

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 262**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

C12Q 1/6834 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2014 PCT/IB2014/000610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2014 E 14728620 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2943589**

54 Título: **Métodos y soportes sólidos para la preparación de muestras utilizando transposomas**

30 Prioridad:

09.01.2013 US 201361750682 P

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

08.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GORMLEY, NIALL, ANTHONY y
SMITH, GEOFFREY, PAUL**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 699 262 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y soportes sólidos para la preparación de muestras utilizando transposomas

5 **Antecedentes**

Existe una diversidad de métodos y aplicaciones para los cuales es deseable generar una biblioteca de moléculas de ADN fragmentadas o marcadas a partir de moléculas diana de ADN bicatenario (ADNbc). A menudo, el propósito es generar moléculas de ADN más pequeñas (por ejemplo, fragmentos de ADN) a partir de moléculas de ADNbc más grandes para su uso como moldes en las reacciones de secuenciación de ADN.

Muchos de los métodos actualmente utilizados para la fragmentación y, marcaje de ADN bicatenario para su uso en la secuenciación de próxima generación derrochan el ADN, requieren instrumentos caros para la fragmentación, y los procedimientos para la fragmentación, marcaje y recuperación de los fragmentos de ADN marcados son difíciles, tediosos, laboriosos, llevan mucho tiempo, son ineficaces, costosos, requieren cantidades relativamente grandes de ácidos nucleicos muestra. Además, muchos de estos métodos generan fragmentos de ADN marcados que no son completamente representativos de las secuencias contenidas en los ácidos nucleicos muestra a partir de los que se han generado. Por tanto, en la técnica existe necesidad de métodos que proporcionen velocidad y facilidad de uso a la hora de generar bibliotecas de fragmentos de ADN marcados a partir de ADN diana y que pueden aplicarse fácilmente a métodos de análisis de ácido nucleico tales como métodos de amplificación y secuenciación de próxima generación.

El documento WO 2012/1106546 A2 desvela métodos que incluyen el tratamiento de una secuencia de ADN diana con una transposasa dando como resultado uno o más acontecimientos de fragmentación o inserción; la adición e inserción de una o más secuencias de reconocimiento a la secuencia de ADN diana (i) durante el tratamiento con la transposasa de (ii) durante una amplificación posterior; la secuenciación del ADN tratado; y la captura de la información de contigüidad identificando secuencias de ADN diana o secuencias de reconocimiento que tienen una propiedad compartida.

El documento WO 2010/048605 A1 desvela métodos, composiciones y kits para el uso de una transposasa y un extremo de transposón para la generación de fragmentación extensa y marcaje 5' de ADN diana bicatenario *in vitro*, utilizando después una ADN polimerasa para la generación de fragmentos de ADN monocatenarios marcados en 5' y 3' sin realizar una reacción de amplificación por PCR, en donde el primer marcador en el extremo 5' muestra la secuencia del extremo de transposón transferido y, opcionalmente, una secuencia arbitraria adicional, y el segundo marcador en los extremos 3' muestra una secuencia diferente de la secuencia mostrada por el primer marcador.

El documento WO 2012/103545 A1 desvela un método para la adición de uno o más marcadores al producto bicatenario de una reacción de tagmentación. El método implica proporcionar un ácido nucleico diana bicatenario y un transposoma que tiene una transposasa con dos secuencias de extremos de transposones: una "cadena transferida" y una "cadena no transferida". El transposoma degrada el ácido nucleico diana en fragmentos transfiriendo al mismo tiempo de manera covalente la cadena transferida a una primera cadena del fragmento; la cadena no transferida del transposoma permanece hibridada con la cadena transferida.

Adey *et al.* desvela un método de secuenciación con bisulfito de todo el genoma basándose en la tagmentación de entrada ultrabaja en Genome Research, 22:1139-1143, 2012.

El documento US 2012/0530630 A1 desvela un método para la secuenciación de moléculas de polinucleótidos. El método incluye las etapas de proporcionar una pluralidad de moléculas de polinucleótidos unidas a una superficie, en donde una primera parte de cada molécula de polinucleótido está unida a una primera localización de la superficie y una segunda parte de cada molécula de polinucleótido está unida a una segunda localización de la superficie, estando correlacionadas la proximidad relativa de las primera y segunda localizaciones con la probabilidad de que las primera y segunda partes estén emparejadas, separar las primera y segunda partes de las moléculas de polinucleótidos en la superficie, determinar las secuencias de las primera y segunda partes de las moléculas de polinucleótidos y comparar las proximidades relativas y las secuencias para determinar qué partes primera y segunda están emparejadas y determinar la secuencia de las moléculas de polinucleótido diana.

Breve resumen

En el presente documento se presentan métodos y composiciones para la preparación de muestras de ácido nucleico en un soporte sólido. Los métodos y las composiciones se refieren especialmente a métodos y composiciones de fragmentación y marcaje de ADN utilizando composiciones de transposón inmovilizadas en un soporte sólido. Los métodos y composiciones presentados en el presente documento son útiles, por ejemplo, para la generación de bibliotecas de fragmentos de ADN marcados para su uso, por ejemplo, en métodos de secuenciación de próxima generación y similares. En algunas realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a la preparación de fragmentos de ADNmc lineal en un soporte sólido a partir de ADN diana que comprende cualquier

ADNbc de interés (incluyendo ADNc bicatenario preparado a partir de ARN) de cualquier fuente, para el análisis genómico, subgenómico, transcriptómico o metagenómico, o para análisis de expresión de ARN.

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, en el presente documento se presentan métodos como se define en las reivindicaciones de preparación de una biblioteca inmovilizada de fragmentos de ADN marcados que comprenden: a) proporcionar un soporte sólido que tenga complejos de transposomas inmovilizados en el mismo en donde los complejos de transposomas comprenden una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el primer polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador y b) aplicar un ADN diana al soporte sólido en condiciones mediante las cuales el ADN diana se fragmenta por los complejos de transposoma, y la secuencia de extremo de transposón 3' del primer polinucleótido se transfiere a un extremo 5' de al menos una cadena de los fragmentos; produciendo de este modo una biblioteca inmovilizada de fragmentos bicatenarios en donde al menos una cadena está marcada en 5' con el primer marcador. Los complejos de transposoma comprenden un segundo polinucleótido que comprende una región complementaria de dicha secuencia de extremo de transposón. Los métodos pueden comprender adicionalmente (c) proporcionar complejos de transposoma en solución y poner en contacto los complejos de transposomas con los fragmentos inmovilizados en condiciones mediante las cuales el ADN diana se fragmenta mediante los complejos de transposomas en solución; obteniendo de este modo fragmentos de ácido nucleico inmovilizados que tienen un extremo en solución. En algunas realizaciones, los complejos de transposoma en solución pueden comprender un segundo marcador, de modo que el método genere fragmentos de ácido nucleico inmovilizados que tienen un segundo marcador, el segundo marcador en solución. Los primer y segundo marcadores pueden ser diferentes o iguales.

En el presente documento también se presentan soportes sólidos como se define en las reivindicaciones que tienen una biblioteca de fragmentos de ADN marcados inmovilizados en los mismos preparados según los métodos anteriores u otros métodos. Por ejemplo, en el presente documento se presentan soportes sólidos que tienen complejos de transposomas inmovilizados en los mismos, en donde los complejos de transposomas comprenden una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador.

También se desvelan en el presente documento métodos de generación de una celda de flujo, que comprenden inmovilizar una pluralidad de complejos de transposomas en un soporte sólido, comprendiendo los complejos de transposomas una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el primer polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador.

Los métodos pueden comprender adicionalmente proporcionar un soporte sólido que tenga una pluralidad de los primeros polinucleótidos inmovilizados en los mismos y poner en contacto el soporte sólido con una holoenzima transposasa y un segundo polinucleótido, comprendiendo el segundo polinucleótido una región complementaria de la secuencia de extremo de transposón. En algunos métodos, la inmovilización comprende (a) proporcionar un soporte sólido que tenga cebadores de amplificación acoplados con el mismo; (b) hibridar un segundo polinucleótido con uno de los cebadores de amplificación, comprendiendo el segundo oligonucleótido una región complementaria a una secuencia de extremo de transposón y una región complementaria del primer marcador; (c) extender el cebador de amplificación utilizando una polimerasa para generar un dúplex que comprende el primer polinucleótido hibridado con el segundo polinucleótido, el primer polinucleótido inmovilizado directamente en el soporte sólido; y (d) poner en contacto el soporte sólido con una holoenzima transposasa, ensamblando de este modo un complejo de transposoma en el soporte sólido.

En el presente documento también se desvela una población de micropartículas que tienen complejos de transposomas inmovilizados en las mismas, comprendiendo los complejos de transposoma una transposasa unida a un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en donde el primer polinucleótido está inmovilizado en su extremo 5' en la superficie de la micropartícula y el segundo polinucleótido está hibridado en el extremo 3' del primer polinucleótido; y en donde el primer polinucleótido comprende: (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador. En el presente documento también se presentan métodos de producción de una biblioteca inmovilizada de fragmentos de ADN marcados que comprenden poner en contacto un ADN diana con la población anterior de micropartículas para generar fragmentos de ADN marcados inmovilizados.

En el presente documento también se desvelan métodos para la generación de una biblioteca de fragmentos de ADN marcados para ensamblaje directo indexado en una lectura de secuencia más larga, comprendiendo el método: proporcionar una población de micropartículas que tenga complejos de transposomas inmovilizados en las mismas, comprendiendo los complejos de transposoma una transposasa unida a un primer polinucleótido que comprende un dominio de índice asociado con la micropartícula y un segundo polinucleótido; aplicar un ADN diana a la población de micropartículas, generando de este modo fragmentos de ADN inmovilizados que están marcados con el dominio índice. En los métodos anteriores, el primer polinucleótido puede inmovilizarse en su extremo 5' en la superficie de la micropartícula y el segundo polinucleótido puede hibridarse con el extremo 3' del primer polinucleótido; y en donde el

primer polinucleótido comprende: (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) el dominio índice; y en donde la población de micropartículas comprende al menos una pluralidad de dominios índice y en donde los primeros polinucleótidos en una micropartícula individual comparten el mismo dominio índice.

5 En el presente documento también se desvela un método para la secuenciación de una pluralidad de moléculas de ADN diana, que comprende: aplicar una pluralidad de ADN diana a un soporte sólido que tiene complejos de transposomas inmovilizados en el mismo en condiciones mediante las cuales el ADN diana se fragmenta mediante los complejos de transposomas; produciendo de este modo una biblioteca inmovilizada de fragmentos bicatenarios, en donde una primera parte de cada ADN diana está unida a dicho soporte sólido en una primera localización en
10 dicho soporte sólido y una segunda parte de cada ADN diana está unida a dicho soporte sólido en una segunda localización en dicho soporte sólido; y mapear dicha biblioteca inmovilizada de fragmentos bicatenarios para generar un conjunto de localizaciones que están unidas mediante cada ADN diana; determinar las secuencias de dichas primera y segunda partes del ADN diana, y correlacionar dicho conjunto de localizaciones para determinar qué partes primera y segunda están unidas mediante dicho ADN diana y determinar la secuencia de las moléculas de
15 ADN diana.

En algunas realizaciones de los métodos y composiciones presentadas en el presente documento, los complejos de transposomas están presentes en el soporte sólido a una densidad de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 complejos por mm^2 . En algunas realizaciones, el complejo de transposoma comprende una transposasa hiperactiva, tal como
20 transposasa Tn5.

En algunas realizaciones de los métodos y composiciones presentadas en el presente documento, el dominio de marcador puede comprender, por ejemplo, una región para una amplificación por grupos. En algunas realizaciones, el dominio de marcador puede comprender una región para cebar una reacción de secuenciación.
25

En algunas realizaciones de los métodos y composiciones presentadas en el presente documento, el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, micropartículas, una superficie en patrón, pocillos y similares. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas se distribuyen al azar sobre el soporte sólido. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas se distribuyen en una superficie en patrón.
30

Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1a muestra el concepto general según una realización. La Figura 1b muestra el concepto general según una realización.

La Figura 2a es un esquema que ilustra una reacción de tagmentación.

La Figura 2b es un esquema con el enlace resultante redibujado para aclarar la naturaleza del enlace resultante.

40 La Figura 3a ilustra una realización en la que se ensamblan dos formas de transposoma en la superficie de una celda de flujo. La adición de ADN a la celda de flujo da como resultado la tagmentación y el acoplamiento del ADN a los transposomas. Además, en la Figura 3a se muestran diferentes tipos de grupos resultantes: grupos P7:P7, P5:P5 y P5:P7. La Figura 3b ilustra una realización en donde dos formas de transposomas están ensambladas en la superficie de una celda de flujo.

45 La Figura 4a ilustra otra realización. En la Figura 4a, se presenta solo una forma de transposoma unido a superficie (por ejemplo, transposoma P5), dando como resultado enlaces que tienen la misma secuencia de marcador en cada extremo. Se añaden transposomas adicionales para fragmentar adicionalmente las estructuras de enlace e incorporar una secuencia de marcador adicional (P7).

La Figura 4b muestra amplificación para generar pares de grupos resultantes de cada extremo truncado de transposoma que representan dos fragmentos adyacentes en la muestra de ADN intacta original (Figura 4b).

50 Las Figuras 5a, 5b, 5c y 5d ilustran diferentes métodos para el ensamblaje de complejos de transposomas unidos a superficie. La Figura 5a muestra una realización de este método para ensamblar los complejos de transposomas unidos a superficie. La Figura 5b muestra que los complejos de transposomas se ensamblan en solución y la inmovilización comprende una etapa adicional de ligar el primer polinucleótido a un oligonucleótido de refuerzo acoplado al soporte sólido. La Figura 5c muestra que un dímero de transposoma se ensambla hibridando un oligonucleótido en bucle con un primer polinucleótido inmovilizado. La Figura 5d muestra complejos de transposomas que pueden ensamblarse en una celda de flujo de extremos emparejados con cebadores de amplificación inmovilizados en la misma.

La Figura 6a expone el diseño de un experimento expuesto en el Ejemplo 1. La Figura 6b expone el diseño de un experimento expuesto como Ejemplo 1.
60

La Figura 7 expone datos representativos obtenidos en un experimento realizado según el diseño expuesto en el Ejemplo 1.

La Figura 8 expone datos representativos obtenidos en un experimento realizado según el diseño expuesto en el Ejemplo 1.

65 La Figura 9 es una ilustración del ensamblaje de transposomas unidos a perlas y posterior tagmentación según

una realización.

La Figura 10 es una ilustración del ensamblaje de transposomas unidos a perlas y posterior tagmentación según una realización.

5 La Figura 11 es una ilustración del ensamblaje de transposomas unidos a perlas y posterior tagmentación según una realización.

La Figura 12 es una ilustración del ensamblaje de transposomas unidos a perlas y posterior tagmentación según una realización.

La Figura 13 es una ilustración de transposomas unidos a superficie según una realización.

10 La Figura 14 es una ilustración de la tagmentación realizada en transposomas unidos a perlas según una realización.

La Figura 15 es una ilustración de la tagmentación y código de barras de subfragmentos realizados en transposomas unidos a perlas según una realización.

La Figura 16 es una ilustración de la tagmentación y código de barras de subfragmentos realizados en transposomas unidos a perlas según una realización.

15 La Figura 17 es una ilustración de un ensamblaje de transposomas como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 18a es una ilustración de un ensamblaje de transposomas como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 18b expone resultados utilizando ensamblaje de transposomas como se describe en el Ejemplo 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 Los protocolos actuales para secuenciar muestras de ácido nucleico emplean habitualmente un proceso de preparación de muestras que convierte ADN o ARN en una biblioteca de moldes. Estos métodos pueden dar como resultado pérdida de muestra de ADN y con frecuencia requieren instrumentos caros para fragmentación. Además, los métodos de preparación de muestras son con frecuencia difíciles, tediosos e ineficaces.

25 En métodos de preparación de muestras convencionales, cada molde contiene un adaptador en uno de los extremos del inserto y con frecuencia son necesarias varias etapas tanto para modificar el ADN o el ARN como para purificar los productos deseados de las reacciones de modificación. Estas etapas se realizan en solución antes de la adición de los fragmentos adaptados a una celda de flujo donde se acoplan a la superficie mediante una reacción de extensión de cebadores que copia el fragmento hibridado en el extremo de un cebador unido covalentemente a la superficie. Estos moldes de "siembra" dan lugar después a grupos monoclonales de moldes copiados mediante varios tipos de amplificación.

30 El número de etapas necesarias para transformar ADN en moldes modificados por adaptador en solución listos para formación de grupos y secuenciación puede minimizarse mediante el uso de fragmentación mediada por transposasa y marcaje. Este proceso, denominado en el presente documento "tagmentación", con frecuencia implica la modificación de ADN mediante un complejo de transposoma que comprende enzima transposasa en complejo con adaptadores que comprenden secuencia de extremo de transposón. La tagmentación da como resultado la fragmentación simultánea del ADN y ligamiento de los adaptadores a los extremos 5' de ambas cadenas de fragmentos bicatenarios. Después de una etapa de purificación para retirar la enzima transposasa, se añaden secuencias adicionales a los extremos de los fragmentos adaptados mediante PCR.

35 La tagmentación basada en solución tiene desventajas y requiere varias etapas laboriosas. Adicionalmente, se puede introducir un sesgo durante etapas de amplificación de PCR. Los métodos y composiciones presentados en el presente documento superan las desventajas y permiten que se produzca preparación de muestras sin sesgo, formación de grupos y secuenciación en un único soporte sólido con requisitos mínimos para manipulación o transferencia de muestras.

40 La presente divulgación se refiere al descubrimiento sorprendente de que los complejos de transposoma pre-acoplados a la superficie de una celda de flujo pueden fragmentar, marcar e inmovilizar eficazmente ADN intacto dentro de la celda de flujo. En realizaciones específicas, una o más de las cadenas que comprenden los adaptadores de transposoma se unen a la superficie de la celda de flujo a través de su extremo 5'. Cuando se bombea ADN intacto en la celda de flujo, la reacción de tagmentación se produce de la misma manera que sucede en las reacciones de tagmentación basadas en solución, pero los fragmentos producto resultantes están físicamente unidos a la superficie de la celda de flujo por sus extremos. Las secuencias adaptadoras de transposoma pueden contener secuencias que permiten la posterior generación y secuenciación de grupos.

45 Los métodos y composiciones presentados en el presente documento proporcionan varias ventajas con respecto a métodos de tagmentación basados en solución. Por ejemplo, puede cargarse molde de ADN intacto purificado, parcialmente purificado o incluso no purificado directamente en una celda de flujo para la generación de grupos, sin preparación de muestras previa. Además, la contigüidad de información de secuencia en el ADN intacto original puede conservarse físicamente mediante la yuxtaposición de fragmentos tagmentados en la superficie de la celda de flujo. Como una ventaja adicional, el ADN está ligado físicamente a la superficie de la celda de flujo de modo que pueda conseguirse purificación de reactivos después de manipulación adicional del ADN mediante intercambio de 50 tampón de flujo continuo en el canal de la celda de flujo.

Tagmentación en un soporte sólido

De acuerdo con lo anterior, se presentan en el presente documento métodos como se definen en las reivindicaciones para preparar una biblioteca inmovilizada de fragmentos de ADN marcados. Los métodos comprenden: (a) proporcionar un soporte sólido que tenga complejos de transposomas inmovilizados en el mismo, en donde los complejos de transposomas comprenden una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el primer polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador; y (b) aplicar un ADN diana al soporte sólido en condiciones por las que el ADN diana se fragmente mediante los complejos de transposomas, y la secuencia de extremo de transposón 3' del primer polinucleótido se transfiere a un extremo 5' de al menos una cadena de los fragmentos; produciendo de este modo una biblioteca inmovilizada de fragmentos bicatenarios en donde al menos una cadena está marcada en 5' con el primer marcador.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo de transposoma" se refiere en general a una enzima transposasa unida de forma no covalente con un ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, el complejo puede ser una enzima transposasa preincubada con ADN de transposón bicatenario en condiciones que sustentan la formación de complejos no covalentes. El ADN de transposón bicatenario puede incluir, sin limitación, ADN de Tn5, una parte de ADN de Tn5, una composición de extremo de transposón, una mezcla de composiciones de extremos de transposones u otros ADN bicatenarios capaces de interactuar con una transposasa tal como la transposasa Tn5 hiperactiva.

