversa, donde el cebador directo no bloqueado actúa como el oligonucleótido de captura.

[0040] La muestra de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o doble. Con el fin de obtener una hibridación eficaz, la muestra de doble cadena puede desnaturalizarse para formar moléculas de polinucleótido monocatenarias. Las moléculas individuales de polinucleótido monocatenarias puede haberse originado en forma de cadena sencilla, como ADN o ARN o pueden tener su origen en forma de ADN de doble cadena (ADNdc) (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico, productos de PCR y amplificación y similares). Por lo tanto, un polinucleótido monocatenario puede ser la cadena sentido o antisentido de un dúplex de polinucleótidos. Los métodos de preparación de moléculas de polinucleótidos monocatenarias adecuados para su uso en el método de la invención usando técnicas estándar son bien conocidos en la técnica. La secuencia precisa de las moléculas de polinucleótido primarias puede ser conocida o desconocida durante las diferentes etapas de los métodos presentados en la presente memoria. Se entenderá que una molécula de polinucleótido bicatenaria se puede hibridar con un oligonucleótido de captura inmovilizado como se ejemplifica en la presente memoria para las moléculas de polinucleótidos monocatenarias, siempre que región monocatenaria del polinucleótido bicatenario esté disponible y sea complementaria a la secuencia del oligonucleótido de captura.

[0041] Un ejemplo de método para el aislamiento de una cadena de una construcción molecular de doble cadena se muestra en la figura 2. Una muestra de secuencia desconocida se puede fragmentar y unir los adaptadores a los extremos de cada fragmento. Una cadena de los adaptadores puede contener un resto para la inmovilización de la superficie, por ejemplo, una biotina que puede ser capturada en una superficie de estreptavidina. Los adaptadores pueden ser adaptadores desapareados, por ejemplo, como se describe en la solicitud pendiente de tramitación US 2007/0128624. La amplificación del error de apareamiento o los adaptadores bifurcados que utilizan un par de oligonucleótidos de amplificación, uno de los cuales lleva una modificación de biotina significa que una cadena de cada dúplex lleva una modificación de biotina. La inmovilización de las cadenas sobre una superficie de estreptavidina significa que la cadena no biotinilada puede eluirse simplemente mediante desnaturalización/separación de la cadena. Las construcciones eluidas estarán en forma de cadena sencilla y tras la exposición a condiciones de hibridación pueden usarse para hibridar contra los oligonucleótidos de captura inmovilizados, los cuales pueden extenderse.

[0042] En una realización particular, las moléculas de polinucleótido monocatenarias son moléculas de ADN. Más particularmente, las moléculas de polinucleótido monocatenarias representan moléculas de ADN genómico, o amplicones de las mismas, que incluyen tanto la secuencia del intrón como del exón (secuencia de codificación), así como secuencias reguladoras no codificantes, tales como secuencias de promotor y potenciador. Aún todavía más en particular, las moléculas de polinucleótido monocatenarias son moléculas de ADN genómico humano o amplicones de los mismos.

[0043] En una realización particular, las moléculas de ácido nucleico se pueden aislar de una muestra biológica que comprende una mezcla de diferentes organismos. Por ejemplo, la muestra puede contener o incluir una mezcla de diferentes bacterias o virus, tal como puede estar presente en las células, tejidos o fluidos de un organismo individual, que en ciertas realizaciones puede ser un ser humano u otro vertebrado. Con el fin de averiguar qué microbios están presentes en la muestra, se pueden secuenciar las regiones del 'microbioma' de la muestra específicas de bacterias, por ejemplo la región del gen del ARN ribosómico 16S de la muestra de ADN. Así, los

oligonucleótidos de amplificación o el oligonucleótido de captura pueden ser selectivos para una de las regiones constantes que se encuentran en la región del gen ARNr 16S de todas las bacterias o la región del gen 18S común a diferentes eucariotas.

5 **[0044]** Una realización del método descrito en la presente memoria se puede usar para seleccionar y formar grupos del gen ribosómico 16S bacteriano. Las bacterias adecuadas pueden incluir (pero no se pretende que se limiten a) *Acinetobacter baumannii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium beijerinckii*, *Deinococcus radiodurans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus gasseri*, *Listeria monocytogenes*, *Methanobrevibacter smithii*, *Neisseria meningitidis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas*
10 *aeruginosa*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pneumoniae*.

[0045] La muestra, por ejemplo, una muestra obtenida de intestino humano, heces, saliva o piel, puede tratarse para extraer el ácido nucleico presente en la muestra. El ácido nucleico total extraído de la muestra puede someterse a
15 fragmentación y puede ser puesto en contacto con un soporte sólido que lleva los oligonucleótidos de amplificación y captura como se describe en la presente memoria. Si los oligonucleótidos de captura individuales llevan una región de secuencia que es complementaria a una secuencia de genes compartida entre todas las bacterias, entonces los ácidos nucleicos bacterianos serán capturados, y los otros ácidos nucleicos, por ejemplo, ácidos nucleicos virales o humanos no. Los ácidos nucleicos bacterianos pueden ser amplificados para formar grupos. Las regiones variables
20 de los ácidos nucleicos capturados pueden ser detectadas, por ejemplo, por secuenciación. La secuencia de las regiones variables proporciona información que se puede utilizar para identificar las bacterias a partir de las que se obtuvieron. Tras la secuenciación de los grupos, la relación entre el número de dos o más bacterias en una muestra puede calcularse contando el número de veces que se obtiene una lectura de una secuencia particular entre los millones de grupos que existen sobre el soporte sólido.

25 **[0046]** La amplificación específica de la muestra bacteriana es posible si los oligonucleótidos de amplificación solo son complementarios con el ácido nucleico bacteriano. Los oligonucleótidos de captura se pueden modificar para seleccionar ácidos nucleicos a partir de una bacteria o un virus en particular. Se pueden utilizar múltiples oligonucleótidos de captura diferentes con el fin de optimizar la selección del ácido nucleico del organismo deseado.

30 **[0047]** Los oligonucleótidos de captura para la selección de regiones del gen 16S pueden contener las siguientes secuencias:

Nombre	Región	5' -3'	SEQ ID NO:
8F	Antes de V1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1
1542R	Después de V9	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	2
338F	Antes de V3	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	3
533R	Después de V3	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	4
967F	Antes de V6	MWACGCGARRAACCTTACC	5
1046R	Después de V6	CGACARCCATGCASCACCT	6

35 **[0048]** En la que M, W, R y S son los códigos de bases degenerados estándar (M = A y/o C, W = A y/o T, R = G y/o A y S = G y/o C).

[0049] Los oligonucleótidos de captura pueden estar unidos directamente a los oligonucleótidos de amplificación, por ejemplo, mediante la preparación de oligonucleótidos que contienen tanto oligonucleótidos de amplificación como de
40 captura en una única construcción y uniendo ésta a un soporte sólido. Como alternativa, los oligonucleótidos de captura se pueden preparar uniendo los oligonucleótidos de amplificación a un soporte e hibridando un oligonucleótido con una secuencia complementaria a la secuencia del oligonucleótido de captura y la secuencia del oligonucleótido de amplificación al oligonucleótido de amplificación. Los oligonucleótidos complementarios pueden actuar como moldes para la preparación de los oligonucleótidos de captura por extensión de los oligonucleótidos de
45 amplificación.

[0050] En una realización particular, una molécula de polinucleótido diana monocatenaria tiene dos regiones de secuencia conocida. Sin embargo, más particularmente, las regiones de secuencia conocida estarán en los extremos 5' y 3' de la molécula de polinucleótido monocatenaria de modo que la molécula de polinucleótido
50 monocatenaria será de la estructura:



[0051] Generalmente 'secuencia conocida I' y 'secuencia conocida II' comprenderá más de 20 o más de 40, o más
55 de 50, o más de 100 o más de 300 nucleótidos consecutivos. La longitud exacta de las dos secuencias puede o no

ser idénticas. Las secuencias de unión al cebador generalmente serán de secuencia conocida y, por lo tanto, particularmente serán complementarias con una secuencia dentro de la secuencia conocida I y secuencia conocida II de la molécula de polinucleótido monocatenaria. La longitud de las secuencias de unión al cebador no tiene que ser la misma que la que de la secuencia conocida I o II, y puede ser más corta, siendo particularmente 16-50 nucleótidos, más particularmente 16-40 nucleótidos y aún más particularmente 20-30 nucleótidos de longitud. La secuencia conocida I puede ser la misma que la secuencia conocida II o las dos pueden ser diferentes.

[0052] Los métodos de hibridación para la formación de dúplex estables entre secuencias complementarias por medio del apareamiento de Watson-Crick son conocidos en la técnica. Una región o parte de las moléculas de molde de polinucleótido monocatenario puede ser complementaria con al menos una parte de los oligonucleótidos de captura inmovilizados. La pluralidad de polinucleótidos de la muestra que no actúan como moldes debido a la no hibridación con los oligonucleótidos de captura puede ser retirada del soporte sólido, por ejemplo, por lavado o con otra forma de flujo de fluido. Puesto que los oligonucleótidos de amplificación o bien se modifican para evitar la hibridación y/o extensión, o no son complementarios con las cadenas molde, solo los oligonucleótidos de captura serán capaces de hibridación y extensión. A continuación puede llevarse a cabo una reacción de extensión en la que el oligonucleótido de captura se extiende mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar un producto de extensión que es una copia complementaria del polinucleótido molde monocatenario unido al soporte sólido a través del oligonucleótido de captura. La secuencia del polinucleótido molde monocatenario no inmovilizado en el soporte puede separarse de la secuencia complementaria en condiciones desnaturizantes y se elimina, por ejemplo por lavado. La distancia entre el oligonucleótido de captura individual en la superficie controla por lo tanto la densidad de los polinucleótidos molde monocatenarios y, por lo tanto, también controla la densidad de grupos formados más tarde en la superficie.

[0053] En realizaciones tales como la mostrada en la Figura 3, en las que los oligonucleótidos de cebador directo modificados se bloquean y no pueden extenderse, en general, todos los oligonucleótidos de amplificación hibridarán con los polinucleótidos molde monocatenarios. Cuando la reacción de extensión se lleva a cabo solamente los oligonucleótidos de captura directos no modificados se extienden por la adición secuencial de nucleótidos para generar una copia complementaria del polinucleótido molde monocatenario unido al soporte sólido a través del oligonucleótido de cebador directo no modificado. Las secuencias de polinucleótidos molde monocatenarios no hibridadas con el soporte pueden separarse de los oligonucleótidos cebadores directos bloqueados no extendidos en condiciones desnaturizantes y se eliminan, por ejemplo, por lavado con un desnaturizante químico tal como formamida. La distancia entre los oligonucleótidos del cebador directo no modificado individual en la superficie controla, por lo tanto, la densidad de los polinucleótidos molde monocatenarios y, por lo tanto, también controla la densidad de los grupos formados más tarde en la superficie.

[0054] Después de la unión de los polinucleótidos molde monocatenarios complementarios, los cebadores modificados/bloqueados se pueden tratar para revertir, suprimir o alterar la modificación de tal manera que se vuelven funcionalmente equivalentes a los oligonucleótidos de cebador directo no modificados. Por ejemplo, la estructura de cadena doble puede ser eliminada ya sea por desnaturización, por ejemplo, por calentamiento o tratamiento con una solución alcalina cuando se forma por un polinucleótido hibridado separado. De forma alternativa, cuando el polinucleótido hibridado está unido de forma covalente, podría usarse la digestión enzimática para escindir la cadena selectivamente de la secuencia, seguido de desnaturización. Tales métodos para la eliminación de la estructura de doble cadena son conocidos en la técnica y serán evidentes para el experto en la materia (Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)).

[0055] En una realización de la invención, la molécula de polinucleótido molde monocatenaria se puede unir al soporte sólido por ligación a cebadores bicatenarios inmovilizados en el soporte sólido usando procedimientos de ligación conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, *supra*). Tales métodos utilizan enzimas ligasa como la ADN ligasa para efectuar o catalizar la unión de los extremos de las dos cadenas de polinucleótidos, en este caso, la molécula de polinucleótido molde monocatenaria y el oligonucleótido cebador ligado de tal manera que se forman enlaces covalentes. En este contexto, 'unir' significa la unión covalente de dos cadenas de polinucleótidos que no han sido previamente unidas de forma covalente. Por lo tanto, un objetivo de ciertas realizaciones de la invención también se puede lograr modificando el extremo 3' de un subconjunto de oligonucleótidos cebadores de tal manera que no son capaces de ligar con los polinucleótidos molde monocatenarios. A modo de ejemplo no limitativo, la adición de 2'3'dideoxi AMP (dideoxi AMP) por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) evita eficazmente que la T4 ADN ligasa ligue entre sí las moléculas tratadas.

[0056] Un método alternativo sería tener los oligonucleótidos de captura como cadenas dúplex y los oligonucleótidos de amplificación como cadenas simples. Tras la ligadura de las cadenas individuales a los dúplex de captura (que sería la única especie inmovilizada que lleva un fosfato 5' libre), el extremo 3' de la cadena inmovilizada se puede extender como se describe anteriormente. Tras la desnaturización de la secuencia molde hibridada, la amplificación de la cadena inmovilizada puede proceder como se indica. Otros de estos métodos para la unión de cadenas individuales serán evidentes para los expertos en la técnica.

65

- [0057]** En una siguiente etapa de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, las condiciones adecuadas se aplican a la molécula de polinucleótido monocatenaria inmovilizada y la pluralidad de oligonucleótidos de amplificación de tal manera que la molécula de polinucleótido monocatenaria se hibrida con un oligonucleótido de amplificación para formar un complejo en la forma de una estructura en puente. Las condiciones adecuadas, tales como la neutralización y/o los tampones de hibridación son bien conocidas en la técnica (véase Sambrook et al., supra; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998)). A continuación, el tampón de neutralización y/o de hibridación puede retirarse.
- [0058]** A continuación, aplicando las condiciones adecuadas para la extensión se lleva a cabo una reacción de extensión. El oligonucleótido de amplificación del complejo se extiende por la adición secuencial de nucleótidos para generar un producto de extensión complementario con la molécula de polinucleótido monocatenaria. El dúplex resultante se inmoviliza en ambos extremos 5' de tal manera que cada cadena se inmoviliza.
- [0059]** Las condiciones adecuadas tales como tampones/soluciones de extensión que comprenden una enzima con actividad polimerasa son bien conocidas en la técnica (véase Sambrook et al., supra; Ausubel et al. supra). En una realización particular, los dNTP se pueden incluir en el tampón de extensión. En una realización adicional, los dNTP podrían añadirse antes del tampón de extensión. Esta técnica de amplificación en puente se puede llevar a cabo como se describe, por ejemplo, en los documentos US 7.115.400 y US 2005/0100900 A1.
- [0060]** Ejemplos de enzimas con actividad polimerasa que se pueden utilizar en la presente invención son la ADN polimerasa (fragmento de Klenow, ADN polimerasa de T4), ADN polimerasas termoestables de una variedad de bacterias termoestables (tales como ADN polimerasas Taq, VENT, Pfu, o Tfi), así como sus derivados modificados genéticamente (exo TaqGold, VENTexo, o Pfu). También se puede utilizar una combinación de ARN polimerasa y transcriptasa inversa para generar los productos de extensión. En particular, la enzima puede, en estas y otras realizaciones relacionadas tener una actividad de desplazamiento de cadena, más en particular la enzima puede ser activa a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, en particular a un de pH 7,9 a pH 8,8, aún más particularmente las enzimas son en ciertas realizaciones ejemplares Bst o Klenow.
- [0061]** Las moléculas de nucleósido trifosfato que se utilizan generalmente son desoxirribonucleótidos trifosfato, por ejemplo dATP, dTTP, dCTP, dGTP o son ribonucleósidos trifosfato, por ejemplo ATP, UTP, CTP, GTP. Las moléculas de nucleósido trifosfato pueden ser de origen natural o no natural.
- [0062]** Después de las etapas de hibridación y extensión, el soporte y los ácidos nucleicos unidos pueden someterse a condiciones de desnaturalización. Se puede utilizar una celda de flujo de tal manera que, el tampón de extensión se elimina generalmente por la afluencia del tampón de desnaturalización. Tampones desnaturalizantes adecuados son bien conocidos en la técnica (véase Sambrook et al., supra; Ausubel et al. supra). A modo de ejemplo, se sabe que las alteraciones en el pH y las soluciones de baja fuerza iónica pueden desnaturalizar los ácidos nucleicos a temperaturas sustancialmente isotérmicas. La formamida y la urea forman nuevos enlaces de hidrógeno con las bases de los ácidos nucleicos alterando los enlaces de hidrógeno que conducen al apareamiento de Watson-Crick. En una realización particular, la concentración de formamida es 50% o más. Esto da lugar a moléculas de ácido nucleico monocatenarias. Si se desea, las cadenas pueden separarse por tratamiento con una solución con contenido salino muy bajo (por ejemplo menos de unas condiciones catiónicas de 0,01 M) y pH alto (> 12) o mediante el uso de una sal caotrópica (por ejemplo, clorhidrato de guanidinio). En una realización particular se utiliza una base fuerte. Una base fuerte es un compuesto químico básico que es capaz de desprotonar ácidos muy débiles en una reacción ácido-base. La fuerza de una base se indica por su valor pK_b , los compuestos con valor pK_b de menos de aproximadamente 1 son llamados bases fuertes y son bien conocidos para un experto en la materia. En una realización particular, la base fuerte es una solución de hidróxido de sodio (NaOH) usada a una concentración de 0,05 M a 0,25 M, en particular 0,1 M.
- [0063]** Después de las etapas de hibridación, extensión y desnaturalización ilustradas anteriormente, estarán presentes dos ácidos nucleicos inmovilizados, conteniendo el primero una secuencia que es la misma que la de la primera molécula de polinucleótido monocatenaria molde (que se inmovilizó inicialmente) y siendo el segundo un ácido nucleico complementario con la misma, que se extiende desde uno de los oligonucleótidos de captura inmovilizados. Ambas cadenas inmovilizadas son capaces de iniciar nuevas rondas de amplificación sometiendo el soporte a ciclos adicionales de hibridación, extensión y desnaturalización. Por lo tanto la amplificación procede desde una sola cadena a un dúplex, un dúplex a dos dúplex, dos dúplex a cuatro dúplex etc. a lo largo de los ciclos de hibridación, extensión y desnaturalización.
- [0064]** Puede ser ventajoso llevar a cabo etapas de lavado opcionales entre cada etapa del método de amplificación. Por ejemplo, un tampón de extensión sin enzima polimerasa con o sin dNTP podría aplicarse al soporte sólido antes de ser eliminado y reemplazado con el tampón de extensión completo.
- [0065]** Tales nuevas rondas de amplificación se pueden utilizar para producir una colonia o 'grupo' de ácido nucleico que comprende múltiples copias inmovilizadas de la secuencia de polinucleótido monocatenario y su secuencia complementaria.