Una "transposasa" significa una enzima que es capaz de formar un complejo funcional con una composición que contiene extremos de transposones (por ejemplo, transposones, extremos de transposones, composiciones de extremos de transposones) y catalizar la inserción o transposición de la composición que contiene extremos de transposones en el ADN diana bicatenario con el que se incuba, por ejemplo, en una reacción de transposición *in vitro*. Una transposasa como se presenta en el presente documento también puede incluir integrasas de retrotransposones y retrovirus. Las transposasas, transposomas y complejos de transposomas son conocidos en general por los expertos en la materia, como se ejemplifica en la divulgación del documento US 2010/0120098. Aunque muchas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a transposasa Tn5 y/o transposasa Tn5 hiperactiva, se apreciará que puede usarse en la presente invención cualquier sistema de transposición que sea capaz de insertar un extremo de transposón con suficiente eficacia para marcar en 5' y fragmentar un ADN diana para su fin pretendido. En realizaciones particulares, un sistema de transposición preferido es capaz de insertar el extremo de transposón de una manera aleatoria o casi aleatoria para marcar en 5' y fragmentar el ADN diana.

La expresión "extremo de transposón" se refiere a un ADN de ácido nucleico bicatenario que muestra solamente las secuencias de nucleótidos (las "secuencias de extremos de transposones") que son necesarias para formar el complejo con la enzima transposasa o integrasa que es funcional en una reacción de transposición *in vitro*. En algunas realizaciones, un extremo de transposón es capaz de formar un complejo funcional con la transposasa en una reacción de transposición. Como ejemplos no limitantes, los extremos de transposones pueden incluir el extremo de transposón extremo externo ("EE") de 19 pb, extremo de transposón extremo interno ("EI") o extremo de transposón "extremo mosaico" ("EM") reconocido por una transposasa Tn5 mutante o de tipo silvestre, o el extremo de transposón R1 y R2 como se expone en la divulgación del documento US 2010/0120098. Los extremos de transposones pueden comprender cualquier ácido nucleico o análogo de ácido nucleico adecuado para formar un complejo funcional con la enzima transposasa o integrasa en una relación de transposición *in vitro*. Por ejemplo, el extremo de transposón puede comprender ADN, ARN, bases modificadas, bases no naturales, cadena principal modificada y pueden comprender muescas en una o ambas cadenas. Aunque el término "ADN" se usa a lo largo de la presente divulgación en relación con la composición de extremos de transposones, debería entenderse que puede utilizarse cualquier ácido nucleico o análogo de ácido nucleico adecuado en un extremo de transposón.

La expresión "cadena transferida" se refiere a la parte transferida de ambos extremos del transposón. De forma similar, la expresión "cadena no transferida" se refiere a la parte no transferida de ambos "extremos del transposón". El extremo 3' de una cadena transferida se une o se transfiere a ADN diana en una reacción de transposición *in vitro*. La cadena no transferida, que muestra una secuencia de extremo de transposón que es complementaria de la secuencia de extremo de transposón transferida, no se une o transfiere al ADN diana en una reacción de transposición *in vitro*.

En algunas realizaciones, la cadena transferida y cadena no transferida se unen de forma covalente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las secuencias de cadena transferida y no transferida se proporcionan en un único oligonucleótido, por ejemplo, en una configuración en horquilla. Así, aunque el extremo libre de la cadena no transferida no se une con el ADN diana directamente mediante la reacción de transposición, la cadena no transferida se une al fragmento de ADN de forma indirecta, debido a que la cadena no transferida se une a la cadena transferida mediante el bucle de la estructura en horquilla. Pueden encontrarse ejemplos adicionales de estructura de transposoma y métodos para preparar y usar transposomas en la divulgación del documento US 2010/0120098.

Las expresiones “marcador” y “dominio de marcador” como se usan en el presente documento se refieren a una parte o dominio de un polinucleótido que muestra una secuencia para un fin o una aplicación pretendidos deseados. Algunas realizaciones presentadas en el presente documento incluyen un complejo de transposoma que comprende un polinucleótido que tiene una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y marcador que
 5 comprende un dominio de marcador. Los dominios de marcadores pueden comprender cualquier secuencia proporcionada para cualquier fin deseado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un dominio de marcador comprende uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción. En algunas realizaciones, un dominio de marcador comprende una o más regiones adecuadas para hibridación con un cebador para una reacción de amplificación de grupo. En algunas realizaciones, un dominio marcador comprende una o más regiones
 10 adecuadas para hibridación con un cebador para una reacción de secuenciación. Se apreciará que puede incorporarse cualquier otro elemento adecuado en un dominio de marcador. En algunas realizaciones, el dominio de marcador comprende una secuencia que tiene una longitud de entre 5 y 200 pb. En algunas realizaciones, el dominio de marcador comprende una secuencia que tiene una longitud de entre 10 y 100 pb. En algunas realizaciones, el dominio de marcador comprende una secuencia que tiene una longitud de entre 20 y 50 pb. En algunas realizaciones, el dominio de marcador comprende una secuencia que tiene una longitud de entre 5, 6, 7, 8,
 15 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 y 200 pb.

En los métodos y composiciones presentados en el presente documento, los complejos de transposomas se inmovilizan en el soporte sólido. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas se inmovilizan en el
 20 soporte mediante uno o más polinucleótidos, tales como un polinucleótido que comprende una secuencia de extremo de transposón. En algunas realizaciones, el complejo de transposoma puede inmovilizarse mediante una molécula enlazadora que acopla la enzima transposasa al soporte sólido. En algunas realizaciones, tanto la enzima transposasa como el polinucleótido se inmovilizan en el soporte sólido. Cuando se hace referencia a la inmovilización de moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) en un soporte sólido, los términos “inmovilizado” y
 25 “unido” se usan indistintamente en el presente documento y se entiende que ambos términos abarcan unión directa o indirecta, covalente o no covalente, a no ser que se indique de otro modo, bien de forma explícita o bien por contexto. En determinadas realizaciones de la invención puede preferirse la unión covalente, pero en general solo es necesario que las moléculas (por ejemplo ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas en el soporte en las condiciones en las que se pretende usar el soporte, por ejemplo en aplicaciones que requieren amplificación y/o
 30 secuenciación de ácidos nucleicos.

Determinadas realizaciones de la invención pueden hacer uso de soportes sólidos que comprenden un sustrato o matriz inerte (por ejemplo portaobjetos de vidrio, perlas poliméricas, etc.) que se ha funcionalizado, por ejemplo mediante la aplicación de una capa o recubrimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que
 35 permiten la unión covalente con biomoléculas, tales como polinucleótidos. Los ejemplos de dichos soportes incluyen, pero sin limitación, hidrogeles de poli(acrilamida) apoyados en una sustancia inerte tal como vidrio, particularmente hidrogeles de poli(acrilamida) como se describe en los documentos WO 2005/065814 y US 2008/0280773. En dichas realizaciones, las biomoléculas (por ejemplo polinucleótidos) pueden unirse de forma covalente directamente con el material intermedio (por ejemplo el hidrogel) pero el material intermedio puede en sí mismo unirse de forma no
 40 covalente con el sustrato o la matriz (por ejemplo el sustrato de vidrio). Debe interpretarse en consecuencia que la expresión “unión covalente con un soporte sólido” abarca ese tipo de disposición.

Las expresiones “superficie sólida”, “soporte sólido” y otros equivalentes gramaticales en el presente documento se refieren a cualquier material que sea apropiado para o pueda modificarse para ser apropiado para la unión de los
 45 complejos de transposoma. Como apreciarán los expertos en la materia, el número de posibles sustratos es muy grande. Los posibles sustratos incluyen, pero sin limitación, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, cerámicas, resinas, sílice o materiales basados en sílice incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas,
 50 y una diversidad de otros polímeros. En un aparato de celda de flujo se localizan soportes sólidos y superficies sólidas particularmente útiles para algunas realizaciones. Se exponen en más detalle posteriormente celdas de flujo ejemplares.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una superficie en patrón adecuada para la inmovilización de
 55 complejos de transposomas en un patrón ordenado. Una “superficie en patrón” se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un soporte sólido. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser elementos en los que están presentes uno o más complejos de transposomas. Los elementos pueden separarse por regiones intersticiales cuando no estén presentes complejos de transposomas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser un formato de x-y de elementos que están en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición repetida de elementos y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición aleatoria de elementos y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas se distribuyen aleatoriamente sobre el soporte sólido. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas se distribuyen en una superficie en patrón. Las superficies en patrón ejemplares que pueden usarse en los métodos y composiciones expuestos en el presente documento se describen
 65 en el N.º de Serie de los Estados Unidos 13/661.524 o Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos

N.º 2012/0316086 A1.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una serie de pocillos o depresiones en una superficie. Este puede fabricarse como se conoce en general en este campo usando una diversidad de técnicas incluyendo, pero sin limitación, fotolitografía, técnicas de estampación, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica usada dependerá de la composición y forma del sustrato de la matriz.

La composición y geometría del soporte sólido puede variar con su uso. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una estructura plana tal como un portaobjetos, chip, microchip y/o matriz. Así, la superficie de un sustrato puede estar en forma de una capa plana. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una o más superficies de una celda de flujo. La expresión "celda de flujo" como se usa en el presente documento se refiere a una cámara que comprende una superficie sólida a través de la que pueden hacerse fluir uno o más reactivos líquidos. Los ejemplos de celdas de flujo y sistemas fluidos relacionados y plataformas de detección que pueden usarse fácilmente en los métodos de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en Bentley *et al.*, Nature 456:53-59 (2008), documentos WO 04/018497; US 7.057.026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7.329.492; US 7.211.414; US 7.315.019; US 7.405.281 y US 2008/0108082.

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

No es necesario que las perlas sean esféricas; pueden usarse partículas irregulares. Como alternativa o adicionalmente, las perlas pueden ser porosas. Los tamaños de las perlas varían de nanómetros, es decir 100 nm, a milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones pueden usarse perlas mayores o menores.

Las Figuras 1a y 1b ilustran en general el método según una realización. Se muestra un soporte sólido recubierto con oligonucleótidos injertados, algunos de los cuales contienen las secuencias de ME, que formarán complejos de transposomas activos que estén acoplados físicamente con el soporte sólido en presencia de Tn5. La densidad de estos transposomas unidos a superficie puede modularse variando la densidad de los oligonucleótidos injertados que contienen la secuencia de ME o por la cantidad de transposasa añadida al soporte sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los complejos de transposomas están presentes en el soporte sólido a una densidad de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 o al menos 10^6 complejos por mm^2 .

Cuando se añade ADN bicatenario al soporte sólido, los complejos de transposomas tagmentarán ADN añadido, generando de este modo fragmentos bc acoplados en ambos extremos a la superficie. En algunas realizaciones, la longitud de fragmentos unidos puede variarse cambiando la densidad de los complejos de transposomas en la superficie. En determinadas realizaciones, la longitud de los fragmentos unidos resultantes es menor de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1100 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1600 pb, 1700 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2000 pb, 2100 pb, 2200 pb, 2300 pb, 2400 pb, 2500 pb, 2600 pb, 2700 pb, 2800 pb, 2900 pb, 3000 pb, 3100 pb, 3200 pb, 3300 pb, 3400 pb, 3500 pb, 3600 pb, 3700 pb, 3800 pb, 3900 pb, 4000 pb, 4100 pb, 4200 pb, 4300 pb, 4400 pb, 4500 pb, 4600 pb, 4700 pb, 4800 pb, 4900 pb, 5000 pb, 10000 pb, 30000 pb o menor de 100.000 pb. En algunas realizaciones, los fragmentos unidos pueden después amplificarse en grupos usando química de grupos convencional, como se ejemplifica por la divulgación de Patentes de los Estados Unidos N.º 7.985.565 y 7.115.400.

En algunas realizaciones, la longitud de los moldes es mayor de lo que se puede amplificar convenientemente usando química de grupos convencional. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la longitud de los moldes es mayor de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb, 1100 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1600 pb, 1700 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2000 pb, 2100 pb, 2200 pb, 2300 pb, 2400 pb, 2500 pb, 2600 pb, 2700 pb, 2800 pb, 2900 pb, 3000 pb, 3100 pb, 3200 pb, 3300 pb, 3400 pb, 3500 pb, 3600 pb, 3700 pb, 3800 pb, 3900 pb, 4000 pb, 4100 pb, 4200 pb, 4300 pb, 4400 pb, 4500 pb, 4600 pb, 4700 pb, 4800 pb, 4900 pb, 5000 pb, 10000 pb, 30000 pb o mayor de 100.000 pb. En dichas realizaciones, entonces puede realizarse una segunda reacción de tagmentación añadiendo transposomas de solución que fragmentan adicionalmente los enlaces, como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 4a. La segunda reacción de tagmentación puede por lo tanto retirar el tramo interno de los enlaces, dejando extremos truncados cortos anclados a la superficie que pueden convertirse en grupos listos para etapas de secuenciación adicionales. En realizaciones particulares, la longitud del molde puede estar dentro de un intervalo definido por un límite superior e inferior seleccionado de los ejemplificados

anteriormente.

- Antes de la generación de grupos, pueden capturarse imágenes del ADN inmovilizado por tagmentación en superficie. Por ejemplo, el ADN inmovilizado puede teñirse con un colorante intercalante y capturar imágenes para conservar un registro de la posición de la cadena principal de la molécula de ADN en la superficie. Después de la generación y secuenciación de grupos, las coordenadas de grupos pueden asociarse con su posición en la cadena principal original, ayudando de este modo al alineamiento de lecturas a lo largo de un ensamblaje de molécula y genoma.
- 10 La etapa de aplicación de un ADN diana puede comprender añadir una muestra biológica a dicho soporte sólido. La muestra biológica puede ser cualquier tipo que comprenda ADN y que pueda depositarse en la superficie sólida para tagmentación. Por ejemplo, la muestra puede comprender ADN en una diversidad de estados de purificación, incluyendo ADN purificado. Sin embargo, no es necesario que la muestra esté completamente purificada y puede comprender, por ejemplo, ADN mezclado con proteína, otra especie de ácido nucleico, otros componentes celulares y/o cualquier otro contaminante. Como se demuestra en el Ejemplo 2 posterior, la muestra biológica comprende una mezcla de ADN, proteína, otras especies de ácido nucleico, otros componentes celulares y/o cualquier otro contaminante presente en aproximadamente la misma proporción que se encuentra *in vivo*. Por ejemplo, los componentes pueden encontrarse en la misma proporción que se encuentra en una célula intacta. La muestra biológica puede tener una relación 260/280 de menos de 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 o menos de 0,60. La muestra biológica puede tener una relación 260/280 de al menos 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7 o al menos 0,60. Debido a que los métodos proporcionados en el presente documento permiten que el ADN se una con un soporte sólido, pueden retirarse otros contaminantes únicamente lavando el soporte sólido después de que se produzca la tagmentación unida a superficie. La muestra biológica puede comprender, por ejemplo, un lisado de células en bruto o células completas. Por ejemplo, un lisado de células en bruto que se aplica a un soporte sólido en un método expuesto en el presente documento no necesita haberse sometido a una o más de las etapas de separación que se usan tradicionalmente para aislar ácidos nucleicos de otros componentes celulares. Se exponen etapas de separación ejemplares en Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, 1989, y *Short Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, *et al.*
- 15
- 20
- 25
- 30 Por lo tanto, la muestra biológica puede comprender, por ejemplo, sangre, plasma, suero, linfa, moco, esputo, orina, semen, líquido cefalorraquídeo, aspirado bronquial, heces y tejido macerado, o un lisado de los mismos, o cualquiera otra muestra biológica de ensayo que comprenda ADN. Una ventaja de los métodos y composiciones presentados en el presente documento es que puede añadirse una muestra biológica a la celda de flujo y las etapas de lisis y purificación posteriores pueden producirse todas en la celda de flujo sin etapas de transferencia o manipulación adicionales, simplemente haciendo fluir los reactivos necesarios a la celda de flujo. Los Ejemplos 1 y 2 posteriores demuestran la aplicación con éxito de lisados celulares en bruto a los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento.
- 35
- Las Figuras 2a y 2b ilustran adicionalmente la reacción de tagmentación según una realización. Como se muestra en la Figura 2a, los transposomas comprenden un dímero de Tn5 uniéndose cada monómero con una molécula bicatenaria, es decir, el adaptador de ME. Una cadena del adaptador de ME está unida covalentemente a la superficie de una celda de flujo. Los transposomas se unen a ADN diana y generan dos muescas en la cadena principal de ADN, a 9 bases de distancia en cada cadena. Aunque la Figura 2a muestra un hueco de 9 pb entre muescas, en otras realizaciones, el transposoma puede generar un hueco de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 pb entre muescas. Solamente una de las dos cadenas de cada adaptador de ME está ligada a la cadena 5' en cada posición de muesca. Esta cadena "la cadena transferida" se injerta en la superficie de la celda de flujo mediante su extremo 5'. El enlace resultante de la tagmentación de superficie se vuelve a dibujar en la Figura 2b para clarificar la naturaleza del enlace resultante.
- 40
- 45
- 50 Las Figuras 3a y 3b ilustran un ejemplo de la invención puesta en práctica. Se ensamblan dos formas de transposoma en la superficie de una celda de flujo. La primera forma comprende un transposoma P7 en el que la "cadena de transferencia" del adaptador de ME comprende una secuencia oligonucleotídica extendida que une el transposoma con la superficie que incluye un dominio de amplificación (P7) y un cebador de secuenciación (S2). La segunda forma comprende un transposoma P5 en el que la "cadena de transferencia" del adaptador de ME comprende una secuencia oligonucleotídica extendida que une el transposoma con la superficie que incluye un dominio de amplificación (P5) y un cebador de secuenciación (S1). La adición de ADN a la celda de flujo da como resultado la tagmentación y el acoplamiento del ADN a los transposomas. Se producen tres tipos de enlace: P5-P5, P7-P7 y P5-P7. Después de la formación y linealización de grupos (Figura 3b), se retiran los grupos P5-P5 o P7-P7 (dependiendo de la linealización). Como se muestra en la Figura 3b, si se produce linealización mediante P5, entonces solamente permanecen enlaces P5-P7 y P7-P7. Los grupos P7-P7 no se linealizan por esta reacción y por lo tanto no se secuenciarán. Los grupos P7-P7 se retiran posteriormente durante la linealización de Lectura 2 para secuenciación.
- 55
- 60
- El método presentado en el presente documento puede comprender además una etapa adicional de proporcionar complejos de transposomas en solución y poner en contacto los complejos de transposomas de fase de solución con
- 65

los fragmentos inmovilizados en condiciones en las que el ADN diana se fragmenta por la solución de complejos de transposomas; obteniendo de este modo fragmentos de ácido nucleico inmovilizados que tienen un extremo en solución. En algunas realizaciones, los complejos de transposomas en solución pueden comprender un segundo marcador, de modo que el método genere fragmentos de ácido nucleico inmovilizados que tengan un segundo 5 marcador, el segundo marcador en solución. Los primer y segundos marcadores pueden ser diferentes o iguales.

En algunas realizaciones, una forma de transposoma unido a superficie está predominantemente presente en el soporte sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de los marcadores presentes en dicho soporte sólido comprende el 10 mismo dominio de marcador. En dichas realizaciones, después de una reacción de tagmentación inicial con transposomas unidos a superficie, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de las estructuras de enlace comprenden el mismo dominio de marcador en cada extremo del enlace. Una segunda reacción de tagmentación puede realizarse añadiendo transposomas de solución que fragmentan adicionalmente los enlaces. En algunas realizaciones, la mayoría o todos los transposomas de fase 15 de solución comprenden un dominio de marcador que difiere del dominio de marcador presente en las estructuras de enlace generadas en la primera reacción de tagmentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos 99 % de los marcadores presentes en los transposomas de fase de solución comprenden un dominio de marcador que difiere del dominio de marcador presente en las estructuras de enlace generadas en la primera reacción de tagmentación.