[0066] La inmovilización inicial de la molécula de polinucleótido molde significa que el producto de extensión puede hibridar con oligonucleótidos de amplificación situados a una distancia dentro de la longitud total de la molécula de polinucleótido molde. Otros cebadores unidos a la superficie que están fuera de su alcance no hibridarán con el producto de extensión. Por lo tanto, el límite de la colonia o grupo de ácido nucleico formado se limita a un área
5 relativamente local que rodea la ubicación en la que se inmovilizó la molécula de polinucleótido molde inicial.

[0067] De nuevo, las copias de la molécula de productos de extensión del polinucleótido y su complemento se han sintetizado mediante la realización de nuevas rondas de amplificación, es decir, rondas adicionales de hibridación, extensión y desnaturalización, de modo que el límite de la colonia o grupo de ácido nucleico que se genera será
10 capaz de ser ampliado aún más, aunque el límite de la colonia formada todavía se limita a un área relativamente local alrededor de la ubicación en la que se inmovilizó la molécula de polinucleótido monocatenaria inicial. Por ejemplo, el tamaño de cada grupo amplificado puede ser de 0,5-5 micrómetros y puede ser controlado por el número de ciclos realizados.

15 [0068] Por lo tanto, se puede ver que el método de la presente invención permite la generación de una pluralidad de colonias de ácidos nucleicos a partir de múltiples moléculas de polinucleótido monocatenarias inmovilizadas y que la densidad de estas colonias puede ser controlada mediante la alteración de las proporciones de los oligonucleótidos de captura/amplificación modificados usados para injertar la superficie del soporte sólido.

20 [0069] En una realización, las etapas de hibridación, extensión y desnaturalización se lleven a cabo a la misma temperatura, sustancialmente isotérmica. Por ejemplo la temperatura es de 37 ° C a aproximadamente 75 ° C, en particular de 50 ° C a 70 ° C, aún más particularmente de 60 ° C a 65 ° C. En una realización particular, la temperatura sustancialmente isotérmica puede ser la temperatura óptima para la polimerasa deseada.

25 [0070] En un aspecto particular, el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención se utiliza para preparar micromatrices agrupadas de colonias de ácidos nucleicos, análogas a las descritas en los documentos US-7.115.400, US 2005/0100900 A1, WO 00/18957 y WO 98/44151, mediante amplificación en fase sólida.

[0071] En otro aspecto más, en el soporte sólido se puede injertar más de un oligonucleótido de captura y más de
30 dos oligonucleótidos de amplificación, por ejemplo, al menos tres o cuatro o más, secuencias de oligonucleótidos de amplificación diferentes. De esta manera podría utilizarse más de una biblioteca, con secuencias comunes que difieren entre las bibliotecas, para preparar grupos, tales como, por ejemplo, bibliotecas preparadas a partir de dos pacientes diferentes. Como alternativa, se podrían amplificar regiones seleccionadas diferentes simultáneamente mediante el uso de diferentes oligonucleótidos de amplificación. Aunque los grupos se pueden solapar en el espacio,
35 se podrían secuenciar uno detrás del otro debido a las diferencias entre los extremos de los moldes. Por ejemplo, se pueden capturar dos muestras diferentes utilizando dos oligonucleótidos de captura diferentes. Estos pueden ser amplificados a partir de los mismos dos oligonucleótidos de amplificación. Las muestras pueden diferenciarse por los dos oligonucleótidos de captura diferentes, que pueden ser utilizados como los sitios para la hibridación de dos cebadores de secuenciación diferentes. El uso de diferentes oligonucleótidos de captura da lugar así a un método de
40 indexación de la muestra utilizando diferentes cebadores de secuenciación.

[0072] Las micromatrices agrupadas formadas por los métodos de la invención son adecuados para su uso en aplicaciones generalmente llevadas a cabo en micromatrices ordenadas tales como las micromatrices. Tales aplicaciones a modo de ejemplo no limitante incluyen análisis de hibridación, análisis de expresión génica, análisis
45 de unión a proteínas, secuenciación, genotipificación, análisis de metilación de ácidos nucleicos y similares. La micromatriz agrupada puede secuenciarse antes de utilizarse para aplicaciones posteriores tales como, por ejemplo, hibridación con ARN fluorescente o estudios de unión que utilizan proteínas fluorescentes.

Métodos de secuenciación

50 [0073] La invención también abarca métodos de secuenciación de ácidos nucleicos amplificados generados mediante amplificación en fase sólida. Así, la invención proporciona un método de secuenciación de ácido nucleico que comprende la amplificación de un grupo de moldes de ácido nucleico usando la amplificación en fase sólida como se ha descrito anteriormente y llevando a cabo una reacción de secuenciación de ácido nucleico para
55 determinar la secuencia de la totalidad o una parte de al menos una cadena de ácido nucleico amplificada producida en la reacción de amplificación en fase sólida.

[0074] La secuenciación se puede llevar a cabo usando cualquier técnica de secuenciación adecuada. Un método particularmente útil es aquel en el que los nucleótidos se añaden sucesivamente a un grupo hidroxilo 3', lo que tiene
60 como resultado la síntesis de una cadena de polinucleótido en la dirección 5' a 3'. La naturaleza del nucleótido añadido puede determinarse después de cada adición de nucleótidos o al final del proceso de secuenciación. Las técnicas de secuenciación que utilizan la secuenciación por ligación, en las que no todas las bases contiguas se secuencian y las técnicas tales como la secuenciación de firma masiva en paralelo (MPSS) donde las bases se eliminan de, en lugar de añadirse a las cadenas en la superficie, están también dentro del alcance de la invención.

65

[0075] El punto de iniciación para la reacción de secuenciación puede ser proporcionado por la hibridación de un cebador de secuenciación con un producto de la reacción de amplificación en fase sólida. A este respecto, uno o ambos de los adaptadores añadidos durante la formación de la biblioteca de moldes puede incluir una secuencia de nucleótidos que permite la hibridación de un cebador de secuenciación con los productos amplificados obtenidos de la totalidad del genoma o por amplificación en fase sólida de la biblioteca de moldes.

[0076] Los productos de las reacciones de amplificación en fase sólida en los que tanto los oligonucleótidos de amplificación directos como inversos se inmovilizan covalentemente sobre la superficie sólida son las llamadas estructuras 'en puente' formadas por hibridación de pares de cadenas de polinucleótidos inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, estando ambas cadenas unidas al soporte sólido en el extremo 5'. Las micromatrices que comprenden dichas estructuras en puente proporcionan moldes ineficientes para las técnicas de secuenciación típicas de los ácidos nucleicos, ya que la hibridación de un cebador de secuenciación convencional con una de las cadenas inmovilizadas no se ve favorecida en comparación con la hibridación de esta cadena con su cadena complementaria inmovilizada en condiciones estándar para la hibridación.

[0077] Con el fin de proporcionar más moldes adecuados para la secuenciación del ácido nucleico, puede ser ventajoso eliminar o desplazar sustancialmente la totalidad o al menos una parte de una de las cadenas inmovilizadas en la estructura 'en puente' a fin de generar un molde que es al menos parcialmente monocatenario. La parte del molde que es monocatenario estará disponible por tanto para la hibridación con un cebador de secuenciación. El proceso de eliminación de la totalidad o una porción de una cadena inmovilizada en una estructura 'en puente' bicatenaria puede denominarse en la presente memoria como 'linealización' y se describe con más detalle en el documento WO07010251 y US20090118128.

[0078] Las estructuras de molde en puente pueden ser linealizadas por escisión de una o ambas cadenas con una endonucleasa de restricción o mediante la escisión de una cadena con una endonucleasa con actividad de introducción de mellas (*nicking*). Se pueden utilizar otros métodos de escisión como una alternativa a las enzimas de restricción o enzimas, con actividad *nicking*, incluyendo entre otros, la escisión química (por ejemplo, la escisión de un enlace diol con peryodato), la escisión de los sitios abásicos por escisión con endonucleasa (por ejemplo, 'USER', suministrada por NEB, Ipswich, MA, EE.UU., número de artículo M5505S) o por exposición al calor o álcali, la escisión de ribonucleótidos incorporados en los productos de amplificación comprendidos de otro modo por desoxirribonucleótidos, la escisión fotoquímica o la escisión de un enlace peptídico.

[0079] Después de la etapa de escisión, independientemente del método utilizado para la escisión, el producto de la reacción de escisión puede ser sometido a condiciones de desnaturalización con el fin de eliminar la parte(s) de la cadena(s) escindida que no se une al soporte sólido. Las condiciones de desnaturalización adecuadas, por ejemplo, solución de hidróxido de sodio, solución de formamida o calor, serán evidentes para el lector experto con referencia a los protocolos estándar de biología molecular (Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra). La desnaturalización tiene como resultado la producción de un molde de secuenciación que es parcialmente o sustancialmente monocatenario. A continuación puede iniciarse una reacción de secuenciación por hibridación de un cebador de secuenciación con la porción monocatenaria del molde.

[0080] Por lo tanto, la invención abarca métodos en los que la reacción de secuenciación del ácido nucleico comprende hibridar un cebador de secuenciación con una región monocatenaria de un producto de amplificación linealizado, incorporar secuencialmente uno o más nucleótidos en una cadena de polinucleótido complementaria con la región de cadena molde amplificada a secuenciar, identificar la base presente en uno o más de los nucleótidos incorporados y determinar de esta manera la secuencia de una región de la cadena molde.

[0081] Un método de secuenciación que se puede utilizar de acuerdo con la invención se basa en el uso de nucleótidos modificados que tienen bloques 3' extraíbles, por ejemplo, como se describe en los documentos WO04018497, US 2007/0166705A1 y US7057026. Una vez que el nucleótido modificado se ha incorporado en la cadena del polinucleótido en crecimiento complementaria con la región del molde a secuenciar ya no hay ningún grupo 3'-OH libre disponible para dirigir la extensión de la secuencia y por lo tanto la polimerasa no puede añadir más nucleótidos. Una vez que se ha determinado la naturaleza de la base incorporada en la cadena en crecimiento, el bloque 3' se puede retirar para permitir la adición del siguiente nucleótido sucesivo. Mediante la ordenación de los productos derivados usando estos nucleótidos modificados, es posible deducir la secuencia de ADN del molde de ADN. Tales reacciones se pueden realizar en un solo experimento si cada uno de los nucleótidos modificados tiene un marcador diferente unido a los mismos, y que se sabe que corresponde a la base particular, para facilitar la discriminación entre las bases añadidas durante cada etapa de incorporación. Como alternativa, se puede llevar a cabo una reacción separada que contiene cada uno de los nucleótidos modificados por separado.

[0082] Los nucleótidos modificados pueden llevar un marcador para facilitar su detección. Se puede usar un marcador fluorescente, por ejemplo, para la detección de nucleótidos modificados. Cada tipo de nucleótidos puede así llevar un marcador fluorescente diferente, por ejemplo, como se describe en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N.º 60/801.270 (Colorantes novedosos y el uso de sus conjugados marcados), publicada como WO07135368. El marcador detectable, sin embargo, no tiene que ser un marcador fluorescente. Se puede usar

cualquier marcador que permita la detección de un nucleótido incorporado.

[0083] Un método para la detección de nucleótidos marcados con fluorescencia comprende el uso de luz láser de una longitud de onda específica para los nucleótidos marcados, o el uso de otras fuentes adecuadas de iluminación.

5 La fluorescencia del marcador en el nucleótido puede ser detectada por una cámara CCD u otros medios de detección adecuados. La instrumentación adecuada para la grabación de imágenes de las micromatrices agrupadas se describe en Solicitud Provisional de los Estados Unidos N.º 60/788,248 (Sistemas y dispositivos de secuencia por análisis de la síntesis), publicada como WO07123744.

10 **[0084]** La invención no está destinada a limitarse al uso del método de secuenciación descrito anteriormente, ya que se puede usar esencialmente cualquier metodología de secuenciación que se basa en la incorporación sucesiva de nucleótidos en una cadena de polinucleótido. Técnicas alternativas adecuadas incluyen, por ejemplo, Pyrosequencing™, FISSEQ (secuenciación fluorescente in situ), MPSS y secuenciación por métodos basados en la ligadura, por ejemplo como se describe en el documento US6306597.

15

[0085] La muestra de ácido nucleico se puede analizar adicionalmente para obtener una segunda lectura desde el extremo opuesto del fragmento. La metodología para la secuenciación de ambos extremos de un grupo se describe en las solicitudes pendientes de tramitación WO07010252, PCTGB2007/003798 y US 20090088327. En un ejemplo, la serie de etapas se puede realizar de la siguiente manera; generar grupos, linealizar, hibridar el primer cebador de

20 secuenciación y obtener la primera lectura de secuenciación. El primer cebador de secuenciación se puede eliminar y en los casos en los que una secuencia de etiqueta está presente en el grupo, se hibrida un segundo cebador y se secuencia la etiqueta. La cadena de ácido nucleico puede ser a continuación 'invertida' en la superficie sintetizando una copia complementaria de los restantes cebadores inmovilizados utilizados en la amplificación del grupo. Este proceso de resíntesis de la cadena regenera el grupo de doble cadena. La cadena del molde original se puede
25 eliminar para linealizar la cadena resintetizada que luego se puede hibridar con un cebador de secuenciación y secuenciarse en un segundo o tercer ciclo de secuenciación.

[0086] En los casos en los que se emplea la resíntesis de la cadena, ambas cadenas pueden inmovilizarse en la superficie de una manera que permita la liberación posterior de una porción de la cadena inmovilizada. Esto se

30 puede lograr a través de una serie de mecanismos como se describe en los documentos WO07010251 y US20090118128. Por ejemplo, un cebador puede contener un nucleótido uracilo, lo que significa que la cadena se puede escindir en la base uracilo usando las enzimas uracilo glicosilasa (UDG) que elimina la base de nucleósido y la endonucleasa VIII que escinde el nucleótido abásico. Esta combinación de enzimas está disponible como USER™ de New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, EE.UU., número de artículo M5505). El segundo cebador puede
35 comprender un nucleótido 8-oxoguanina, que se puede escindir a continuación con la enzima FPG (NEB número de artículo M0240). Este diseño de cebadores permite controlar cuál es el cebador que se escinde y en qué punto del proceso y también en qué lugar del grupo se produce la escisión. Los cebadores también pueden modificarse químicamente, por ejemplo, con una modificación disulfuro o diol que permite la escisión química en lugares específicos.

40

Celdas de flujo

[0087] La invención se refiere también a celdas de flujo para la preparación de micromatrices de ácidos nucleicos amplificados en el que las celdas de flujo contienen un recubrimiento uniforme de tres, cuatro o más cebadores

45 inmovilizados. Así, un sustrato descrito en la presente memoria puede estar dentro o formando parte de una celda de flujo y los métodos presentados en este documento pueden llevarse a cabo en una celda de flujo. Al contrario de las micromatrices de dos canales de múltiples secuencias, los tres, cuatro o más oligonucleótidos se pueden revestir sobre la totalidad de la superficie de la micromatriz en lugar de en lugares discretos que comprenden secuencias diferentes en cada pequeña localización. Las micromatrices pueden tener un tamaño de 1 cm² o más, donde el 1
50 cm² completo o mayor comprende un recubrimiento homogéneo de múltiples copias de las mismas tres, cuatro o más secuencias. Una celda de flujo se puede distinguir de una 'micromatriz de dos canales' o micromatriz sintetizada fotolitográficamente debido al hecho de que los oligonucleótidos están unidos a toda la superficie; parte superior, parte inferior, las paredes y los extremos de la cámara de la celda de flujo, en lugar de ser una micromatriz que está montado en una carcasa. Sin embargo, si se desea, una celda de flujo que se utiliza en un método presentado en la
55 presente memoria puede tener superficies con diferente reactividad para los oligonucleótidos de tal manera que los oligonucleótidos solamente están unidos a uno o un subconjunto de las superficies antes mencionadas o incluso a solo un subconjunto de regiones dentro de estas superficies.