Las Figuras 4a y 4b ilustran esta realización. El soporte sólido mostrado en la Figura 4a comprende solamente transposoma unido a superficie que comprende un único tipo de secuencia marcadora (por ejemplo, transposoma P5). En este caso, todos los enlaces tagmentados son enlaces P5-P5. Se añade un transposoma P7 de solución y tagmentos a los enlaces haciendo todas las moléculas unidas a superficie moldes P5-P7- Los fragmentos unidos a 20 superficie pueden convertirse posteriormente en grupos (véase, por ejemplo, Figura 4b). Asimismo, se producirá un par de grupos a partir de cada extremo truncado de transposoma que represente los dos fragmentos adyacentes en el molde de ADN intacto original (Figura 4b).

También se presentan en el presente documento soportes sólidos que tienen una biblioteca de fragmentos de ADN 30 marcados e inmovilizados en los mismos preparados según los métodos anteriores.

Mapas Físicos de Moléculas Polinucleotídicas Inmovilizadas (para referencia)

También se desvelan en el presente documento métodos para generar un mapa físico de polinucleótidos 35 inmovilizados. Los métodos pueden aprovecharse provechosamente para identificar grupos que probablemente contengan secuencias unidas (es decir, las primera y segunda partes de la misma molécula polinucleotídica diana). La proximidad relativa de dos grupos cualesquiera resultante de un polinucleótido inmovilizado proporciona por lo tanto información útil para el alineamiento de información de secuencia obtenida de los dos grupos. Específicamente, la distancia entre dos grupos cualesquiera en una superficie sólida está correlacionada 40 positivamente con la probabilidad de que los dos grupos sean de la misma molécula polinucleotídica diana, como se describe en más detalle en el documento WO 2012/025250.

Como un ejemplo pueden tagmentarse *in situ* moléculas de ADNbc largas que se estiran sobre la superficie de una celda de flujo, dando como resultado una línea de enlaces de ADNbc conectados a través de la superficie de la 45 celda de flujo. Además, puede generarse después un mapa físico del ADN inmovilizado. El mapa físico se correlaciona por lo tanto con la relación física de grupos después de amplificarse ADN inmovilizado. Específicamente, el mapa físico se usa para calcular la probabilidad de que datos de secuencias obtenidos de dos grupos cualesquiera estén ligados, como se describe en el documento WO 2012/025250.

El mapa físico puede generarse capturando imágenes del ADN para establecer la localización de las moléculas de ADN inmovilizadas a través de una superficie sólida. Pueden capturarse imágenes del ADN inmovilizado añadiendo un agente de captura de imágenes al soporte sólido y detectando una señal del agente de captura de imágenes. El agente de captura de imágenes puede ser un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, protones, haptenos, radionúclidos, enzimas, marcadores fluorescentes, marcadores 55 quimioluminiscentes y/o agentes cromogénicos. Por ejemplo, el agente de captura de imágenes puede ser un agente intercalante o agente de unión a ADN no intercalante. Puede usarse cualquier colorante intercalante o agente de unión a ADN no intercalante como se conoce en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los expuestos en el documento U.S. 2012/0282617.

En algunas realizaciones, los fragmentos bicatenarios inmovilizados se fragmentan adicionalmente para liberar un extremo libre (véase Figura 4a) antes de la generación de grupos (Figura 4b). Puede realizarse escisión de estructuras enlazadas usando cualquier metodología adecuada como se conoce en la técnica, como se ejemplifica en el documento WO 2012/025250. Por ejemplo, puede producirse escisión mediante incorporación de un nucleótido modificado, tal como uracilo como se describe en el documento WO 2012/025250, mediante la incorporación de un 65 sitio de endonucleasa de restricción, o aplicando complejos de transposomas de fase de solución a las estructuras

de ADN enlazadas, como se describe en otra parte del presente documento.

Puede hacerse fluir una pluralidad de moléculas de ADN diana en una celda de flujo que comprende una pluralidad de nano-canales, teniendo el nano-canal una pluralidad de complejos de transposomas inmovilizados en el mismo.

5 Como se usa en el presente documento, el término nano-canal se refiere a un canal estrecho en el que se deja fluir una molécula de ADN lineal larga. En algunas realizaciones, no se hacen fluir más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o no más de 1000 cadenas largas individuales de ADN diana en cada nano-canal. Los nano-canales individuales pueden separarse por una barrera física que evita que cadenas largas individuales de ADN diana interactúen con múltiples

10 nano-canales. El soporte sólido puede comprender al menos 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 30000, 50000, 80000 o al menos 100000 nano-canales. Los transposomas unidos a la superficie de un nano-canal tagmentan el ADN. Puede después realizarse un mapeo de contigüidad, por ejemplo, siguiendo los grupos a lo largo de la longitud de estos canales. En algunas realizaciones, la cadena larga de ADN diana puede ser de al menos

15 0,1 kb, 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb, 45 kb, 50 kb, 55 kb, 60 kb, 65 kb, 70 kb, 75 kb, 80 kb, 85 kb, 90 kb, 95 kb, 100 kb, 150 kb, 200 kb, 250 kb, 300 kb, 350 kb, 400 kb, 450 kb, 500 kb, 550 kb, 600 kb, 650 kb, 700 kb, 750 kb, 800 kb, 850 kb, 900 kb, 950 kb, 1000 kb, 5000 kb, 10000 kb, 20000 kb, 30000 kb o al menos 50000 kb de longitud. La cadena larga de ADN diana puede ser de no más de 0,1 kb, 1 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb, 45 kb, 50 kb, 55 kb, 60 kb, 65 kb, 70 kb, 75 kb, 80 kb, 85 kb, 90 kb, 95 kb, 100 kb, 150 kb, 200 kb, 250 kb, 300 kb,

20 350 kb, 400 kb, 450 kb, 500 kb, 550 kb, 600 kb, 650 kb, 700 kb, 750 kb, 800 kb, 850 kb, 900 kb, 950 kb o no más de 1000 kb de longitud. Como ejemplo, una celda de flujo que tenga 1000 o más nano-canales con productos de tagmentación inmovilizados mapeados en los nano-canales puede usarse para secuenciar el genoma de un organismo con lecturas "situadas" cortas. Pueden usarse productos de tagmentación inmovilizados mapeados en los nano-canales para resolver haplotipos. Pueden utilizarse productos de tagmentación inmovilizados mapeados en los

25 nano-canales para resolver problemas de organización.

Amplificación y Secuenciación de Fragmentos de ADN Inmovilizados

Amplificación. La presente divulgación se refiere además a la amplificación de los fragmentos de ADN inmovilizados

30 producidos según los métodos proporcionados en el presente documento. Los fragmentos de ADN inmovilizados producidos por tagmentación mediada por transposoma unido a superficie pueden amplificarse según cualquier metodología de amplificación adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican en un soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es el mismo soporte sólido sobre el que se produce tagmentación unida a superficie. En dichas realizaciones, los métodos y

35 composiciones proporcionados en el presente documento permiten que la preparación de muestras se produzca en el mismo soporte sólido de la etapa de introducción de muestras inicial mediante amplificación y opcionalmente mediante una etapa de secuenciación.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los fragmentos de ADN inmovilizados se amplifican usando metodologías de

40 amplificación de grupos como se ejemplifica por las divulgaciones de las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.985.565 y 7.115.400. Las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.985.565 y 7.115.400 describen métodos de amplificación de ácidos nucleicos de fase sólida que permiten inmovilizar productos de amplificación en un soporte sólido para formar matrices comprendidas por grupos o "colonias" de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Cada grupo o colonia en dicha matriz se forma a partir de una pluralidad de cadenas polinucleotídicas inmovilizadas

45 idénticas y una pluralidad de cadenas polinucleotídicas complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas se denominan en general en el presente documento "matrices agrupadas". Los productos de reacciones de amplificación de fase sólida tales como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.985.565 y 7.115.400 son estructuras denominadas "enlazadas" formadas hibridando pares de cadenas polinucleotídicas inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, estando ambas cadenas inmovilizadas en el soporte sólido

50 en el extremo 5', preferentemente mediante una unión covalente. Las metodologías de amplificación de grupo son ejemplos de métodos en donde se usa un molde de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones inmovilizados. También pueden usarse otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, pueden formarse uno o más grupos o colonias mediante PCR de fase sólida tanto si se

55 inmoviliza uno como si se inmovilizan ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación.

Los fragmentos de ADN inmovilizados pueden amplificarse en solución. Por ejemplo, los fragmentos de ADN inmovilizados pueden escindir-se o de otro modo liberarse del soporte sólido y después se hibridan cebadores de

60 amplificación en solución con las moléculas liberadas. Los cebadores de amplificación pueden hibridarse con los fragmentos de ADN inmovilizados para una o más etapas de amplificación iniciales, seguido de etapas de amplificación posteriores en solución. Por lo tanto, puede usarse un molde de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones de fase de solución.

Se apreciará que cualquiera de las metodologías de amplificación descritas en el presente documento o conocidas

65 en general en la técnica puede utilizarse con cebadores universales o específicos de diana para amplificar

fragmentos de ADN inmovilizados. Los métodos adecuados para amplificación incluyen, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 8.003.354. Los métodos de amplificación anteriores pueden emplearse para
 5 amplificar uno o más ácidos nucleicos de interés. Por ejemplo, la PCR, incluyendo PCR múltiple, SDA, TMA, NASBA y similares puede utilizarse para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. En algunas realizaciones, en la reacción de amplificación se incluyen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés.

Otros métodos adecuados para amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir tecnologías de extensión y
 10 ligamiento de oligonucleótidos, amplificación por círculo rodante (RCA) (Lizardi *et al.*, Nat. Genet. 19: 225-232 (1998)) y ensayos de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Véase en general Patentes de los Estados Unidos N.º 7.582.420, 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; documentos EP 0 320 308 B1; EP 0 336 731 B1; EP 0 439 182 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; y WO 89/0983). Se apreciará que estas metodologías de amplificación pueden diseñarse para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. Por ejemplo, el método de amplificación puede incluir
 15 reacciones de amplificación de sondas de ligamiento o ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. El método de amplificación puede incluir una reacción de extensión-ligamiento de cebadores que contiene cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. Como un ejemplo no limitante de extensión de cebadores y cebadores de ligamiento que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores
 20 usados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, CA) como se ejemplifica en las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.582.420 y 7.611.869.

Los métodos de amplificación isotérmica ejemplares que pueden usarse en un método de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA) como se ejemplifica, por ejemplo, en
 25 Dean *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261-66 (2002) o amplificación de ácido nucleico de desplazamiento de cadena isotérmico ejemplificado, por ejemplo, en Patente de los Estados Unidos N.º 6.214.587. Otros métodos no basados en PCR que pueden usarse en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) que se describe, por ejemplo, en Walker *et al.*, Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; Patentes de los Estados Unidos N.º 5.455.16, y 5.130.238, y Walker *et al.*,
 30 Nucl. Acids Res. 20: 1691-96 (1992) o amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada que se describe, por ejemplo, en Lage *et al.*, Genome Research 13: 294-307 (2003). Pueden usarse métodos de amplificación isotérmica con la polimerasa Phi 29 de desplazamiento de cadena o fragmento grande de ADN polimerasa Bst, 5' -> 3' exo para amplificación con cebador aleatorio de ADN genómico. El uso de estas polimerasas aprovecha su alta capacidad de procesamiento y actividad de desplazamiento de cadena. La alta capacidad de procesamiento permite
 35 que las polimerasas produzcan fragmentos que son de 10-20 kb de longitud. Como se ha expuesto anteriormente, pueden producirse fragmentos más pequeños en condiciones isotérmicas usando polimerasas que tengan baja capacidad de procesamiento y actividad de desplazamiento de cadena tales como polimerasa Klenow. La divulgación de la Patente de los Estados Unidos N.º 7.670.810 expone en detalle la descripción adicional de reacciones de amplificación, condiciones y componentes.

40 Otro método de amplificación de ácido nucleico que es útil en la presente divulgación es PCR Marcada que usa una población de cebadores de dos dominios que tienen una región 5' constante seguida de una región 3' aleatoria como se describe, por ejemplo, en Grothues *et al.* Nucleic Acids Res. 21(5): 1321-2 (1993). Los primeros ciclos de amplificación se llevan a cabo para realizar una multitud de inicios en ADN desnaturalizado por calor basándose en
 45 hibridación individual desde la región 3' sintetizada aleatoriamente. Debido a la naturaleza de la región 3', se contempla que los sitios de inicio son aleatorios por todo el genoma. A continuación, los cebadores no unidos pueden retirarse y puede tener lugar replicación adicional usando cebadores complementarios de la región 5' constante.

50 Secuenciación. (Para referencia) La presente divulgación se refiere además a secuenciación de los fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en el presente documento. Los fragmentos de ADN inmovilizados producidos por tagmentación mediada por transposoma unido a superficie pueden secuenciarse según cualquier metodología de secuenciación adecuada, tal como secuenciación directa, incluyendo secuenciación por síntesis, secuenciación por ligamiento, secuenciación por hibridación, secuenciación por nanoporos y similares.
 55 Los fragmentos de ADN inmovilizados pueden secuenciarse en un soporte sólido. El soporte sólido para secuenciar puede ser el mismo soporte sólido sobre el que se produce tagmentación unida a superficie. El soporte sólido para secuenciación puede ser el mismo soporte sobre el que se produce amplificación.

Una metodología de secuenciación preferida es secuenciación por síntesis (SBS). En SBS, la extensión de un
 60 cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico diana o amplicón del mismo) se supervisa para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde. El proceso químico subyacente puede ser polimerización (por ejemplo catalizada por una enzima polimerasa). En una realización de SBS basada en polimerasa particular, se añaden nucleótidos marcados por fluorescencia a un cebador (extendiendo de este modo el cebador) de una manera dependiente de molde de modo que puede usarse detección del orden y tipo de
 65 nucleótidos añadidos al cebador para determinar la secuencia del molde.

Las celdas de flujo proporcionan un soporte sólido conveniente para alojar fragmentos de ADN amplificados producidos por los métodos de la presente divulgación. Uno o más fragmentos de ADN amplificados en dicho formato pueden someterse a una SBS u otra técnica de detección que implique suministro repetido de reactivos en 5 ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, pueden hacerse fluir uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., en/a través de una celda de flujo que aloja una o más moléculas de ácido nucleico amplificadas. Pueden detectarse los sitios en los que la extensión de cebadores provoca que se incorpore un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina la extensión de cebadores adicional una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, un análogo 10 de nucleótido que tiene un resto terminador reversible puede añadirse a un cebador de modo que no se pueda producir extensión posterior hasta que se suministre un agente de desbloqueo para retirar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, puede suministrarse un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de producirse la detección). Pueden llevarse a cabo lavados entre las diversas etapas de suministro. El ciclo puede después repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando de este modo una secuencia de longitud n. Se describen procedimientos de SBS ejemplares, sistemas fluidos y plataformas 15 de detección que pueden adaptarse fácilmente para su uso con amplicones producidos por los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, en Bentley *et al.*, Nature 456: 53-59 (2008), documentos WO 04/018497; US 7.057.026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7.329.492; US 7.211.414; US 7.315.019; US 7.405.281, y US 2008/0108082.

Pueden usarse otros procedimientos de secuenciación que usan reacciones cíclicas, tales como pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPI) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico naciente (Ronaghi, *et al.*, Analytical Biochemistry 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, Genome Res. 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi *et al.* Science 281(5375), 363 (1998); documentos US 25 6.210.891; US 6.258.568 y US 6.274.320). En pirosecuenciación, puede detectarse PPI liberado convirtiéndose inmediatamente en adenosina trifosfato (ATP) mediante ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado puede detectarse mediante fotones producidos por luciferasa. Por tanto, la reacción de secuenciación puede supervisarse mediante un sistema de detección de luminiscencia. No son necesarias fuentes de radiación de excitación usadas para sistemas de detección basados en fluorescencia para procedimientos de pirosecuenciación. Se describen 30 sistemas fluidos, detectores y procedimientos útiles que pueden adaptarse para la aplicación de pirosecuenciación a amplicones según la presente divulgación, por ejemplo, en la Solicitud de Patente WIPO N.º de Serie PCT/US11/57111, US 2005/0191698 A1, documentos US 7.595.883 y US 7.244.559.

Pueden usarse métodos que implican la supervisión en tiempo real de la actividad de ADN polimerasa. Por ejemplo, 35 puede detectarse incorporaciones de nucleótidos mediante interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF) entre una polimerasa portadora de fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guías de ondas de modo cero (ZMW). Se describen técnicas y reactivos para secuenciación basada en TERF, por ejemplo, en Levene *et al.* Science 299, 682-686 (2003); Lundquist *et al.* Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008); Korklach *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008).

Algunos métodos de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles en el mercado de Ion Torrent (Guilford, CT, una filial de Life Technologies) o métodos de secuenciación y sistemas descritos en los documentos US 2009/0026082 A1; US 45 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; o US 2010/0282617 A1. Los métodos expuestos en el presente documento para amplificar ácidos nucleicos diana usando exclusión cinética pueden aplicarse fácilmente a sustratos usados para detectar protones. Más específicamente, pueden usarse métodos expuestos en el presente documento para producir poblaciones clonales de amplicones que se usan para detectar protones.

Otra técnica de secuenciación útil es la secuenciación por nanoporos (véase, por ejemplo, Deamer *et al.* Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer *et al.* Acc. Chem. Res. 35: 817-825 (2002); Li *et al.* Nat. Mater. 2: 611-615 (2003)). En algunos métodos de nanoporos, el ácido nucleico diana o nucleótidos individuales retirados de un ácido nucleico diana pasan a través de un nanoporo. A medida que el ácido nucleico o nucleótido pasa a través del nanoporo, cada tipo de nucleótido pueden identificarse midiendo fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro 50 (Patente de los Estados Unidos N.º 7.001.792; Soni *et al.* Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft *et al.* J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 (2008)).

Se describen métodos ejemplares para análisis de expresión y genotipado basado en matrices que puede aplicarse a detección según la presente divulgación en las Patentes de los Estados Unidos N.º 7.582.420; 6.890.741; 60 6.913.884 o 6.355.431 o Publicaciones de Patente de los Estados Unidos N.º 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

Una ventaja de los métodos expuestos en el presente documento es que proporcionan detección rápida y eficaz de una pluralidad de ácidos nucleicos diana en paralelo. En consecuencia la presente divulgación proporciona sistemas 65 integrados capaces de preparar y detectar ácidos nucleicos usando técnicas conocidas en este campo tales como

las ejemplificadas anteriormente. Por lo tanto, un sistema integrado de la presente divulgación puede incluir componentes fluidos capaces de suministrar reactivos de amplificación y/o reactivos de secuenciación a uno o más fragmentos de ADN inmovilizados, comprendiendo el sistema componentes tales como bombas, válvulas, depósitos, líneas fluidas y similares. Una celda de flujo puede configurarse y/o usarse en un sistema integrado para detección de ácidos nucleicos diana. Se describen celdas de flujo ejemplares, por ejemplo, en el documento US 2010/0111768 A1 y US N.º de Serie 13/273.666. Como se ejemplifica para las celdas de flujo, uno o más de los componentes fluidos de un sistema integrado pueden usarse para un método de amplificación y para un método de detección. Tomando un método de secuenciación de ácido nucleico como un ejemplo, pueden usarse uno o más de los componentes fluidos de un sistema integrado para un método de amplificación expuesto en el presente documento y para el suministro de reactivos de secuenciación en un método de secuenciación tal como los ejemplificados anteriormente. Como alternativa, un sistema integrado puede incluir sistemas fluidos separados para llevar a cabo métodos de amplificación y para llevar a cabo métodos de detección. Los ejemplos de sistemas de secuenciación integrados que son capaces de crear ácidos nucleicos amplificados y también determinar la secuencia de los ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, la plataforma MiSeq™ (Illumina, Inc., San Diego, CA) y dispositivos descritos en el N.º de Serie de Estados Unidos 13/273.666.

Soportes sólidos con transposomas inmovilizados y métodos de preparación

Otras realizaciones presentadas en el presente documento incluyen soportes sólidos, tales como celdas de flujo, que tienen complejos de transposomas inmovilizados en los mismos. En determinadas realizaciones, los complejos de transposomas comprenden una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador. La densidad de estos transposomas unidos a superficie puede variar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los complejos de transposomas están presentes en el soporte sólido a una densidad de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 o al menos 10^6 complejos por mm^2 .

También se presentan en el presente documento métodos para generar una celda de flujo para tagmentación. Los métodos pueden comprender, por ejemplo, inmovilizar una pluralidad de complejos de transposomas en un soporte sólido, comprendiendo los complejos de transposomas una transposasa unida a un primer polinucleótido, comprendiendo el primer polinucleótido (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón, y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador.

Los complejos de transposomas pueden inmovilizarse en un soporte sólido en una diversidad de métodos, que apreciará un experto en la materia. En una realización, el método comprende proporcionar un soporte sólido que tiene una pluralidad de primeros polinucleótidos inmovilizados en el mismo, y poner en contacto el soporte sólido con una holoenzima transposasa y un segundo polinucleótido, comprendiendo el segundo polinucleótido una región complementaria de la secuencia del extremo del transposón. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido se hibrida con el primer polinucleótido inmovilizado antes de añadirse la holoenzima transposasa. En algunas realizaciones, el segundo polinucleótido y la holoenzima transposasa se proporcionan juntos. La Figura 5a muestra una realización de este método para ensamblar los complejos de transposomas unidos a superficie. En un método, se añade holoenzima transposasa junto con la cadena no transferida del adaptador de ME a una celda de flujo que contiene oligonucleótidos que comprenden desde el extremo injertado en superficie 5': un cebador de amplificación de grupo (A.pr) y cebador de secuenciación (S.pr) y la secuencia ME (Figura 5a). Como alternativa, la cadena de ME' no transferida puede hibridarse con la cadena de ME injertada en superficie primero y después añadirse la transposasa a la celda de flujo.

Los complejos de transposomas pueden ensamblarse en solución y la inmovilización puede comprender una etapa adicional de ligar el primer polinucleótido con un oligonucleótido de refuerzo acoplado al soporte sólido. Esto se ilustra en la Figura 5b. El oligonucleótido de refuerzo puede extenderse usando una polimerasa antes de que se produzca una etapa de ligamiento.

El dímero de transposoma puede ensamblarse hibridando un oligonucleótido en bucle con un primer polinucleótido inmovilizado. Por ejemplo, un oligonucleótido en bucle puede comprender un primer extremo y un segundo extremo, siendo el primer extremo complementario de la secuencia de extremo de transposón del primer polinucleótido. El segundo extremo del oligonucleótido en bucle puede ser complementario de una segunda secuencia de extremo de transposón. La segunda secuencia de extremo de transposón puede ser, por ejemplo, parte de un primer polinucleótido de fase de solución. El primer polinucleótido inmovilizado y el primer polinucleótido de fase de solución pueden comprender secuencias de extremos del transposones diferentes o complementos de las mismas. El oligonucleótido en bucle puede comprender secuencias complementarias entre sí de las secuencias de extremos de transposones diferentes en el primer y segundo extremos. Una ilustración de esto se muestra en la Figura 5c. Como se muestra en la Figura 5c se genera un par adaptador contiguo hibridando dos oligonucleótidos con el oligonucleótido unido a superficie. Esto puede conseguirse empleando dos secuencias de extremos de transposones diferentes (ME1 y ME2). La adición de holoenzima transposasa reconstituye un complejo de transposoma "en bucle" activo, donde solamente uno de los dos adaptadores de cada transposoma se acopla con la superficie Figura 5c.

65

Pueden ensamblarse complejos de transposomas en una celda de flujo de extremos emparejados convencional con cebadores de amplificación inmovilizados en la misma (por ejemplo, una celda de flujo HiSeq o celda de flujo MiSeq comercializadas por Illumina Inc, San Diego, CA). Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, hibridación de un oligonucleótido de "refuerzo" que hibrida con una o ambas especies de cebadores de amplificación injertados en superficie. El refuerzo actúa como un molde para extender después el cebador de superficie injertado con una polimerasa y dNTP para formar un dúplex oligonucleotídico que contiene un cebador de amplificación de superficie, un cebador de secuenciación y las secuencias de extremos de transposones de la transposasa. La adición de transposasa ensambla un transposoma de la superficie. Esta realización se ilustra en la Figura 5d.

10 En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, los complejos de transposomas pueden ser homodímeros o heterodímeros. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 11, un transposoma homodimérico comprendería dos adaptadores P5-ME en ambos sitios o, como alternativa, dos adaptadores P7-ME. De forma similar, un complejo de transposoma heterodimérico comprendería adaptadores tanto P5-ME como P7-ME, como se muestra en la Figura 11.

15 **Tagmentación usando perlas de transposomas**

Una realización presentada en el presente documento es una población de micropartículas que tienen complejos de transposomas inmovilizados en las mismas. El uso de un soporte sólido tal como perlas puede proporcionar varias ventajas con respecto a la tagmentación basada en solución. Por ejemplo, en tagmentación basada en solución convencional, es difícil controlar el tamaño de fragmento final de la reacción de tagmentación. El tamaño de fragmento está en función de la relación de transposomas con respecto a la cantidad y el tamaño de ADN y a la duración de la reacción. Incluso si estos parámetros se controlan, el fraccionamiento de selección de tamaño es necesario habitualmente como una etapa adicional para retirar el exceso de fragmentos pequeños más cortos que las longitudes de lecturas emparejadas combinadas. Los métodos proporcionados en el presente documento evitan esas desventajas. Específicamente, los transposomas inmovilizados en perlas permiten la selección de tamaño de fragmento final en función de la separación espacial de los transposomas unidos independientemente de la cantidad de perlas de transposomas añadidas a la reacción de tagmentación. Una limitación adicional de la tagmentación basada en solución es que es normalmente necesario realizar alguna forma de purificación de los productos de la reacción de tagmentación tanto antes como después de la amplificación por PCR. Esto necesita típicamente alguna transferencia de reacciones de un tubo a otro. Por el contrario, los productos de tagmentación en los transposomas basados en perlas pueden lavarse y posteriormente liberarse para amplificación u otro procesamiento corriente abajo, evitando de este modo la necesidad de la transferencia de muestras. Por ejemplo, cuando se ensamblan transposomas en perlas paramagnéticas, puede conseguirse fácilmente purificación de los productos de reacción de tagmentación inmovilizando las perlas con imanes y lavando. Por lo tanto, la tagmentación y otro procesamiento corriente abajo tal como amplificación por PCR pueden todos realizarse en un único tubo, vaso, gota u otro recipiente. La tagmentación y el procesamiento corriente abajo de muestras puede tener lugar en un dispositivo basado en gota microfluídico, como se ejemplifica en la divulgación de la Solicitud de los Estados Unidos N.º de Serie 13/670.318, presentada el 6 de noviembre de 2012 titulada "INTEGRATED SEQUENCING APPARATUSES AND METHODS OF USE". Por ejemplo, en un dispositivo basado en gotas microfluídico, puede pasarse una gota que contiene ácido nucleico diana, tampón de lavado u otros reactivos sobre una superficie que comprende complejos de transposomas inmovilizados. De forma similar, una gota que comprende perlas que tienen transposomas inmovilizados en las mismas puede ponerse en contacto con ácido nucleico diana, tampón de lavado u otros reactivos en un dispositivo basado en gotas microfluídico.

45 En algunas realizaciones, los complejos de transposomas inmovilizados comprenden una transposasa unida a un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido; en donde el primer polinucleótido se inmoviliza en su extremo 5' en la superficie de la micropartícula y el segundo polinucleótido se hibrida en el extremo 3' del primer polinucleótido; y en donde el primer polinucleótido comprende: (i) una parte 3' que comprende una secuencia de extremo de transposón y (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador.

Las Figuras 9-12 proporcionan una ilustración de transposomas ensamblados en la superficie de perlas paramagnéticas. La Figura 9 muestra una superficie de perla con dos primeros polinucleótidos diferentes inmovilizados en la misma. Los primeros polinucleótidos que se muestran comprenden una secuencia de extremo de transposón (ME). Uno de los primeros polinucleótidos mostrados comprende un dominio de marcador que comprende una secuencia de cebador de amplificación (P5) y una secuencia de cebador de secuenciación (Lectura 1). El otro polinucleótido mostrado en la Figura 9 comprende una secuencia de cebador de amplificación diferente (P7) y una secuencia de cebador de secuenciación (Lectura 2). Los primeros polinucleótidos también pueden comprender un marcador índice. El marcador índice puede ser único de la perla, o puede estar compartido con una o más perlas adicionales en la población. Una única perla puede tener solamente un único marcador índice inmovilizado en la misma, o puede tener una pluralidad de marcadores índices inmovilizados en la misma.

La Figura 10 muestra un segundo polinucleótido hibridado con cada primer polinucleótido. El segundo polinucleótido comprende una región complementaria de la secuencia de extremo de transposón del primer polinucleótido. El segundo polinucleótido puede ser de 15 pb de longitud. El segundo polinucleótido puede ser de aproximadamente

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 pb o más de 20 pb de longitud. El segundo polinucleótido puede estar fosforilado en su extremo 5'.

La Figura 11 ilustra ensamblaje de transposomas en la superficie de la perla, donde la enzima transposasa se pone en contacto con los oligonucleótidos inmovilizados. Como se muestra en la Figura 11, cuando la transposasa se añade a las perlas, se forman tres tipos de complejos de transposomas: un complejo P5:P5, un P7:P7 y un P5:P7 (Figura 11).

Cuando las perlas de transposomas se añaden a una solución de ADN diana en un tampón de tagmentación, tiene lugar la tagmentación, que liga el ADN a la superficie de las perlas. Se genera una biblioteca inmovilizada de fragmentos de ADN marcados.

La Figura 12 ilustra una realización donde la tagmentación sucesiva en el ADN da como resultado moléculas enlazadas entre transposomas. Cuando estén presentes tres tipos de transposomas (como en la Figura 11), se producen tres tipos de complejos de enlace: un complejo P5:P5, P7:P7 y P5:P7 en una relación de 25:25:50, respectivamente.

La longitud de los fragmentos enlazados puede estar dictada por la densidad de los transposomas en la superficie de la perla. Esta densidad puede ajustarse mediante la cantidad de oligonucleótido en la superficie, la cantidad de complejos de extremos de transposones bicatenarios en la superficie y la cantidad de enzima transposasa añadida durante el ensamblaje de transposomas. Una vez que se ha completado la tagmentación, los productos de tagmentación de P5:P7 pueden liberarse de la superficie de la perla usando cualquier método adecuado. Los productos de tagmentación puede liberarse de las perlas usando un método de amplificación tal como PCR de supresión, PCR step-out y similares. Los productos de tagmentación pueden liberarse de las perlas por escisión. La escisión puede ser, por ejemplo, química, enzimática, fotoquímica o una combinación de las mismas. Se apreciará que puede utilizarse cualquier método adecuado para liberar uno o más productos de tagmentación de un soporte sólido en los métodos proporcionados en el presente documento.

El ADN puede ponerse en contacto eficazmente con transposomas unidos a superficie usando cualquier método adecuado para aumentar la probabilidad de contacto. Por ejemplo, puede utilizarse precipitación de ADN en la superficie sólida para aumentar el contacto entre el ADN diana y los complejos de transposomas en la superficie sólida. Puede utilizarse uno cualquiera de varios métodos que se conocen en la técnica para poner en contacto ADN con un soporte sólido, como se ejemplifica en la divulgación del documento WO 2010/115122. Como apreciará un experto en la materia, el ADN puede precipitarse en un soporte sólido mediante la adición de PEG, etanol o uno cualquiera de una diversidad de agentes adicionales que se sabe que precipitan ADN en superficies, incluyendo, por ejemplo, uno cualquiera de varios tampones usados en tecnología de inmovilización reversible de fase sólida (SPRI).

Puede mezclarse una población de perlas que portan complejos de transposomas inmovilizados con un exceso de perlas que no portan ningún transposoma un oligonucleótido, reduciendo de este modo la probabilidad de tagmentación entre dos o más perlas diferentes. Otro método para reducir la probabilidad de tagmentación entre dos o más perlas diferentes incluye inmovilizar perlas de modo que se minimice el contacto entre perlas. La inmovilización de perlas puede conseguirse por cualquiera de varias técnicas conocidas en este campo, incluyendo, por ejemplo, inmovilizar las perlas mediante magnetismo en los laterales de una superficie sólida tal como un tubo de microcentrífuga, o cualquier otra técnica de inmovilización, como se ejemplifica en el documento WO 2010/115122.

Pueden usarse perlas de transposomas para aislar e identificar ácidos nucleicos de una única célula, tal como una célula procarionota o eucariota. Por ejemplo, pueden recubrirse partículas tales como perlas con transposomas indexados que comparten el mismo índice (todos los transposomas presentes en una perla particular portan el mismo índice, que es diferente del índice presente en otra perla). Las perlas pueden colocarse después dentro de células a través de una cualquiera de una diversidad de metodologías conocidas en la técnica. Por ejemplo, los métodos para suministrar perlas dentro de células incluyen, pero sin limitación, pistolas génicas, nanocuchillas fototérmicas (Wu *et al.* Anal Chem. (2011) 4: 1321-7), y péptidos usados junto con sustancias permeabilizantes celulares (Nitin *et al* Ann Biomed Eng. (2009) 37: 2018-2027) y similares. Se apreciará que puede usarse cualquier método adecuado para asociar ADN de una única célula con una partícula que porta transposomas indexados en los métodos presentados en el presente documento.

Los transposomas pueden unirse covalentemente con las perlas como se ha descrito en detalle anteriormente en el presente documento. Adicionalmente o como alternativa, los transposomas pueden liberarse de las perlas tras la aplicación de un estímulo químico o físico. Algunos ejemplos de estímulos que pueden desencadenar la liberación de transposoma de un soporte sólido incluyen cambios de luz y/o temperatura. Los transposomas pueden liberarse del soporte sólido usando la actividad de una enzima tal como una endonucleasa de restricción. Los transposomas pueden desprenderse de las perlas y moverse libremente dentro de la célula. Una vez que las perlas (o como alternativa, los transposomas liberados) entran en contacto con cromatina o ADN, puede tener lugar la tagmentación. Se entenderá que en sistemas eucariotas y procarionotas, no todo el ADN genómico será siempre

- accesible y/o disponible para tagmentación. Hasta 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % o más del 99 % del ADN total en una célula puede tagmentarse por los transposomas. El uso de perlas marcadas de forma única hace posible identificar lecturas de la misma célula agrupando entre sí lecturas que comparten los mismos índices. Estas lecturas pueden considerarse procedentes de la misma perla (y por lo tanto de la misma célula). Adicionalmente o como alternativa, puede realizarse una etapa de reticulación para reticular ADN celular mientras que aún está dentro del núcleo de la célula. Dicha etapa asegura que el ADN de una única célula se mantenga unido. Después de extraer el ADN de células, se puede a continuación mezclar con las perlas indexadas y someterse a tagmentación como se ha descrito en detalle anteriormente en el presente documento. Adicionalmente o como alternativa, las variaciones del método incluyen la tagmentación de cromosomas clasificados por flujo. Los cromosomas clasificados por flujo pueden mezclarse con las perlas indexadas descritas anteriormente. Un cromosoma particular se adheriría a una perla y los fragmentos generados mediante tagmentación contendrían el mismo índice. Esto podría permitir la organización de SNP a partir de cromosomas completos (haplotipado).
- 15 El número total de índices puede ser mayor que el número total de células que se tagmentan con éxito. Puede implementarse un enfoque de índice doble, por ejemplo, como un modo de aumentar el número de posibles combinaciones de índices. Como un ejemplo, el uso de dos índices de base 8 proporcionaría un número teórico de combinaciones de $4^8 \times 4^8 = 4,3 \times 10^9$.
- 20 Puede usarse un enfoque para asegurar que una célula individual no sea tagmentada por múltiples perlas. Por ejemplo, un enfoque es utilizar perlas de un tamaño que es similar al de la célula. Esto aseguraría que una célula no sería capaz de acomodar múltiples perlas. Adicionalmente o como alternativa, otro enfoque es hacer uso de una relación de célula con respecto a perla que favorece la dirección a célula individual. Por ejemplo, si hay muchas más células que perlas, entonces la distribución de Poisson de perlas dentro de las células significa que las células que han captado una única perla superan en gran medida a las células que han captado dos o más perlas.

El enfoque de una única célula descrita anteriormente puede usarse para determinar si dos SNP (o reordenaciones estructurales) están presentes en la misma célula. Por ejemplo, en el caso de poblaciones heterogéneas de células cancerosas, el conocimiento de si están presentes dos SNP en la misma célula o en diferentes células podría ayudar a implementar la terapia de cáncer apropiada.

El enfoque de una única célula descrito anteriormente puede usarse para estudiar ARN. Por ejemplo, recubriendo las perlas con enzimas adecuadas (es decir, transcriptasa inversa) y oligonucleótidos para una etapa de transcripción inversa, puede analizarse la expresión génica al nivel de una única célula. Después de introducir las perlas recubiertas con transcriptasa inversa, oligonucleótidos y transposomas, el ARN citoplasmático puede convertirse en ADNc, marcarse y prepararse dentro de las células.

Métodos para ensamblar largas lecturas usando códigos de barras en transposomas inmovilizados (para referencia)

El ensamblaje asistido por código de barras de fragmentos de ADN permite el aislamiento de moléculas de ADN largas individuales dentro de una población de moléculas de ADN y la conversión de cada molécula en una biblioteca de subfragmentos con códigos de barras únicos. Cuando la población completa de moléculas de ADN subfragmentadas se secuencian, los subfragmentos pueden ensamblarse de vuelta a su molécula larga original por referencia a los códigos de barras que contienen.

Se conocen diversos métodos para aplicar códigos de barras a moléculas de ADN individuales. Por ejemplo, el "método de dilución", aísla moléculas largas individuales mediante dilución extrema y separación en alícuotas en compartimentos separados (por ejemplo, pocillos de una placa), de modo que cada pocillo contenga solamente una o solamente algunas moléculas de ADN. Debido a que cada pocillo está separado físicamente, puede realizarse una preparación de biblioteca en cada pocillo con un código de barras único. A continuación los contenidos de los pocillos se agrupan y secuencian. Otro método emplea una emulsión en la que cada gota contiene moléculas de ADN largas, reactivos de preparación de bibliotecas y un código de barras único para cada gota. Otro enfoque usa una biblioteca grande de complejos de transposomas en bucle indexados para insertar múltiples códigos de barras gemelos a largo de la longitud del ADN conservando al mismo tiempo la integridad de la molécula. Posteriormente la escisión entre los "gemelos" de códigos de barras produce fragmentos que pueden secuenciarse y reensamblarse emparejando los códigos de barras gemelos. Cada uno de los métodos de aplicación de código de barras mencionados anteriormente conlleva desventajas que son superadas por los métodos de aplicación de códigos de barras presentados en el presente documento.