[0088] La celda de flujo puede en ciertas realizaciones estar revestida con tres especies de oligonucleótidos de

60 diferente composición de la secuencia, a saber, dos oligonucleótidos de amplificación y un oligonucleótido de captura. La celda de flujo puede en ciertas realizaciones estar recubierta con no más de las tres especies de oligonucleótidos. Sin embargo, en otras formas de realización particulares, la celda de flujo puede incluir además una o más de otras especies de oligonucleótidos, bien un oligonucleótido de amplificación, oligonucleótido de
65 concentración menor que el oligonucleótido de amplificación, por ejemplo, al menos a una concentración relativa

100, 1.000 o 100.000 veces menor. Los dos oligonucleótidos de amplificación pueden estar presentes en proporciones similares entre sí, por ejemplo, variando en menos de un factor de dos. Los oligonucleótidos de captura pueden ser más largos que los oligonucleótidos de amplificación, y pueden comprender la región de la secuencia de amplificación del oligonucleótido más una región de oligonucleótido de captura, como se muestra por ejemplo en la
 5 Figura 1. Alternativa o adicionalmente, los oligonucleótidos de amplificación pueden ser bloqueados para evitar la hibridación y/o extensión. La secuencia de los oligonucleótidos de captura puede ser diferente entre diferentes oligonucleótidos de captura. En ciertas realizaciones relacionadas pero distintas, la celda de flujo puede estar revestida con al menos cuatro especies de oligonucleótidos que tienen secuencias diferentes, en las que al menos una primera y una segunda de las cuatro especies están presentes a una densidad más baja que la tercera y cuarta
 10 de las cuatro especies. Por ejemplo, la primera y segunda especie pueden ser oligonucleótidos de captura y la tercera y cuarta especie pueden ser oligonucleótidos de amplificación. Por lo tanto, en las realizaciones descritas anteriormente y en otras formas de realización relacionadas que se contempla, un soporte sólido puede llevar dos o más oligonucleótidos de captura de diferentes secuencias. La secuencia de los oligonucleótidos de captura puede permitir la selección de una parte conocida de la muestra de ácido nucleico. Las secuencias de captura se pueden
 15 producir mediante la extensión de algunas o todas de las secuencias de amplificación.

[0089] Aunque la invención se ha ilustrado en la presente memoria para realizaciones que utilizan especies de ácidos nucleicos, se entenderá que los mismos principios se pueden aplicar a otras especies moleculares. Por ejemplo, las superficies de los sustratos se pueden derivatizar con otras moléculas sintéticas, tales como péptidos,
 20 ligandos de moléculas pequeñas, sacáridos o similares. Mediante el control de la cantidad de diferentes especies de tales moléculas en la etapa de derivatización, se puede conseguir una densidad deseada de cada especie. Las muestras de moléculas que se unen a una o más de estas moléculas en fase sólida se pueden utilizar sin necesidad de titulación de las muestras ya que la densidad de las moléculas de la muestra que se unen a las superficies será controlada por la densidad de sus parejas de unión en la superficie. De acuerdo con ello, la unión de moléculas de la
 25 muestra puede ser controlada termodinámicamente en un proceso que se deja proceder hasta el equilibrio en lugar de un proceso cinético que requiere un control más preciso de las condiciones de reacción y de los tiempos de incubación. Una vez unidas a la superficie, las moléculas de la muestra se pueden modificar o detectar posteriormente. En tales realizaciones, la superficie puede incluir moléculas sintéticas modificadas de forma reversible de tal manera que la alteración o eliminación de la modificación puede permitir que las moléculas de la
 30 muestra sean modificadas o detectadas por un ensayo analítico o etapa particular.

[0090] Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle con fines de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la materia a partir de una lectura de esta descripción que se pueden hacer varios cambios en forma y detalle sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y
 35 aparatos descritos anteriormente pueden utilizarse en varias combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0091]

40 <110> Illumina, Inc.
 <120> MÉTODOS PARA SELECCIONAR Y AMPLIFICAR POLINUCLEÓTIDOS
 45 <130> ILU090802PEP
 <160> 6
 <170> BiSSAP 1.0
 50 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol = "ADN"
 60 /nota = "Oligonucleótido sintético"
 /organismo = "Secuencia artificial"
 <400> 1
 agagtttgat cctggctcag 20
 65

5
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol = "ADN"
 /nota = "Oligonucleótido sintético"
 /organismo = "Secuencia artificial"

10
 <400> 2
 aaggaggtga tccagccgca 20

15
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /tipo_mol = "ADN"
 /nota = "Oligonucleótido sintético"
 /organismo = "Secuencia artificial"

25
 <400> 3
 actcctacgg gaggcagcag 20

30
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol = "ADN"
 /nota = "Oligonucleótido sintético"
 /organismo = "Secuencia artificial"

40
 <400> 4
 ttaccgggc tgctggcac 19

45
 <210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol = "ADN"
 /nota = "Oligonucleótido sintético"
 /organismo = "Secuencia artificial"

55
 <400> 5
 mwacgcgarr aaccttacc 19

60
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

<221> fuente

<222> 1..19

<223> /tipo_mol = "ADN"

5 /nota = "Oligonucleótido sintético"

/organismo = "Secuencia artificial"

<400> 6

10 cgacarccat gcascacct 19

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección y amplificación de polinucleótidos en un soporte sólido, que comprende:
 - 5 a) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de amplificación inmovilizados en un soporte sólido;
 - b) hibridar una población de sondas oligonucleotídicas con un subconjunto de dichos oligonucleótidos de amplificación, comprendiendo cada una de dichas sondas oligonucleotídicas una primera porción que es complementaria a los oligonucleótidos de amplificación y una segunda porción que comprende la secuencia de una región seleccionada de un polinucleótido plantilla;
 - 10 c) realizar una reacción de extensión para extender los oligonucleótidos de amplificación hibridados para producir una población de oligonucleótidos de captura unidos al soporte, comprendiendo cada oligonucleótido de captura en dicha población una secuencia que es complementaria a una región seleccionada de un polinucleótido plantilla, proporcionando de esta manera un soporte sólido que comprende la población de oligonucleótidos de captura unidos al soporte y una población de oligonucleótidos de amplificación no extendidos;
 - 15 d) aplicar una población de polinucleótidos plantilla al soporte sólido en condiciones tales que los polinucleótidos plantilla hibridan selectivamente con los oligonucleótidos de captura unidos al soporte, en el que los polinucleótidos plantilla comprenden una secuencia adaptadora en el extremo 5', en el que la secuencia adaptadora es la misma que la secuencia de los oligonucleótidos de amplificación no extendidos;
 - 20 e) extender los oligonucleótidos de captura unidos al soporte que se hibridan con los polinucleótidos plantilla, generando de ese modo productos de extensión, teniendo los productos de extensión una porción complementaria con los polinucleótidos molde y una porción complementaria a los oligonucleótidos de amplificación no extendidos; y
 - 25 f) amplificar los productos de extensión, en donde la amplificación comprende la hibridación de uno o más de los oligonucleótidos de amplificación no extendidos con uno o más de los productos de extensión, produciendo de esta manera un producto de amplificación en fase sólida.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
 - 30 g) secuenciar una primera cadena del producto de amplificación en fase sólida de la etapa f) para obtener al menos parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido plantilla.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dichos productos de amplificación en fase sólida comprenden un sitio de unión para un cebador de secuenciación universal.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los oligonucleótidos de captura comprenden al menos 10 secuencias de captura diferentes.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los oligonucleótidos de amplificación, que no se hibridan con una sonda oligonucleotídica en la etapa b) de la reivindicación 1, se bloquean de forma reversible durante la extensión de los oligonucleótidos de captura.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el bloqueo reversible es mediante una especie química unida a un extremo 3' de los oligonucleótidos de amplificación.
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la especie química es un grupo fosfato.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la amplificación es isotérmica.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la porción de los productos de extensión complementaria a los oligonucleótidos de amplificación no extendidos comprende una secuencia adaptadora.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los polinucleótidos plantilla en la muestra de ácido nucleico comprenden secuencias diferentes y la secuencia de adaptador es la misma para cada uno de los polinucleótidos plantilla.
- 55 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de oligonucleótidos de amplificación comprende cada uno una secuencia común que es complementaria con la secuencia adaptadora que es la misma para cada uno de los polinucleótidos plantilla.