Se presentan en el presente documento métodos alternativos a los modos anteriormente descritos de aislamiento y aplicación de códigos de barras de moléculas largas individuales. Los métodos presentados en el presente documento consiguen ventajas de aislamiento físico similares al método de emulsión sin usar emulsiones, y al mismo tiempo proporcionan una complejidad que es mucho mayor que la proporcionada por el gran número de "pocillos" usados en el método de dilución. Los códigos de barras únicos de los presentes métodos son de alguna

manera análogos a los “pocillos” del método de dilución excepto que el número de perlas en el método basado en perlas puede con frecuencia ser mucho mayor que el número de pocillos en el método de dilución. Una ventaja adicional con respecto a los métodos de emulsión es que en el método basado en perlas, los códigos de barras se distribuyen de forma determinista (es decir, un código de barras por perla) y no aleatoria (es decir, distribuido por Poisson). Los métodos presentados en el presente documento también consiguen la misma conservación inicial de la integridad y contigüidad de la molécula pero sin la necesidad de complejos de transposomas en bucle como se usan en algunos otros métodos. Adicionalmente, los métodos presentados en el presente documento no requieren un espacio de código tan grande como el usado en algunos otros métodos.

10 En consecuencia, el método de la aplicación de códigos de barra puede comprender proporcionar una población de micropartículas que tienen complejos de transposomas inmovilizados en las mismas, comprendiendo los complejos de transposomas una transposasa unida a un primer polinucleótido y segundo polinucleótido. El primer polinucleótido puede comprender un dominio índice asociado con la micropartícula. El dominio índice puede ser único de la micropartícula. La población de micropartículas puede comprender al menos una pluralidad de dominios índice. El dominio índice puede estar presente en más de una micropartícula en la población de micropartículas. Una micropartícula en la población de micropartículas puede comprender más de un dominio índice.

Los métodos de aplicación de códigos de barras presentados en el presente documento comprenden además aplicar un ADN diana a la población de micropartículas, generando de este modo fragmentos de ADN inmovilizados que se marcan con el dominio índice. El ADN puede ponerse en contacto eficazmente con transposomas unidos a superficie usando cualquier método adecuado para aumentar la probabilidad de contacto como se ha analizado anteriormente en el presente documento, como se ejemplifica en el documento WO 2010/115122.

Los métodos pueden realizarse usando una cualquiera de una diversidad de formatos conocidos, por ejemplo, con una combinación de reactivos de tagmentación y una matriz de perlas para la preparación de bibliotecas, seguido de un ciclo de secuenciación indexado y análisis de datos a medida. Puede usarse cualquier otro método adecuado que mantenga perlas en separación estática entre sí para tagmentación de superficie e indexación de muestras. Por ejemplo, las configuraciones físicas tales como pocillos o pequeñas depresiones en el sustrato que pueden conservar las perlas, de modo que una microesfera pueda reposar en el pocillo, o el uso de otras fuerzas (magnéticas o compresivas), o sitios químicamente alterados o activos, tales como sitios químicamente funcionalizados, sitios electrostáticamente alterados, sitios hidrofólicamente y/o hidrofílicamente funcionalizados o puntos de adhesivo.

Las microesferas pueden estar asociadas de forma no covalente en los pocillos, aunque los pocillos pueden adicionalmente funcionalizarse químicamente como se describe en general posteriormente, pueden usarse agentes reticulantes o puede usarse una barrera física, por ejemplo, una película o membrana sobre las perlas.

La superficie de sustrato puede modificarse para contener sitios químicamente modificados que pueden usarse para unir, de forma covalente o no covalente, las microesferas de la invención con los sitios o localizaciones individuales en el sustrato. Los “sitios químicamente modificados” en este contexto incluyen, pero sin limitación, la adición de un patrón de grupos funcionales químicos incluyendo grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo y grupos tiol, que pueden usarse para unir de forma covalente microesferas, que en general también contienen grupos funcionales reactivos correspondientes; la adición de un patrón de adhesivo que puede usarse para unir las microesferas (bien mediante funcionalización química previa para la adición del adhesivo o adición directa del adhesivo); la adición de un patrón de grupos con carga (similares a las funcionalidades químicas) para la unión electrostática de las microesferas, por ejemplo, cuando las microesferas comprenden grupos con carga enfrente de los sitios; la adición de un patrón de grupos funcionales químicos que hacen los sitios diferencialmente hidrófobos o hidrófilos, de modo que la adición de microesferas hidrófobas o hidrófilas similares en condiciones experimentales adecuadas dé como resultado la asociación de las microesferas con los sitios basándose en la hidroafinidad. Por ejemplo, el uso de sitios hidrófobos con perlas hidrófobas, en un sistema acuoso, conduce la asociación de las perlas preferentemente a los sitios. Como se ha destacado anteriormente, “patrón” en ese sentido incluye el uso de un tratamiento uniforme de la superficie para permitir la unión de las perlas en sitios individuales, así como el tratamiento de la superficie que da como resultado sitios individuales. Como apreciarán los expertos en la materia, esto puede conseguirse de diversas maneras.

Puede generarse una multitud de perlas que comprenden transposomas unidos a superficie, en donde cada perla contiene muchos transposomas pero todos los transposomas en cualquier perla dada contienen el mismo código de barras. La generación de una población de oligonucleótidos de transposomas con código de barras monoclonales en perlas puede realizarse según una cualquiera de varias técnicas conocidas en este campo, como se ejemplifica en la divulgación del documento U.S. 5.604.097.

La Figura 13 ilustra una realización, donde un transposoma unido a superficie contiene oligonucleótidos largos unidos a la superficie a través de su extremo 5'. Como se expone en la Figura 13, el extremo 3' del oligonucleótido comprende las secuencias de Extremo de Mosaico (METS) de la enzima transposasa Tn5. Cadena arriba de esta secuencia (más cerca del extremo 5') hay una secuencia de código de barras de típicamente 6-8 bases de longitud.

Más cadena arriba hay una secuencia cebadora. Adicionalmente, el oligonucleótido puede comprender además un sitio de escisión para permitir que el oligonucleótido pueda escindirse de la superficie: su presencia en el oligonucleótido es opcional para el método general. Un segundo oligonucleótido corto (la cadena no transferida, METS) se hibrida con la secuencia de METS en el extremo 3' del oligonucleótido con injerto de superficie largo.

5 Finalmente, un dímero de transposasa se ensambla en el extremo 3' de los oligonucleótidos para formar un transposoma funcional.

La Figura 14 ilustra aplicación de códigos de barras en perlas en una matriz de pocillos. Como se muestra en la Figura 14, cuando se añaden moléculas largas de ADNbc a una matriz de transposomas inmovilizados en perlas, una molécula dada encuentra una perla y es tagmentada muchas veces por los transposomas en la perla. Cada fragmento se inmoviliza en la perla y se marca con el código de barras asociado con esa perla. En la realización particular mostrada en la Figura 14, la separación física de perlas en el chip de matrices evita que una molécula de ADN alcance entre dos perlas. En otras realizaciones, las perlas están en contacto estrecho y una o más moléculas de ADN pueden extenderse entre dos o más perlas. En algunas realizaciones, puede tagmentarse más de una molécula de ADN por perla. La probabilidad de que dos alelos se tagmenten en la misma perla es baja y está en función de la concentración del ADN añadido, el número de perlas y el número de códigos de barras. Por ejemplo, para evitar que dos alelos aparezcan en el mismo pocillo, sería necesario cargar 0,1x equivalentes de haploma (50.000 equivalentes de genomas) en 1 millón de perlas cada una con un código de barras único.

20 La Figura 15 ilustra la transferencia de moléculas marcadas con código de barras a una reacción de secuenciación. Como se muestra en la Figura 15, una vez que se ha completado la tagmentación el ADN se transfiere de la superficie de la perla a solución de modo que puedan agruparse y prepararse para secuenciación fragmentos individuales. La secuenciación y el ensamblaje por referencia a los códigos de barras permiten que la secuencia de las moléculas de ADN tagmentadas largas originales se vuelvan a crear, permitiendo de este modo lecturas largas o pseudolargas y organización de SNP.

La liberación de los fragmentos tagmentados en superficie con código de barras a las soluciones puede conseguirse usando cualquier metodología adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las moléculas tagmentadas pueden escindirse de la superficie de las perlas mediante un resto de escisión presente en el extremo 5' de los oligonucleótidos unidos a superficie (véase Figura 13). El resto de escisión puede ser cualquier resto adecuado para escisión de una cadena de ácido nucleico de un soporte sólido. Los ejemplos de métodos que utilizan un resto de escisión incluyen, pero sin limitación, escisión por endonucleasa de restricción, escisión química, escisión por RNasa, escisión fotoquímica y similares, incluyendo los métodos de escisión y restos de escisión expuestos en el documento WO 2006/064199.

35 La escisión usando un resto de escisión produce una molécula que tiene el siguiente formato: 5'- Cebador - Código de Barras - ME - Injerto - ME - Código de Barras - Cebador - 3'.

Las regiones "cebadoras" pueden usarse como puntos de hibridación para hibridar cebadores step-out de PCR que permiten añadir secuencias adicionales tales como cebadores de amplificación y secuenciación. Por ejemplo, pueden añadirse cebadores de amplificación P5 y P7. Una vez añadidos, puede usarse PCR de supresión, por ejemplo, para enriquecer con respecto a moléculas que tengan adaptadores de P5 en un extremo y P7 en el otro.

Puede realizarse amplificación directamente a partir de las perlas con cebadores step-out que añaden secuencias adaptadoras P5 y P7 mediante PCR de supresión. En otra realización, cada perla puede tener dos tipos de oligonucleótidos injertados en superficie donde la primera secuencia (como en la Figura 13) es cebador de secuenciación P5-Lectura 1 o cebador de secuenciación P7-Lectura 2. Esto dará como resultado transposomas de P5-P7 mixtos. Estos pueden escindirse de las perlas y seguirse de PCR de supresión para enriquecer las moléculas P5/P7 o amplificarse directamente a partir de las perlas, como se ha descrito anteriormente.

50 Puede estar presente un único tipo de transposoma (por ejemplo P5-Lectura 1-código de barras) en la superficie de la perla. Una vez que se ha completado la tagmentación de superficie, puede añadirse un segundo transposoma que porta un cebador de amplificación y/o secuenciación diferente en solución para escindir las moléculas enlazadas. Esto produce todas las moléculas con el mismo formato de adaptador que puede escindirse o amplificarse a partir de la superficie de la perla. Podría añadirse un código de barras específico de muestra adicional al transposoma de solución de modo que pueden agruparse múltiples muestras por el método. La Figura 16 es una ilustración de esta realización. Como se muestra en la Figura 16, se añaden transposomas de fase de solución que portan una secuencia de cebador de amplificación P7 a una perla con productos de tagmentación enlazados inmovilizados. Los fragmentos inmovilizados se marcan con una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia de cebador de amplificación P5 y un marcador de índice de código de barras (i9) que es único de la perla. Como se muestra en la Figura 16, después de la segunda reacción de tagmentación, cada fragmento tiene un extremo libre que porta una secuencia de cebador P7 y un extremo inmovilizado que porta una secuencia de cebador P5.

Ejemplo 1

65

Tagmentación de superficie en una celda de flujo

Este ejemplo describe un experimento que confirma la realización ilustrada en las Figuras 4a y 4b (tagmentación de superficie seguida de tagmentación en solución).

5

Un experimento en una celda de flujo del carril 8 se llevó a cabo usando una lista de condiciones y controles mostrada en las Figuras 6a y 6b. El carril 6 indica la exposición de extremo a extremo completa del método: se añadió ADN genómico de *E. coli* no fragmentado a una celda de flujo donde se tagmentó mediante los transposomas unidos a superficie. A continuación se aplicó calor a la celda de flujo para deshibridar selectivamente las secuencias de ME desnudas anulándolas de este modo como dianas para una segunda reacción de tagmentación cuando se añada a continuación transposoma de solución. Después de la segunda reacción de tagmentación, se generaron grupos y se realizó secuenciación de "extremos emparejados" (2x36 lecturas de bases). Se proporciona la métrica de secuenciación en la diapositiva 7 que muestra que en el carril 6, 73,14 % de los grupos pasaron los filtros y 74,69 de estos se alinearon. Esto proporciona suficientes datos para producir una representación de tamaño de hueco de los insertos y una estimación de la diversidad de la biblioteca (véase Figura 8).

Otros carriles incluyeron controles que se enumeran a continuación:

20 El **carril 1** comprende ADN de PhiX como un control positivo para asegurar que todo ha estado bombeando correctamente y la generación y secuenciación de grupos funciona como se esperaba.

El **carril 2** es otro carril de control e ilustra la tagmentación en transposones unidos a superficie en ausencia de ADN diana. La celda de flujo (CF) comprende un extremo emparejado convencional de CF en el que se hibridó un oligonucleótido que contenía la secuencia de cebador de tagmentación y secuencia de ME' (cadena de ME' no transferida) con el oligonucleótido de superficie P7. Este oligonucleótido se añadió a una concentración de saturación. La primera extensión dio como resultado un transposón bicatenario con extremos de ME. Se ensambló un transposoma P5 en solución y se hizo fluir a la CF (6,25 nM/carril). El transposoma P5 tagmenta los transposones unidos a superficie bicatenarios. Los productos de tagmentación se convierten posteriormente en grupos.

30 El **carril 3** ilustra tagmentación en transposones unidos a superficie en ausencia de ADN diana, solo que en este caso la CF se ha calentado hasta 75 °C para convertir los transposones unidos a superficie bc en oligonucleótidos monocatenarios antes de la adición del transposoma P5 de la solución para prevenir la tagmentación en estas construcciones, ya que esto interfería con la tagmentación del ADN diana.

El **carril 4** ilustra la adición de un transposoma unido a superficie a las condiciones del carril 3. En este carril un oligonucleótido que contenía la secuencia de cebador de tagmentación y secuencia ME' se hibridó con el oligonucleótido de superficie P7. La primera extensión da como resultado un transposón bicatenario con extremos ME. Después de esto, se ensambló un transposoma P7 en la superficie de la CF añadiendo enzima Tn5 al carril a concentración de 50X e incubando a 30 °C durante 30 minutos. La CF se calentó después a 75 °C antes de añadir Transposoma P5 de la solución.

40 El **carril 5** comprende las mismas condiciones que el carril 4, solo que en este caso en lugar de añadir Transposoma P5 de solución, se añadió una biblioteca de 900 pb de *E. coli* (con extremos P5/P7) para determinar si el transposoma unido a superficie P7 permanece activo después de la etapa de calentamiento.

El **carril 6** ilustra la invención puesta en práctica. En este caso la CF comprende una CF de extremos emparejados convencional en la que se hibridó un oligonucleótido que contenía la secuencia de cebador de tagmentación y secuencia de ME' con el oligonucleótido de superficie P7. La primera extensión da como resultado transposones bicatenarios con extremos ME. Los transposomas P7 se ensamblan en la superficie de la CF añadiendo enzima Tn5 al carril a concentración de 50X e incubando a 30 °C durante 30 minutos. Se añadió ADN diana (300 ng de ADN genómico de *E. coli* no fragmentado) al carril de CF y se llevó a cabo una etapa de incubación de 15 minutos a 55 °C para que tenga lugar la tagmentación. El transposoma unido a superficie P7 se retiró por lavado usando PBI (Qiagen) y la CF se calentó después a 75 °C antes de añadir transposoma P5 de solución. Después de la adición del transposoma P5 de solución y una etapa de incubación de 15 minutos a 55 °C, se llevó a cabo una reacción de extensión por desplazamiento de cadena para rellenar los huecos de 9 pb generados en la cadena principal de ADN mediante la reacción de transposición. La reacción de extensión de desplazamiento de cadena comprende la adición de una mezcla de Bst y dNTP e incubación a 65 °C durante 5 minutos. El transposoma P5 se retiró por lavado en la etapa final. En este punto todas las moléculas unidas a superficie deberían ser moldes de P5-P7 y pueden convertirse por lo tanto en grupos.

El **carril 7** comprende las mismas condiciones que el carril 6, solo que en este caso la etapa de calentamiento se ha excluido para destacar el efecto del calor en el número de grupos y el % de alineamiento.

60 El **carril 8** comprende un control negativo donde el transposoma P7 se ha ensamblado en la superficie a concentración 50X en presencia de una concentración de saturación de transposones unidos a superficie bc, sin embargo, no se ha añadido ningún ADN diana. Esto permite una evaluación de si el transposoma P7 unido a la superficie tagmenta en sus transposones unidos a superficie bc adyacentes.

65 **Ejemplo 2**

Preparación de muestras unidas a superficie de un raspado de *E. coli*

Se raspó una muestra de *E. coli* (raspado de 5 mm por 2 mm de un césped en una placa de agar) y se resuspendió en un tubo que contenía agua y perlas de vidrio. Las células y perlas suspendidas se mezclaron usando un mezclador vorticial para romper las células y después se centrifugaron para sedimentar residuos celulares. El sobrenadante (que contenía el lisado celular, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos) se retiró y se añadió a una celda de flujo Genome Analyzer (Illumina, Inc., San Diego, CA) que tenía transposomas inmovilizados según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.

Se realizó generación de grupos en la celda de flujo usando un dispositivo de preparación de muestras Cluster Station (Illumina, Inc., San Diego, CA). Después de la generación de grupos, se realizó un ciclo de secuenciación de extremos emparejados con lecturas de 36 bases en cada dirección.

Para la Lectura 1, el 58,99 % de los grupos pasó los filtros y 92,16 de estos se alineó. Para Lectura 2, el 58,99 % de los grupos pasó los filtros y el 55,08 de estos se alineó. Estos datos confirman que pueden añadirse lisados celulares no purificados directamente a una celda de flujo que tiene transposomas inmovilizados con resultados de secuenciación sorprendentemente robustos.

20 Ejemplo 3

Este ejemplo describe métodos para evitar la tagmentación de dobles cadenas de oligonucleótidos unidas a la superficie cuando se añaden transposomas en fase de solución a una celda de flujo.

Un método para ensamblar transposomas en la superficie de una celda de flujo es tomar una celda de flujo de extremos emparejados convencional, hibridar un oligonucleótido de "refuerzo" frente a los oligonucleótidos injertados en superficie P5 y/o P7 formando un saliente extensible que puede extenderse con una polimerasa para realizar un dúplex que contiene una secuencia de ME bicatenaria. En este estadio puede añadirse enzima transposasa para formar un transposoma unido a superficie funcional (Figura 5d). Si solamente una parte de los dúplex forman un transposoma, los dúplex de ME "desnudos" restantes pueden posteriormente convertirse en dianas para tagmentación mediante transposomas unidos a superficie cercanos o transposomas añadidos de la solución. Además, transposomas de superficie completamente ensamblados contienen partes de ADNbc cadena arriba de las secuencias de ME que también pueden convertirse en dianas para la tagmentación por transposomas unidos a superficie cercanos o transposomas añadidos de solución. Esta tagmentación no deseada se manifiesta en una reducción del porcentaje de grupos que pasan filtros de pureza que se alinean con el genoma diana.

Puede verse un ejemplo de este efecto comparando los carriles 4 y 5 frente a los carriles 6 y 7 en la Figura 18b. En los carriles 6 y 7 se ensamblaron transposomas como se ha descrito anteriormente con los oligonucleótidos de refuerzo largos que, después de extensión y ensamblaje de transposomas, produjeron dúplex unidos a superficie que tienen al menos 50 bases bicatenarias. Tras su uso en una reacción de tagmentación de superficie (Figura 18a) y posterior secuenciación, solamente 22,59 y 15,52 % de los grupos se alinearon con la *E. coli* diana respectivamente (Figura 18b).

Para evitar la producción de una población de grupos que contuvieran secuencias que no se alinearan con el ADN genómico diana, se realizó ensamblaje de transposoma como se indica en la Figura 17. Un oligonucleótido de "refuerzo" se hibridó en primer lugar frente a los oligonucleótidos injertados en superficie P5 y/o P7 formando un saliente extensible que podría extenderse con una polimerasa para realizar un dúplex que contuviera una secuencia de ME bicatenaria. A continuación, el oligonucleótido se retiró deshibridando y lavando, y después se reemplazó hibridando un oligonucleótido más corto de tan poco como 12 bases de longitud pero preferentemente 16 bases de longitud con el extremo 3' del oligonucleótido de ME unido a superficie. Se añadió transposasa para ensamblar un transposoma que no contenía ningún ADNbc expuesto. Se retiró cualquier dúplex "desnudo" que no contuviera una transposasa unida incubando la celda de flujo a 60 °C y lavando en condiciones de flujo para deshibridar selectivamente y retirar el ADN bicatenario corto.