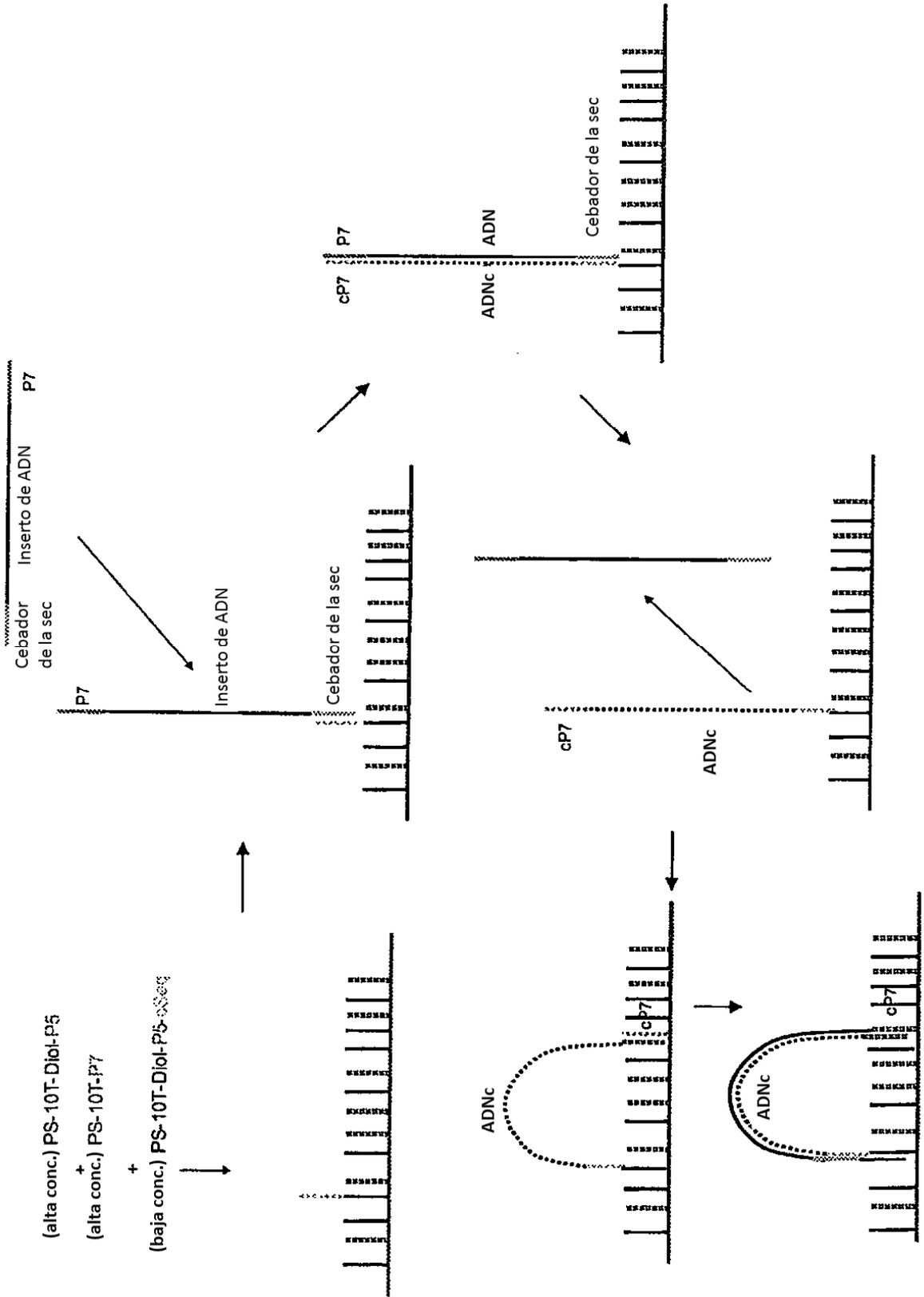


Fig 1

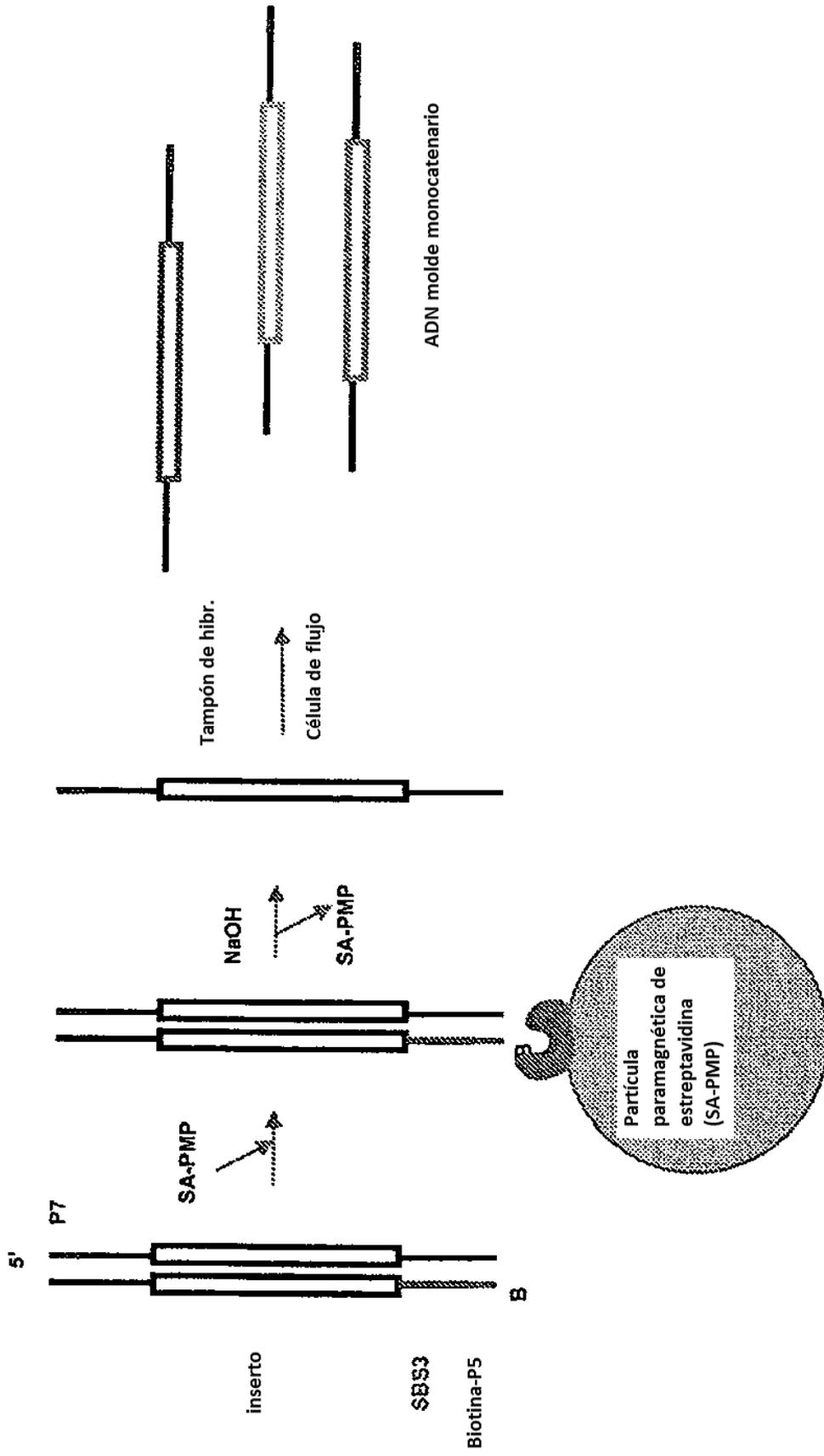


Fig 2

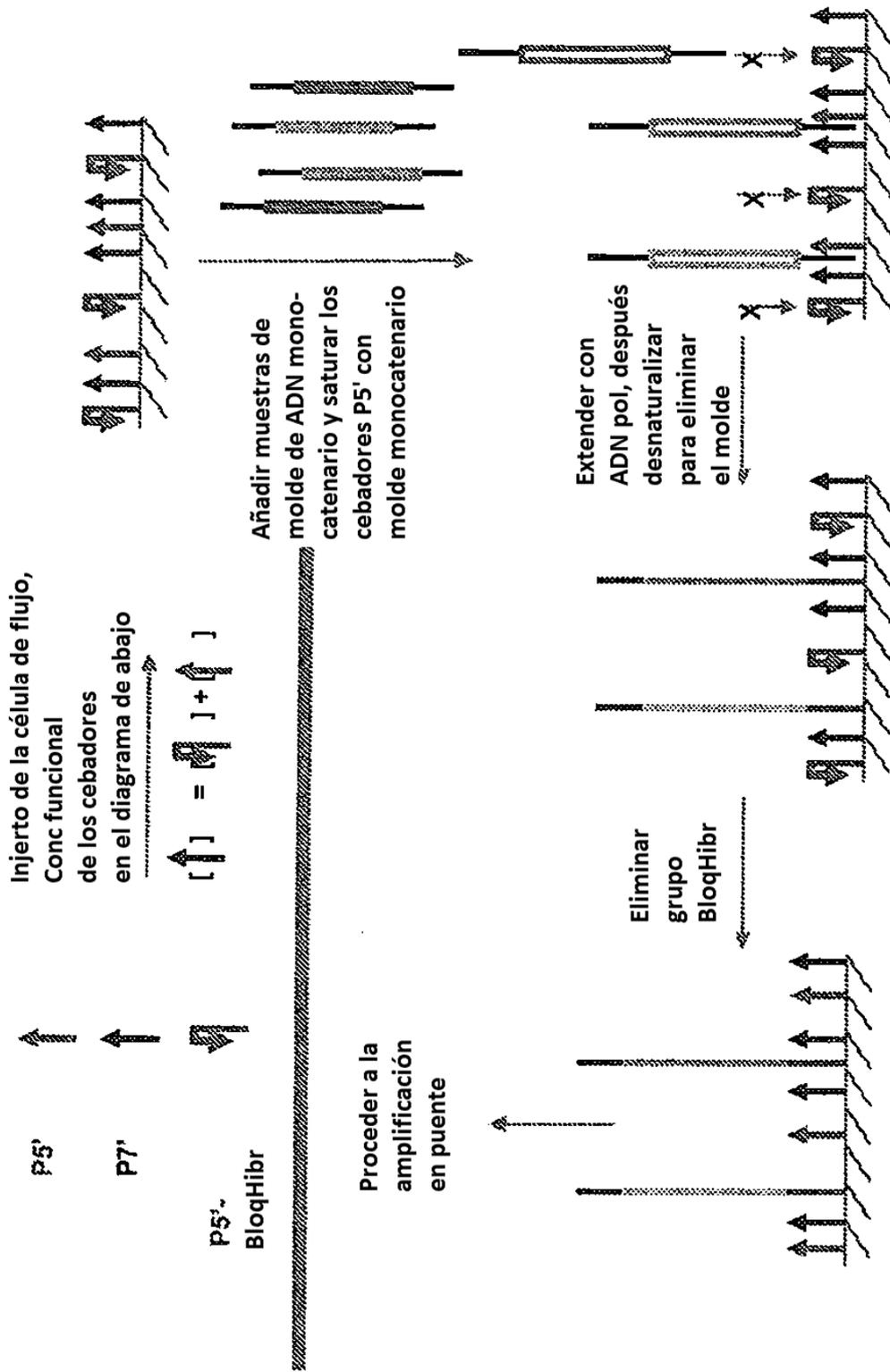