El efecto beneficioso de este enfoque para ensamblar transposomas puede verse en los carriles 4 y 5 donde los transposomas unidos a superficie se ensamblaron por este método y se usaron en una reacción de tagmentación de superficie (Figura 18a). El porcentaje de grupos que se alinearon con *E. coli* aumenta de 22,59 y 15,52 % para el carril 6 y 7 respectivamente, a 96,47 y 96,41 para los carriles 4 y 5 respectivamente (Figura 18b).

Se pretende en el presente documento que la expresión que comprende sea abierta, incluyendo no solamente los elementos enumerados, sino abarcando también cualquier elemento adicional.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una biblioteca inmovilizada de fragmentos de ADN marcados que comprende:

5 (a) proporcionar un soporte sólido que tiene una pluralidad de complejos de transposoma inmovilizados en el mismo, en donde cada complejo de transposoma comprende:

una transposasa unida de manera no covalente a un primer polinucleótido de un ácido nucleico bicatenario que comprende el primer y un segundo polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido está inmovilizado en dicho soporte sólido, y en donde dicho primer polinucleótido comprende

- (i) una parte 3' que comprende una secuencia terminal de transposón y
- (ii) un primer marcador que comprende un primer dominio de marcador;

15 y en donde dicho segundo polinucleótido comprende una región complementaria a dicha secuencia terminal de transposón;

y en donde los complejos de transposoma son homodímeros, comprendiendo los homodímeros una primera pluralidad de homodímeros que comprenden un primer marcador de una primera secuencia y una segunda pluralidad de homodímeros que comprenden un primer marcador de una segunda secuencia;

(b) aplicar un ADN bicatenario diana al soporte sólido en condiciones en las que el ADN diana es fragmentado por los complejos de transposomas y la secuencia terminal de transposón en 3' del primer polinucleótido se transfiere a un extremo 5' de al menos una cadena de los fragmentos; produciendo de este modo una biblioteca inmovilizada de fragmentos bicatenarios en donde al menos una cadena está marcada en 5' con el primer marcador de la primera secuencia y al menos una cadena está marcada en 5' con el primer marcador de la segunda secuencia.

2. El método de la reivindicación 1, en donde se transfiere una secuencia terminal de transposón en 3' de un primer polinucleótido a los extremos 5' de ambas cadenas del ADN bicatenario diana fragmentado.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además lavar el soporte sólido para retirar cualquier ácido nucleico no unido.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde los complejos de transposomas están presentes en el soporte sólido a una densidad de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 complejos por mm^2 , o en donde dicho complejo de transposoma comprende una transposasa Tn5 hiperactiva.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las longitudes de los fragmentos bicatenarios en dicha biblioteca inmovilizada se ajustan aumentando o reduciendo la densidad de complejos de transposomas presentes en dicho soporte sólido.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de los marcadores presentes en dicho soporte sólido comprenden el mismo dominio de marcador.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además:
(c) proporcionar complejos de transposomas en solución y poner en contacto dichos complejos de transposomas en solución con los fragmentos inmovilizados en condiciones en las que el ADN diana es fragmentado adicionalmente por los complejos de transposomas en solución; obteniendo de este modo fragmentos de ácido nucleico inmovilizados que tienen un extremo en solución.

8. El método de la reivindicación 7, en donde los complejos de transposomas en solución comprenden un segundo marcador, generando de este modo fragmentos de ácidos nucleicos inmovilizados que tienen un segundo marcador en solución.

9. El método de la reivindicación 8, en donde los primer y segundo marcadores son diferentes.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de dichos complejos de transposomas en solución comprenden un segundo marcador que comprende un segundo dominio de marcador.

11. El método de la reivindicación 8, que comprende además amplificar los fragmentos en dicha superficie sólida proporcionando una polimerasa y un cebador de amplificación correspondiente a una parte del primer polinucleótido.

12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho dominio marcador comprende una región para la amplificación

de grupos, o una región para cebar una reacción de secuenciación.

13. El método de la reivindicación 1, en donde el soporte sólido comprende micropartículas, o una superficie en patrón, o pocillos.

5

14. Un soporte sólido que tiene una biblioteca de fragmentos de ADN marcados inmovilizados en el mismo preparado según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

15. Un soporte sólido que tiene complejos de transposomas inmovilizados en el mismo, comprendiendo cada
10 complejo de transposoma una transposasa unida de forma no covalente a un primer polinucleótido de un ácido nucleico bicatenario que comprende el primer y segundo polinucleótido, en donde dicho primer polinucleótido se inmoviliza en dicho soporte sólido, y en donde dicho primer polinucleótido comprende

- 15 (i) una parte 3' que comprende una secuencia terminal de transposón y
(ii) un primer marcador que comprende un primer dominio marcador;

y en donde dicho segundo polinucleótido comprende una región complementaria a dicha secuencia terminal de transposón;

20 y en donde los complejos de transposomas son homodímeros, comprendiendo los homodímeros una primera pluralidad de homodímeros que comprenden un primer polinucleótido de una primera secuencia y una segunda pluralidad de homodímeros que comprenden un primer polinucleótido de una segunda secuencia.

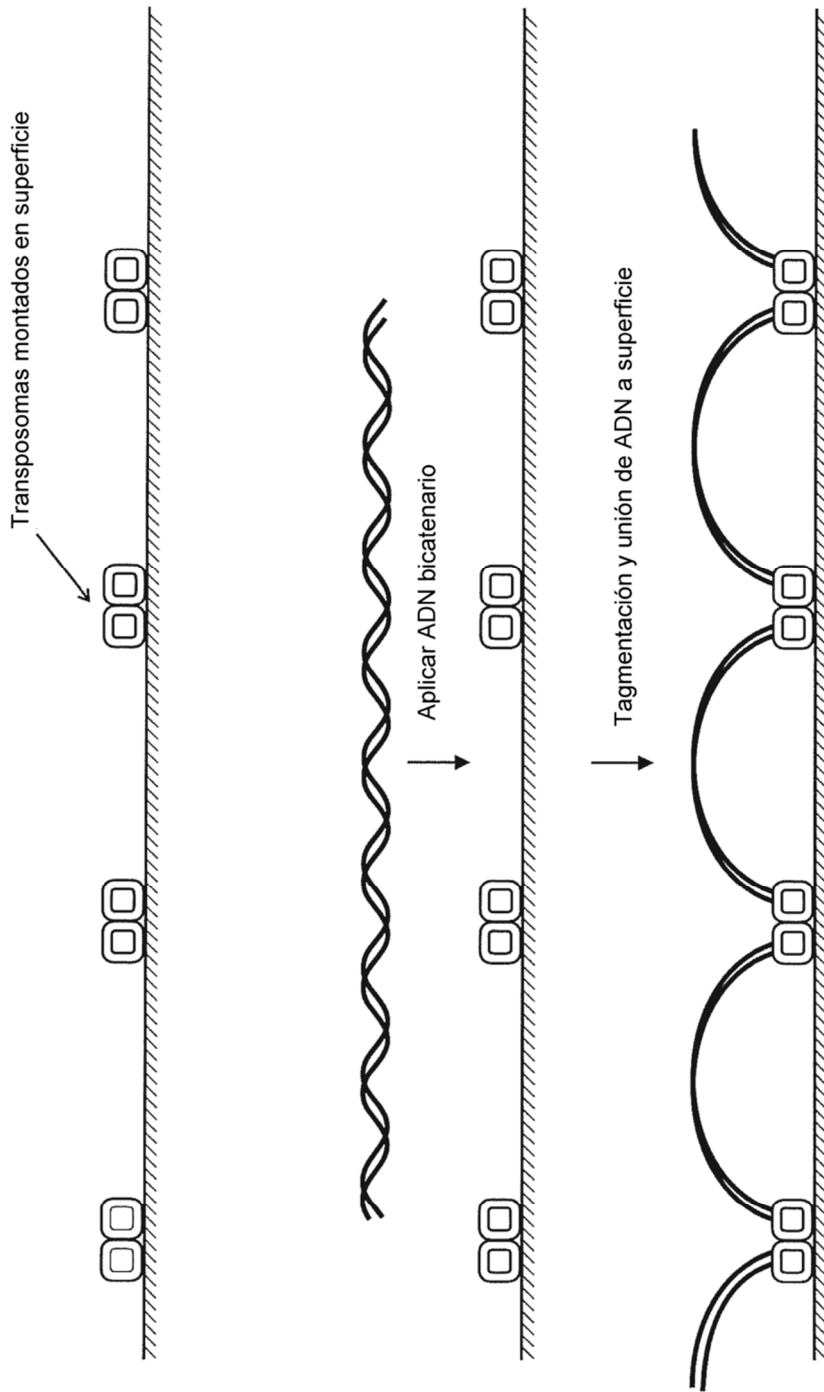


Fig. 1a)

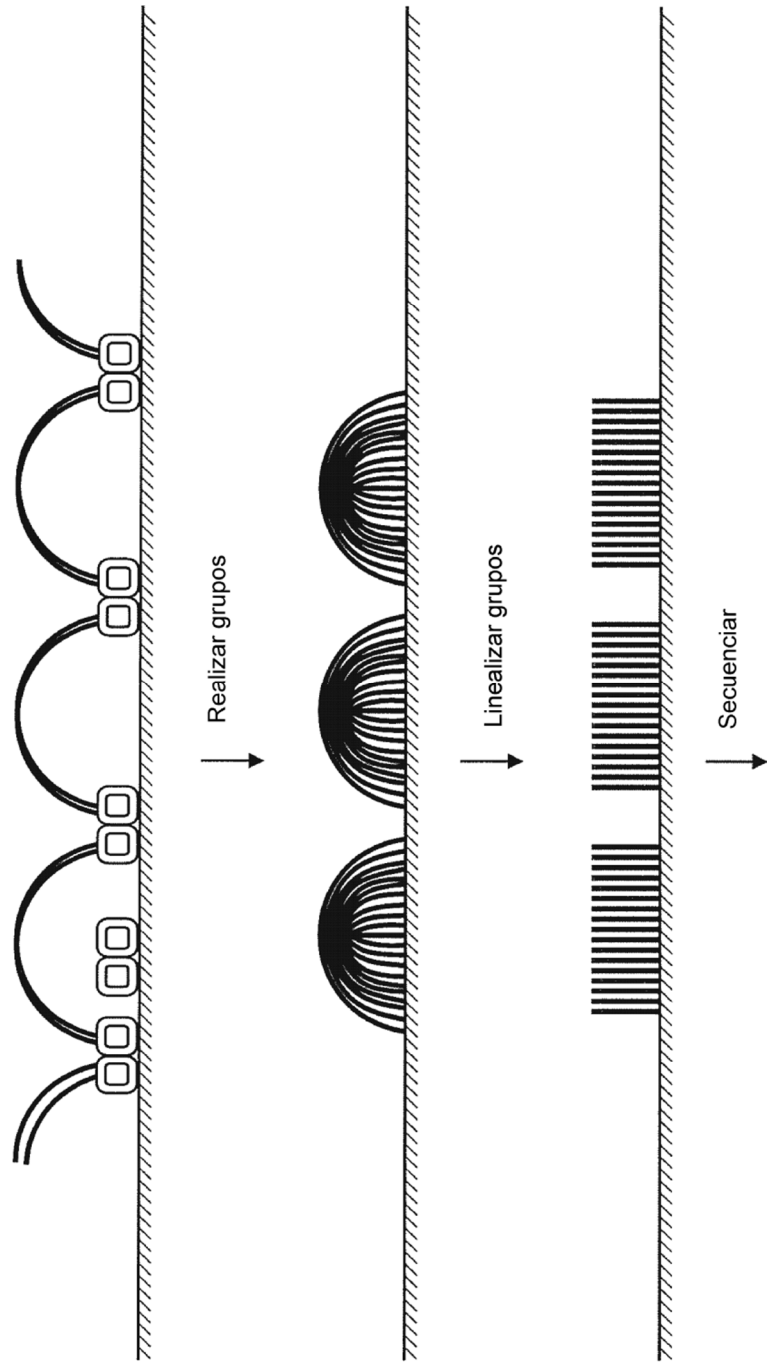


Fig. 1b)

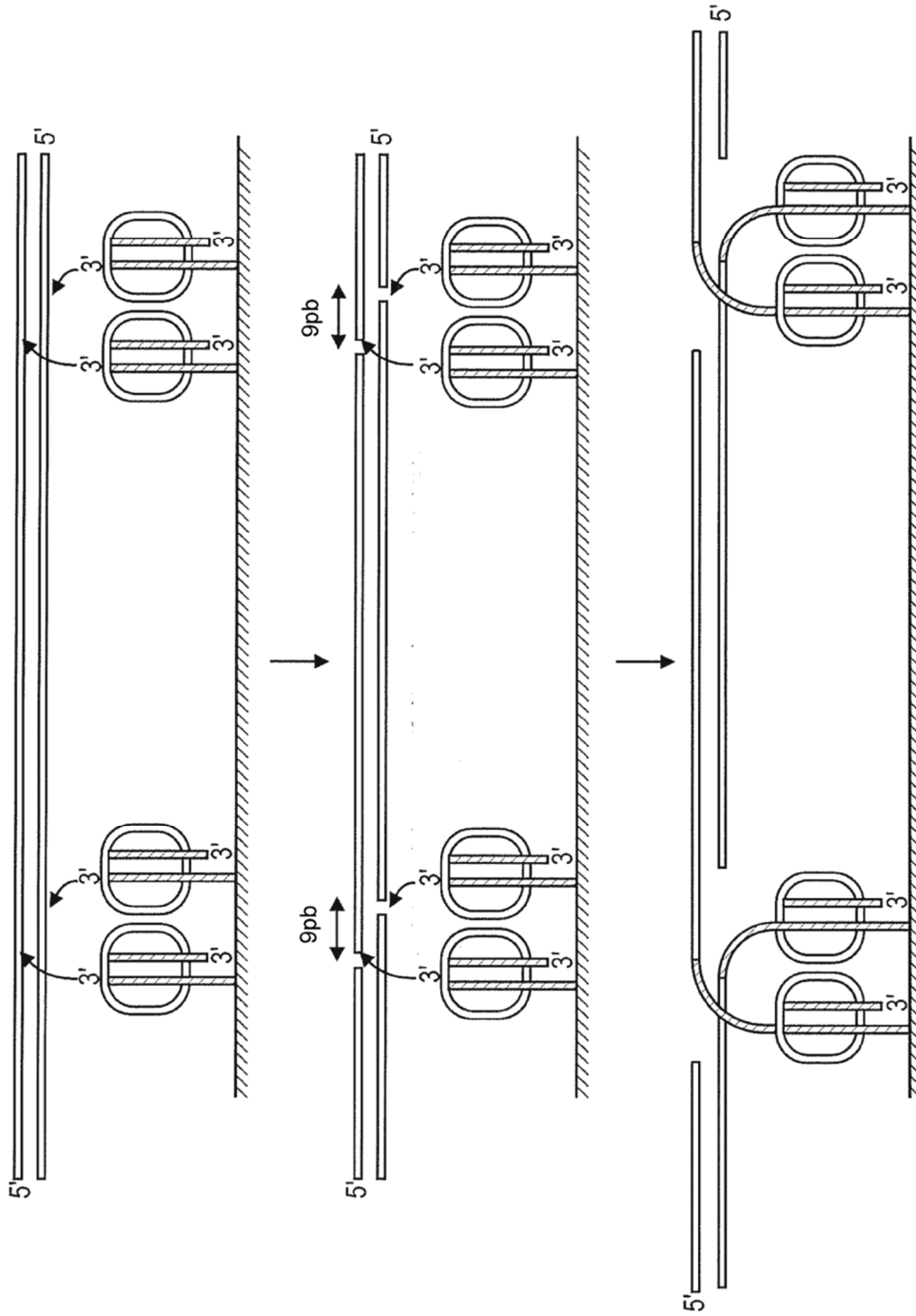


Fig. 2a)

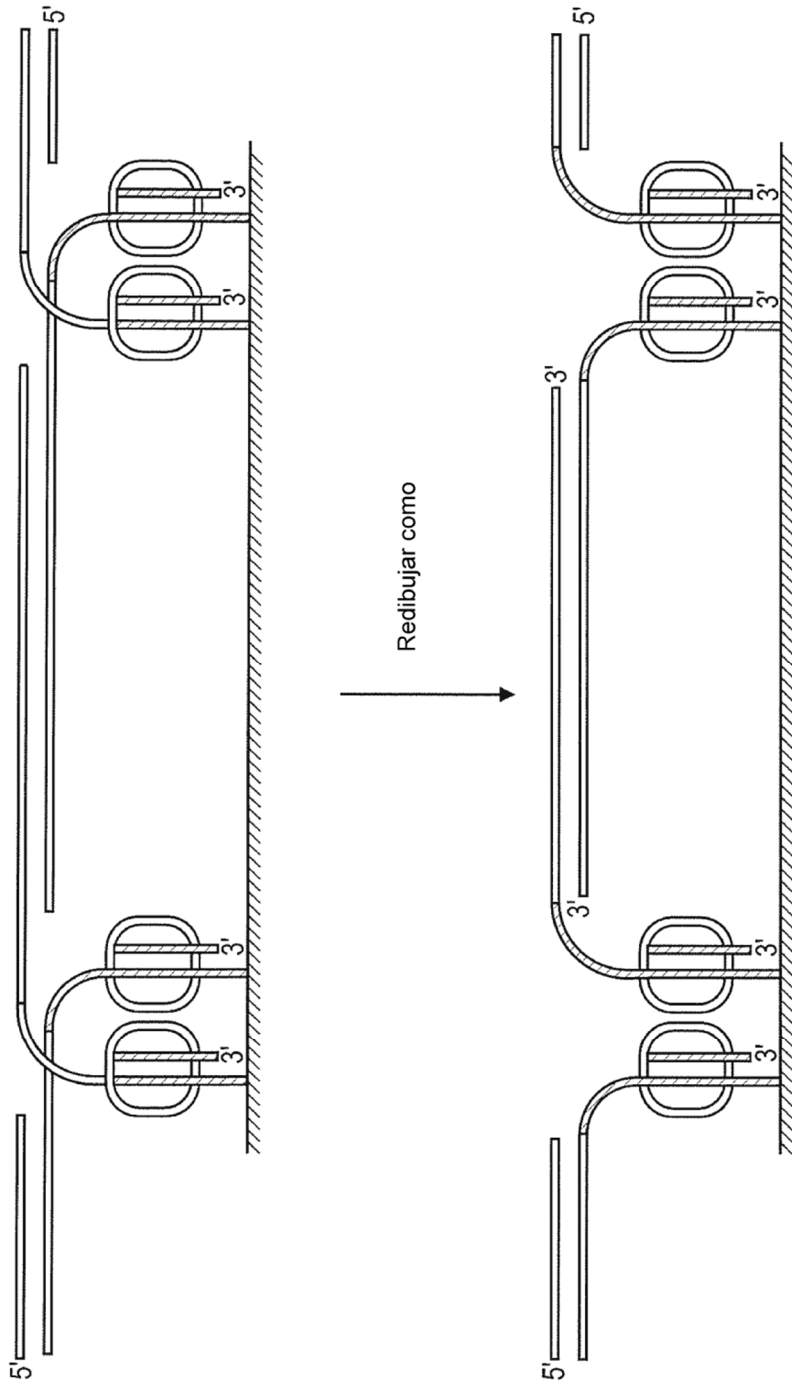


Fig. 2b)

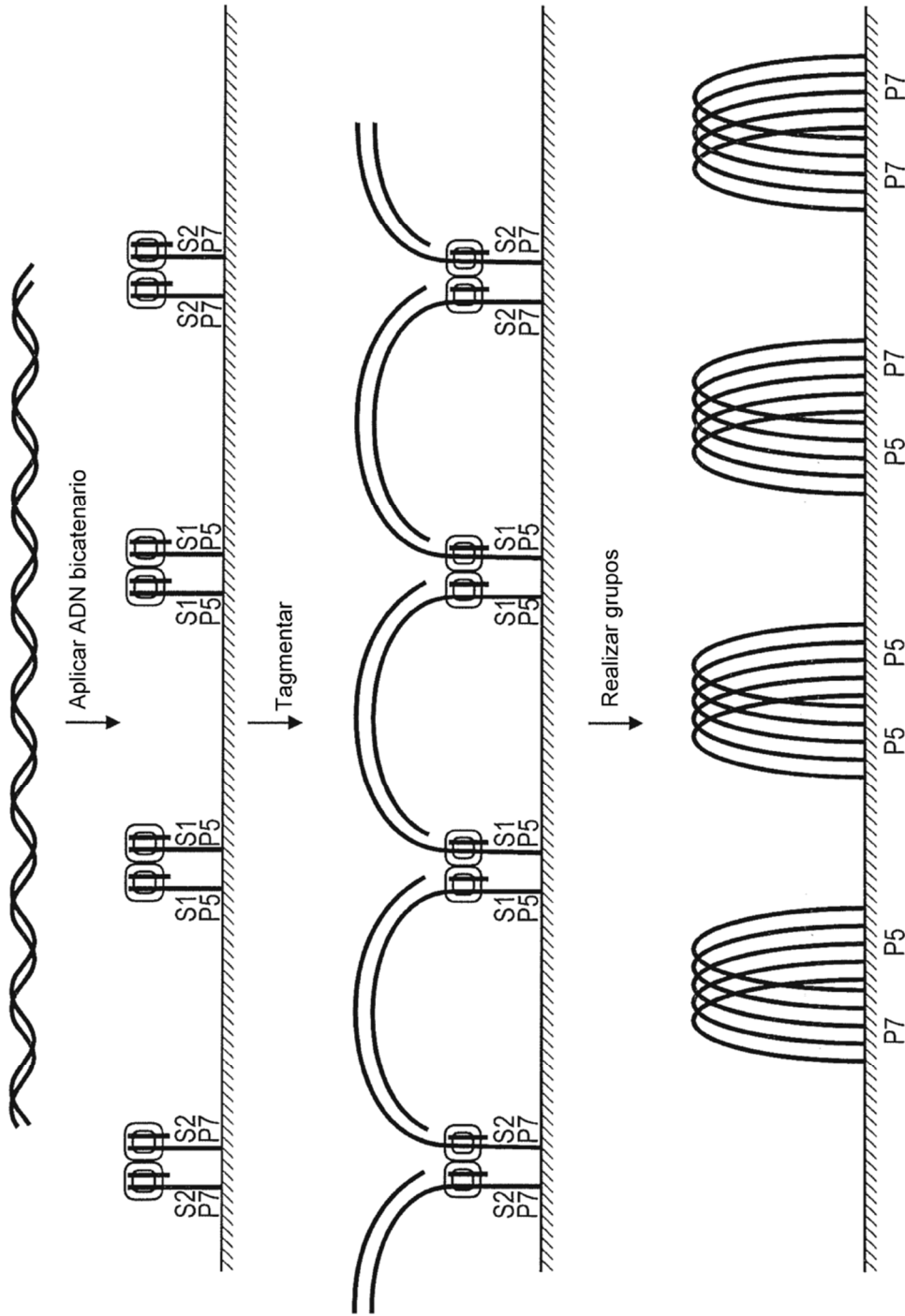


Fig. 3a)

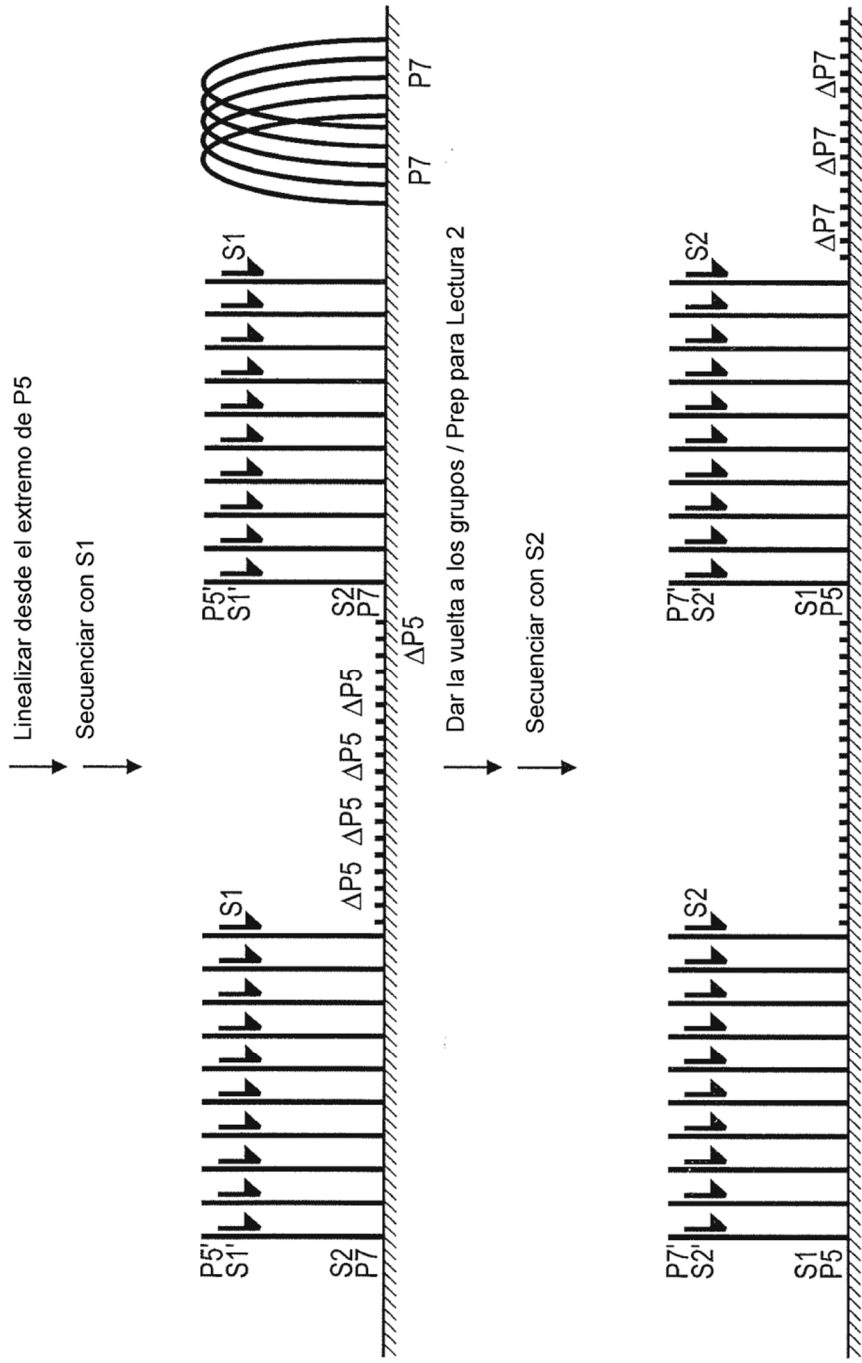


Fig. 3b)

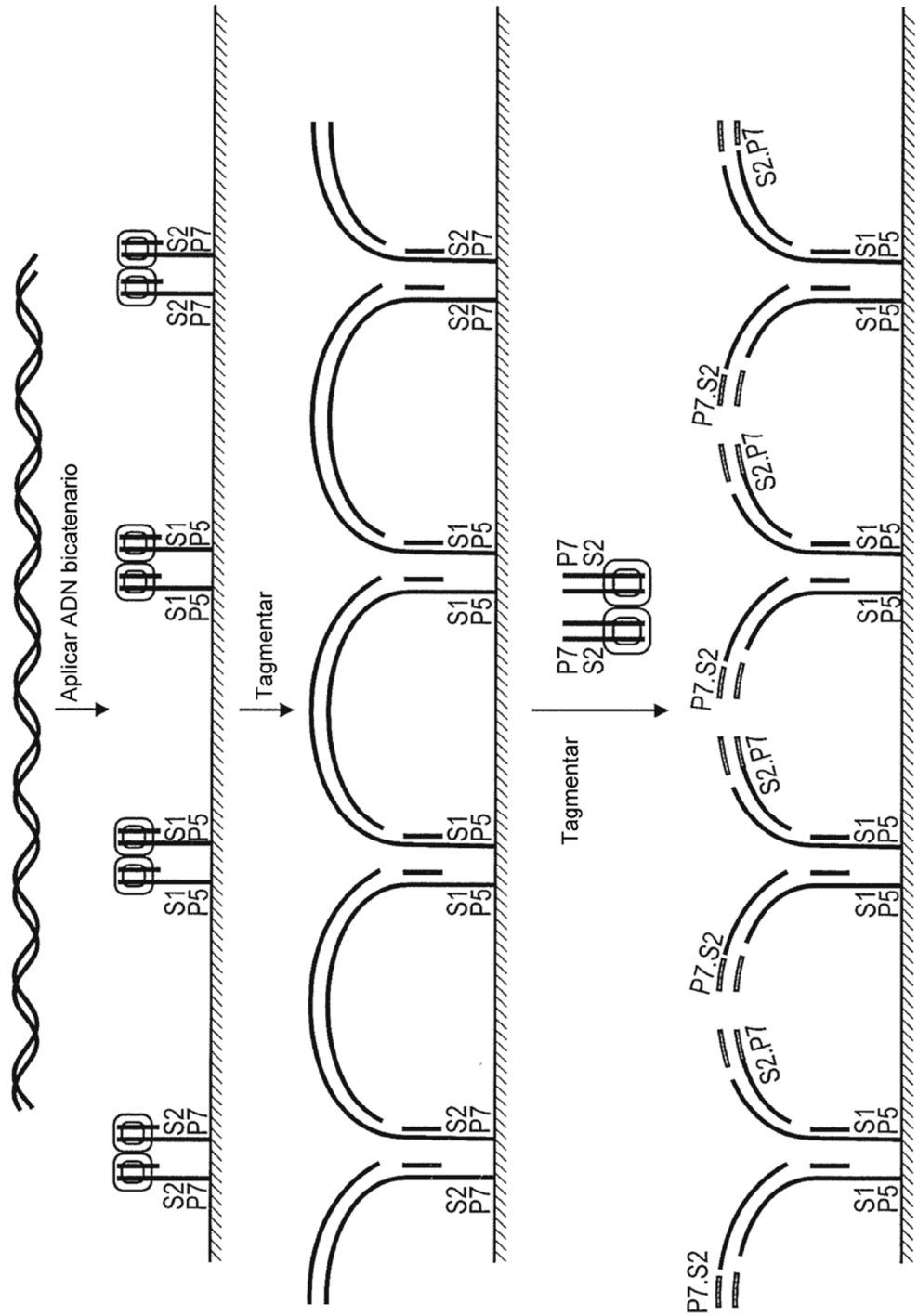
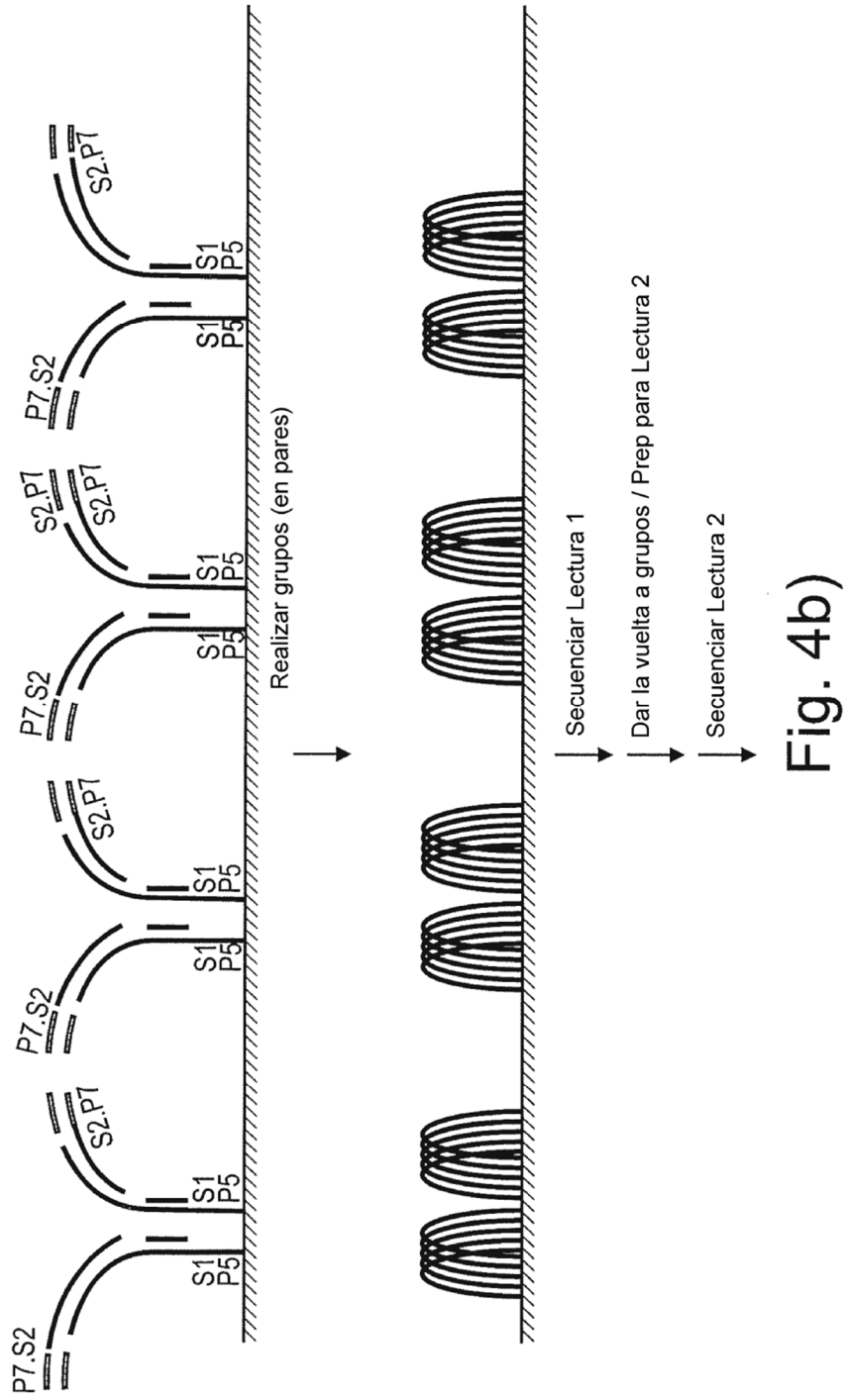


Fig. 4a)



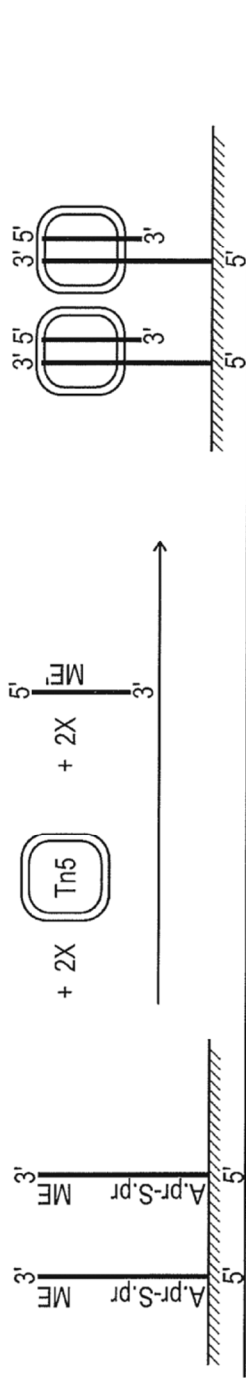


Fig. 5a)

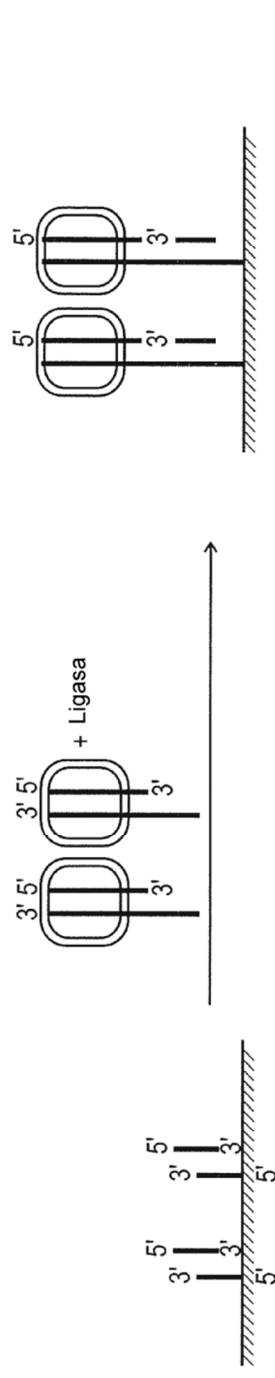


Fig. 5b)

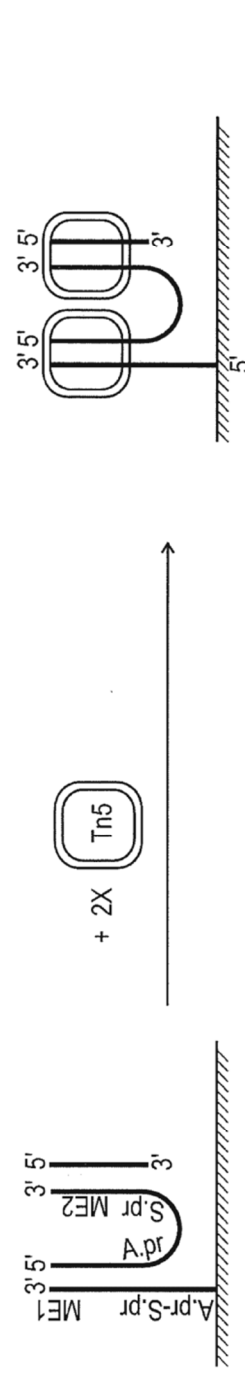


Fig. 5c)

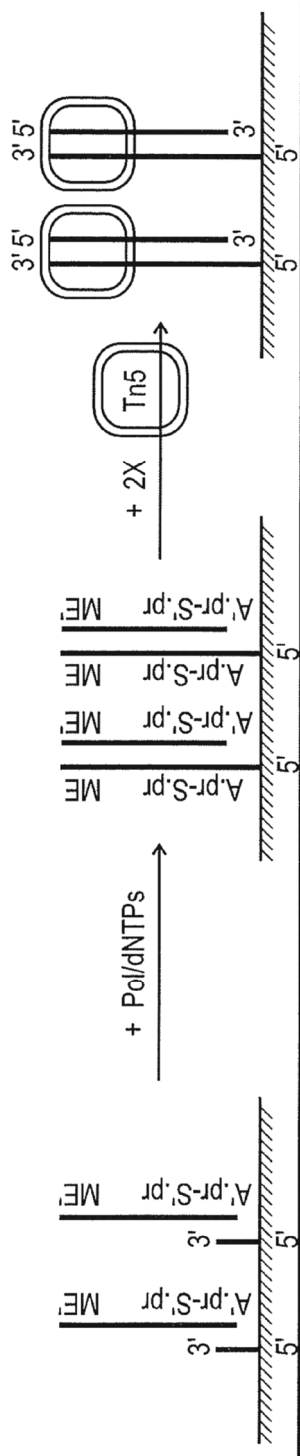


Fig. 5d)