Fig 3

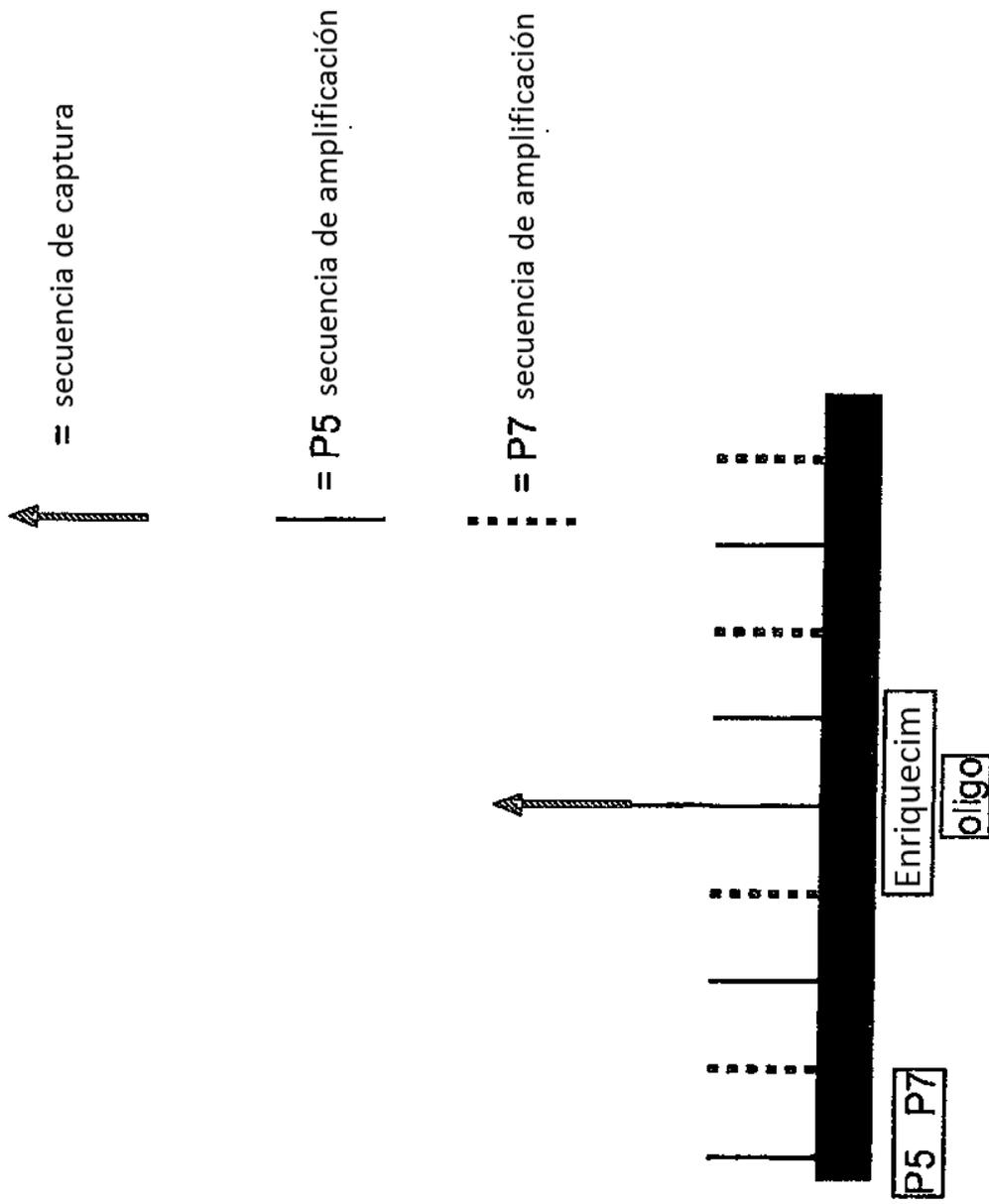


Fig 4

2. Construcción de la biblioteca

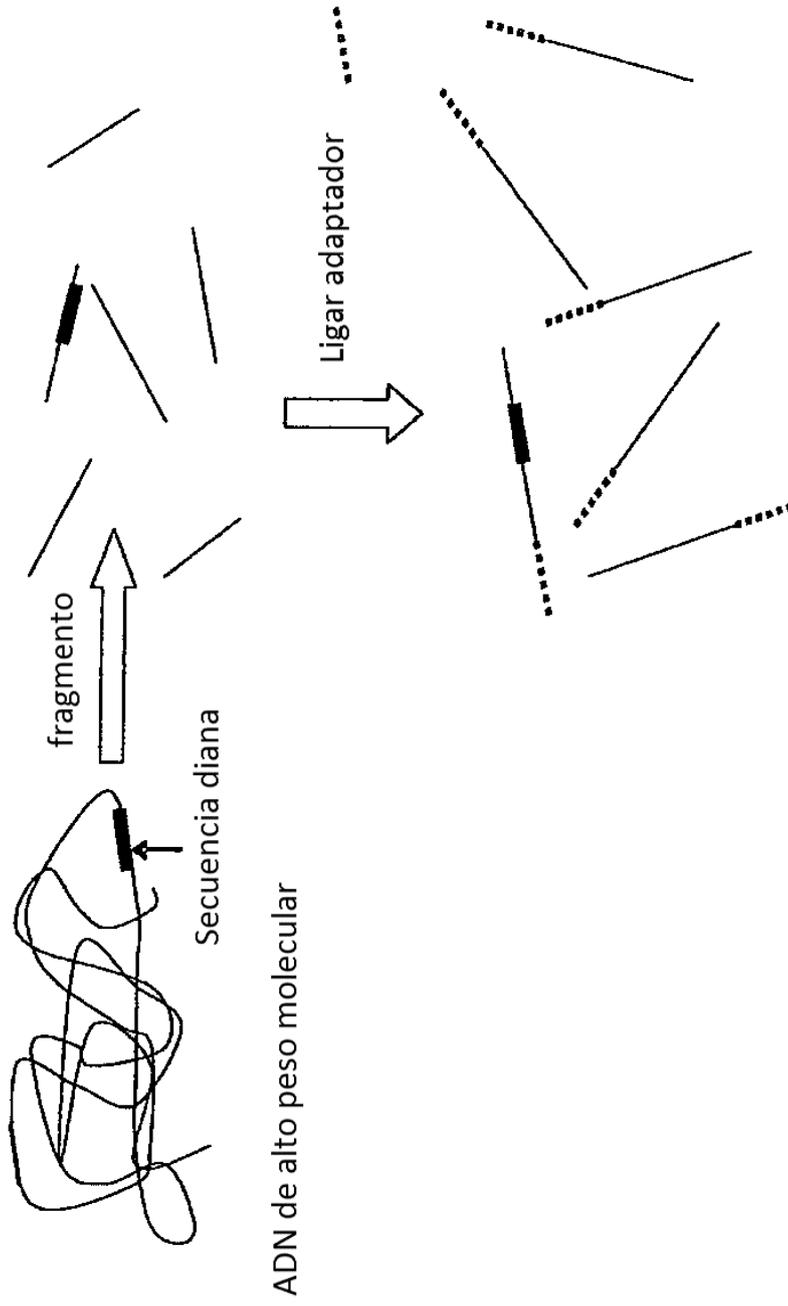


Fig 5

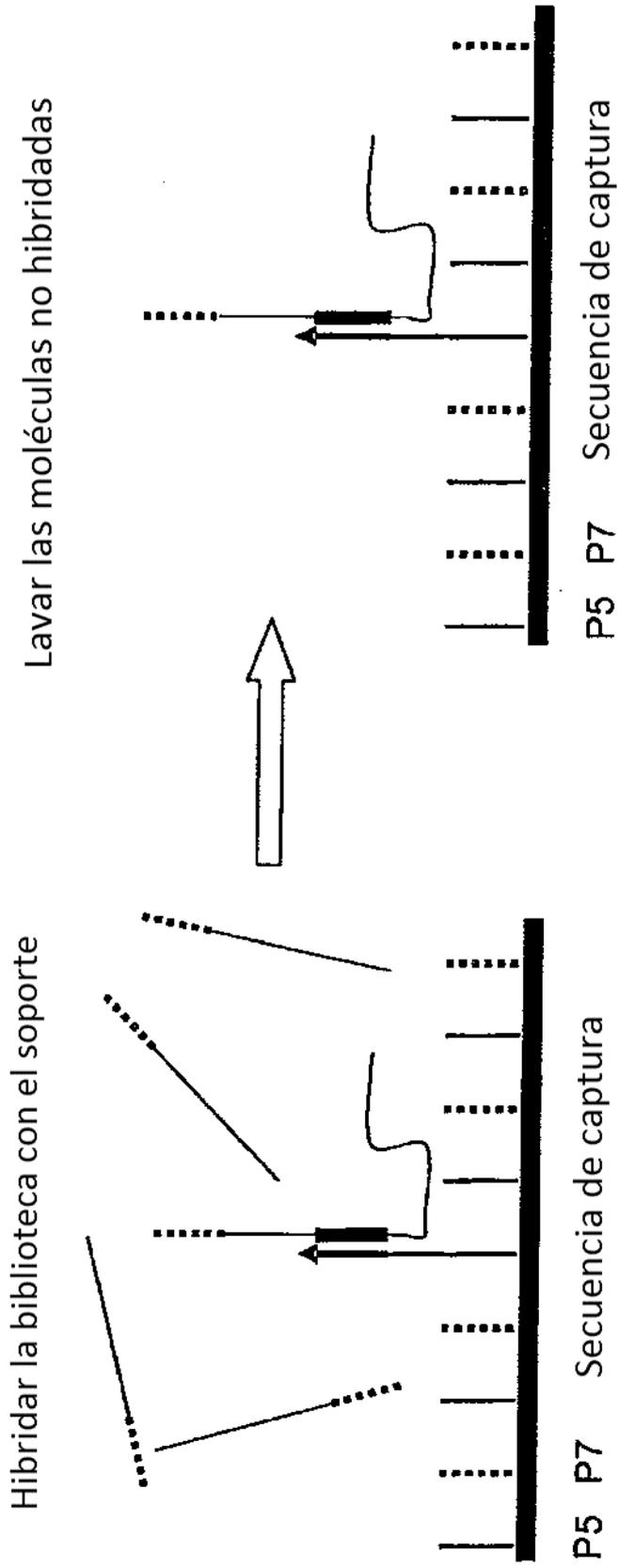


Fig 6

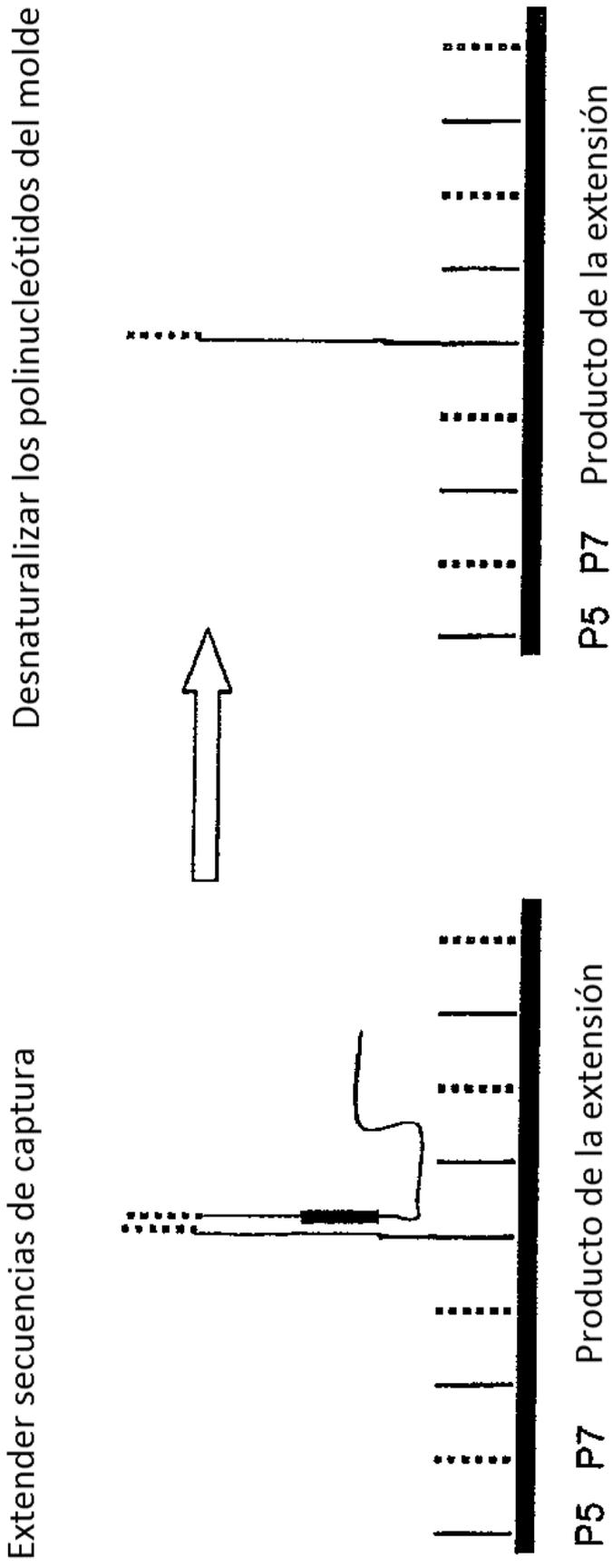


Fig 7

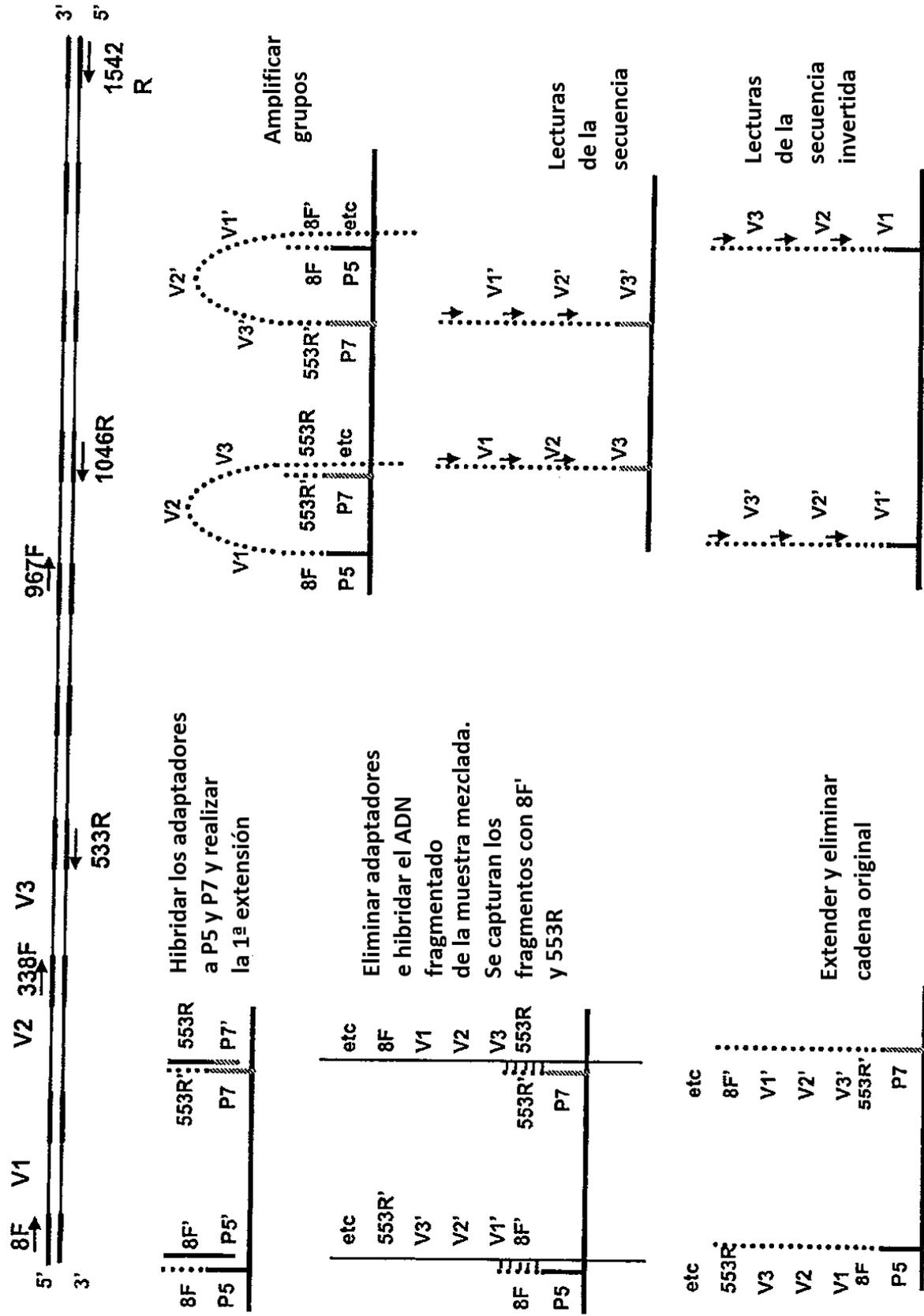


Fig 8