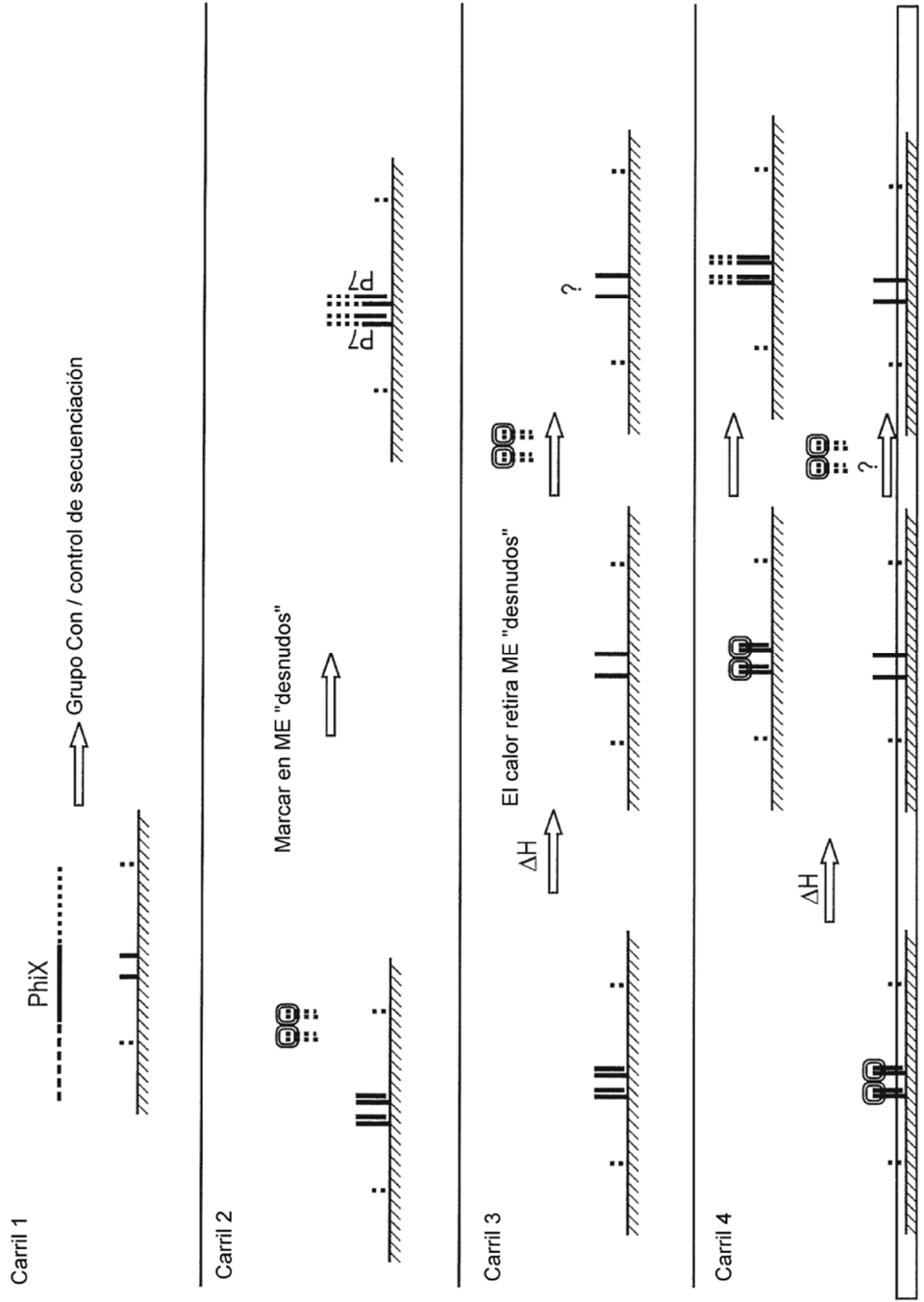


Fig. 6a

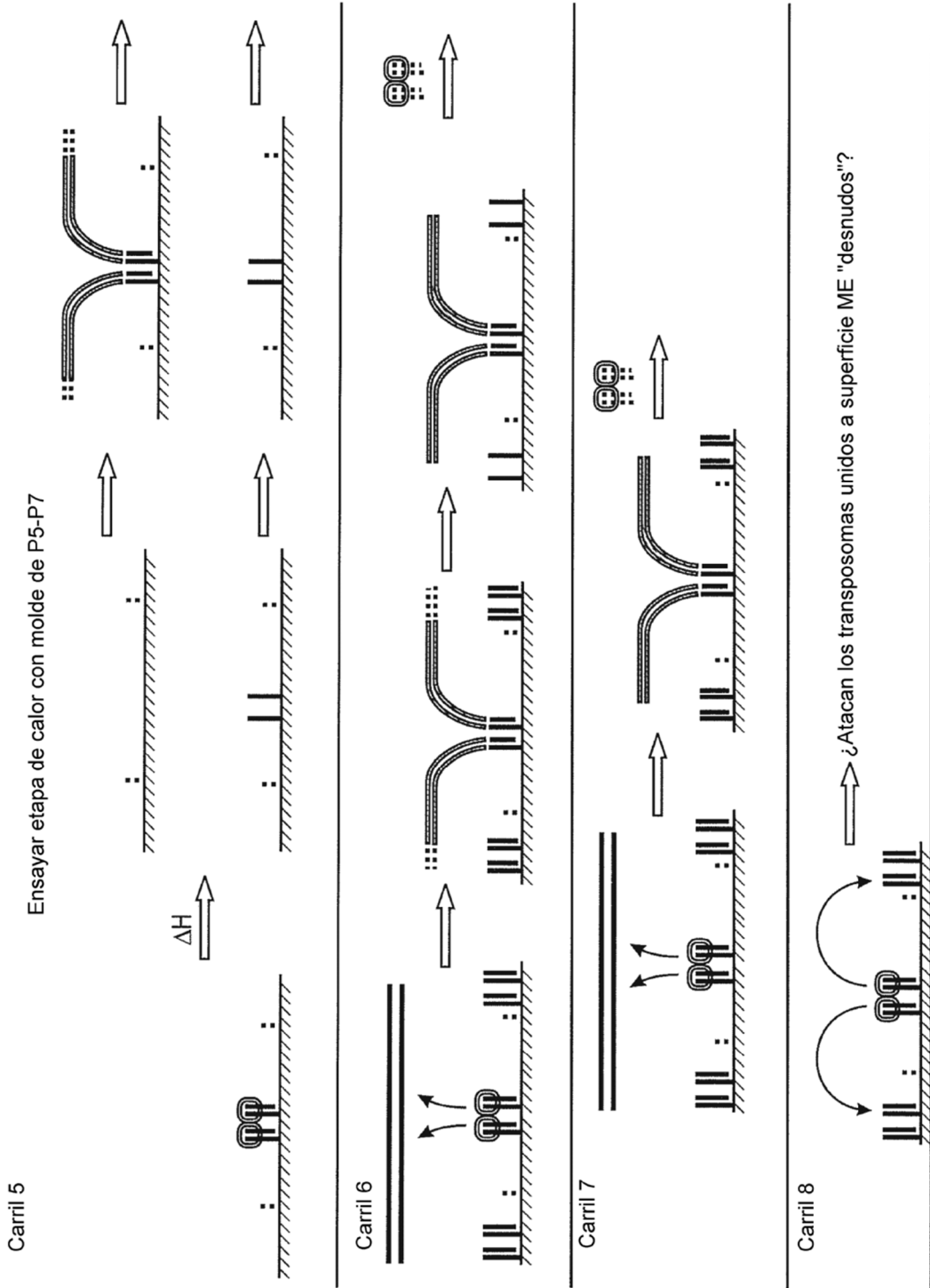


Fig. 6b)

(Condición de carril 6)



	Producción de muestra (Mbases)	Grupos (sin procesar)	Grupos (PF)	1er Ciclo Int (PF)	% de intensidad después de 20 ciclos (PF)	% de Grupos de PF	% de Alineamiento (PF)	% de Tasa de Desapareamiento (PF)	% >=Q30 bases (PF)	Puntuación de Calidad Media (PF)
carril 1	87	2.640.647	2.494.533	335	80,44	94,47	98,29	0,11	99,02	39,38
carril 2	142	4.669.765	4.049.565	199	78,47	86,72	0		95,18	37,56
carril 3	25	1.012.657	728.288	236	76,56	71,92	0		87,69	35,49
carril 4	13	1.660.050	368.331	38	88,69	22,19	0		66,92	28,75
carril 5	0	1.651.305	2.790	104	89,81	0,17	4,23	0,97	33,3	18
carril 6	51	1.992.375	1.457.197	134	83,8	73,14	74,69	0,35	90,27	36,1
carril 7	89	3.508.504	2.545.003	128	80,46	72,54	27,62	0,6	90,51	36,09
carril 8	0	1.191.904	6.629	107	73,09	0,56	0		11,23	7,43

Lectura 1

	Producción de muestra (Mbases)	Grupos (sin procesar)	Grupos (PF)	1er Ciclo Int (PF)	% de intensidad después de 20 ciclos (PF)	% de Grupos de PF	% de Alineamiento (PF)	% de Tasa de Desapareamiento (PF)	% >=Q30 bases (PF)	Puntuación de Calidad Media (PF)
carril 1	87	2.640.647	2.494.533	96	80,99	94,47	96,86	0,19	95,71	37,93
carril 2	142	4.669.765	4.049.565	15	105,29	86,72	0		1,97	2,96
carril 3	25	1.012.657	728.288	18	105,22	71,92	0		2,38	3,16
carril 4	13	1.660.050	368.331	13	92,27	22,19	0		2,18	3,18
carril 5	0	1.651.305	2.790	37	18,39	0,17	0,43	1,43	5,51	5,01
carril 6	51	1.992.375	1.457.197	32	119,21	73,14	17,45	2,26	8,55	7,34
carril 7	89	3.508.504	2.545.003	26	115,87	72,54	4,96	3,31	6,08	5,77
carril 8	0	1.191.904	6.629	81	72,94	0,56	0		5,83	5,40

Lectura 2

Fig. 7

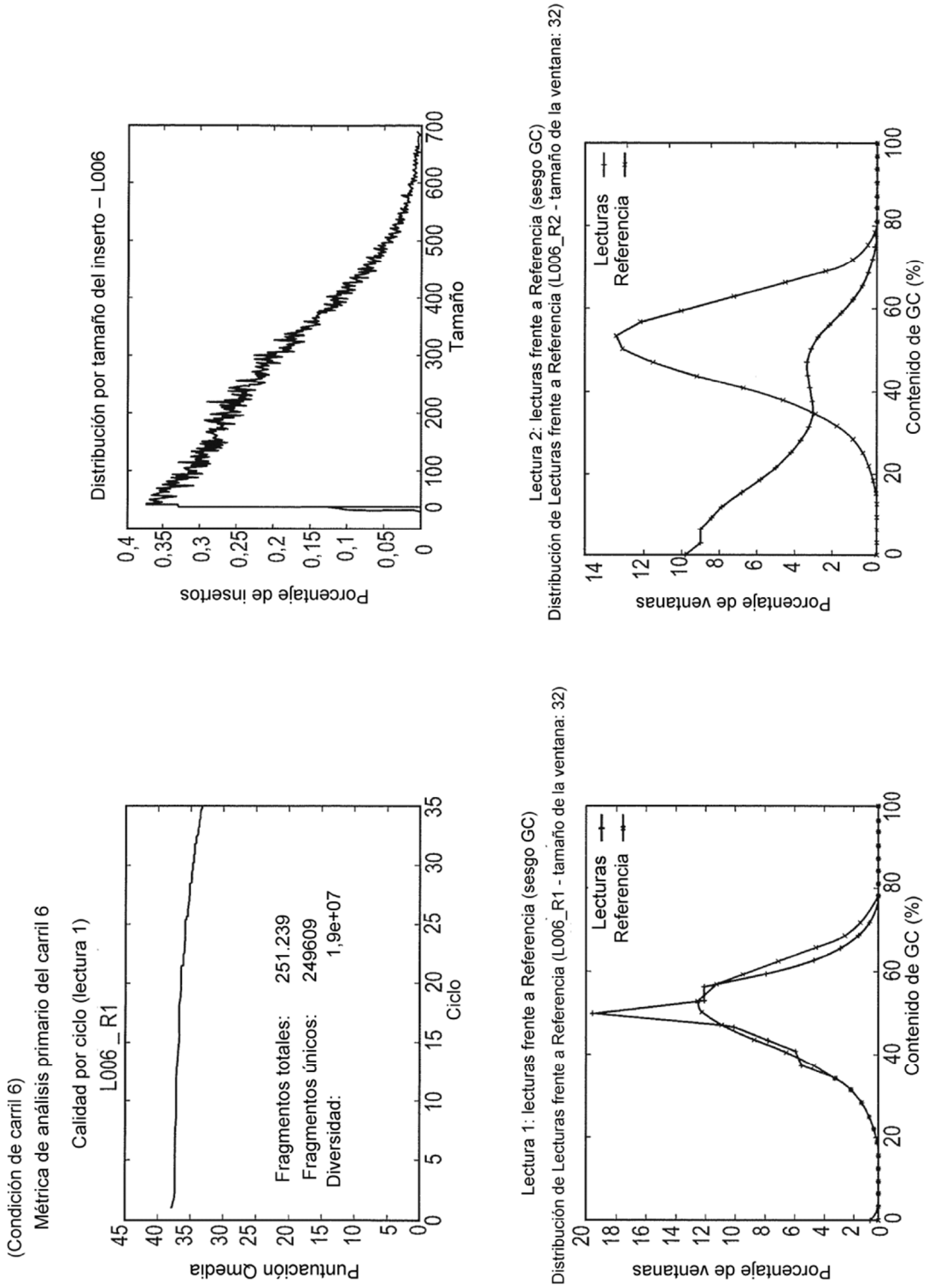


Fig. 8

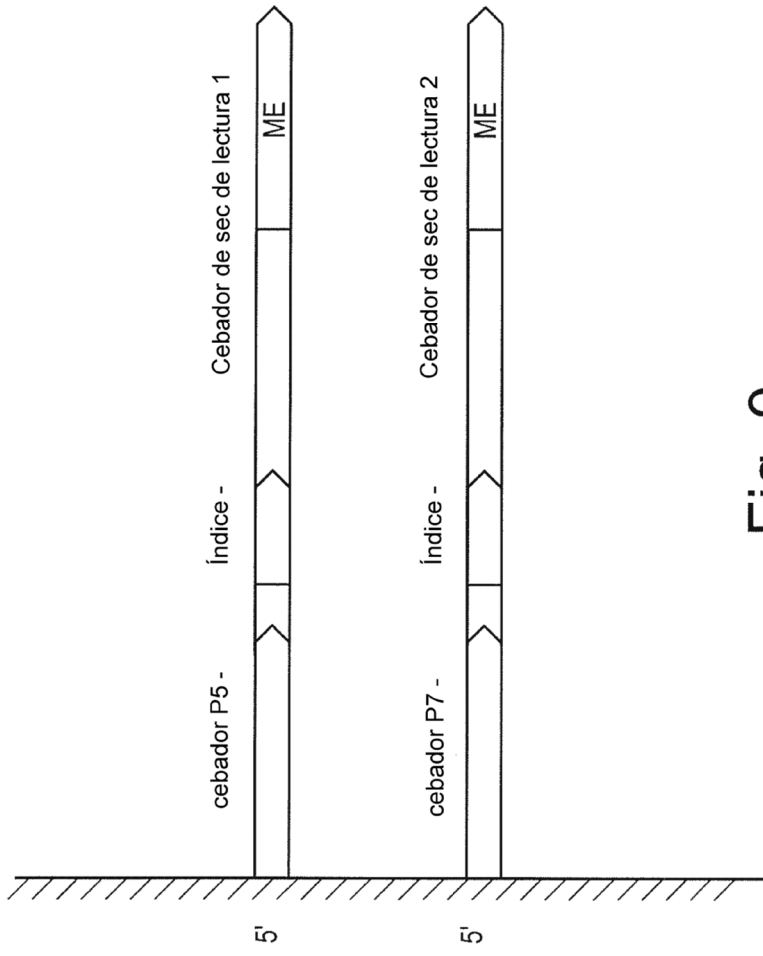


Fig. 9

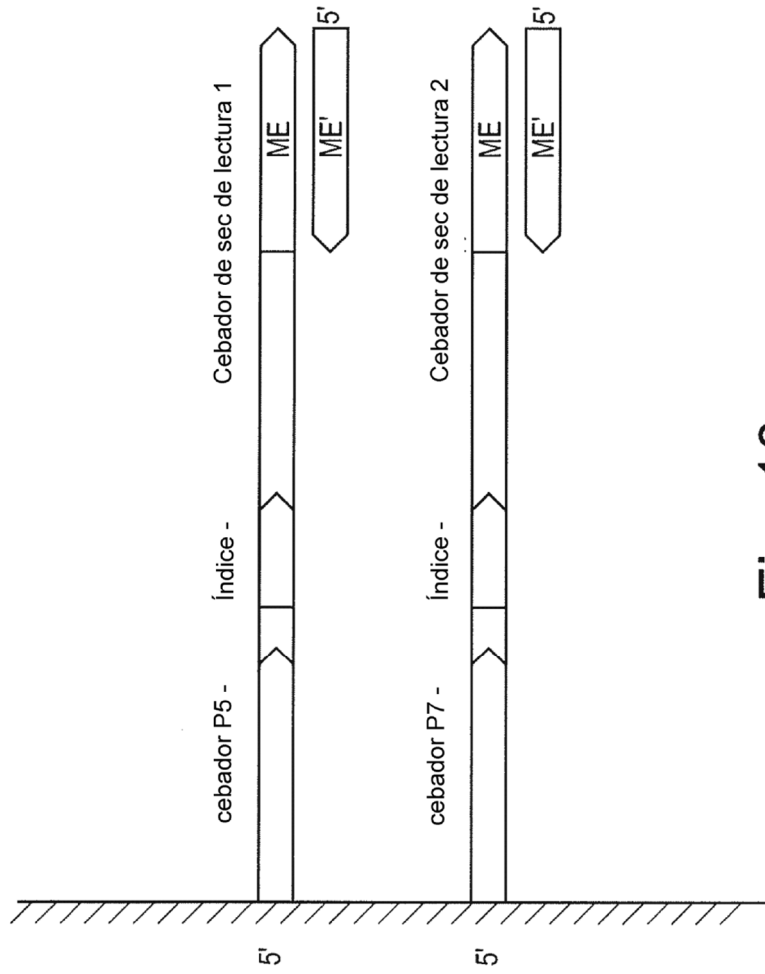


Fig. 10

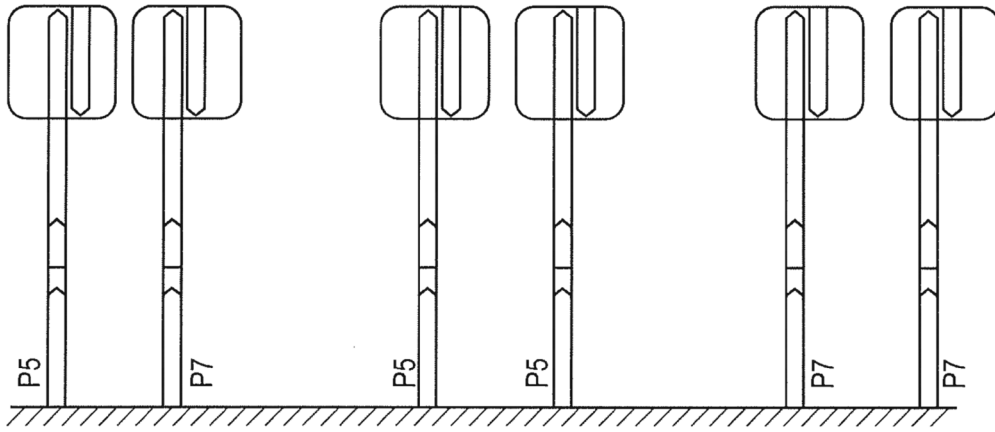


Fig. 11

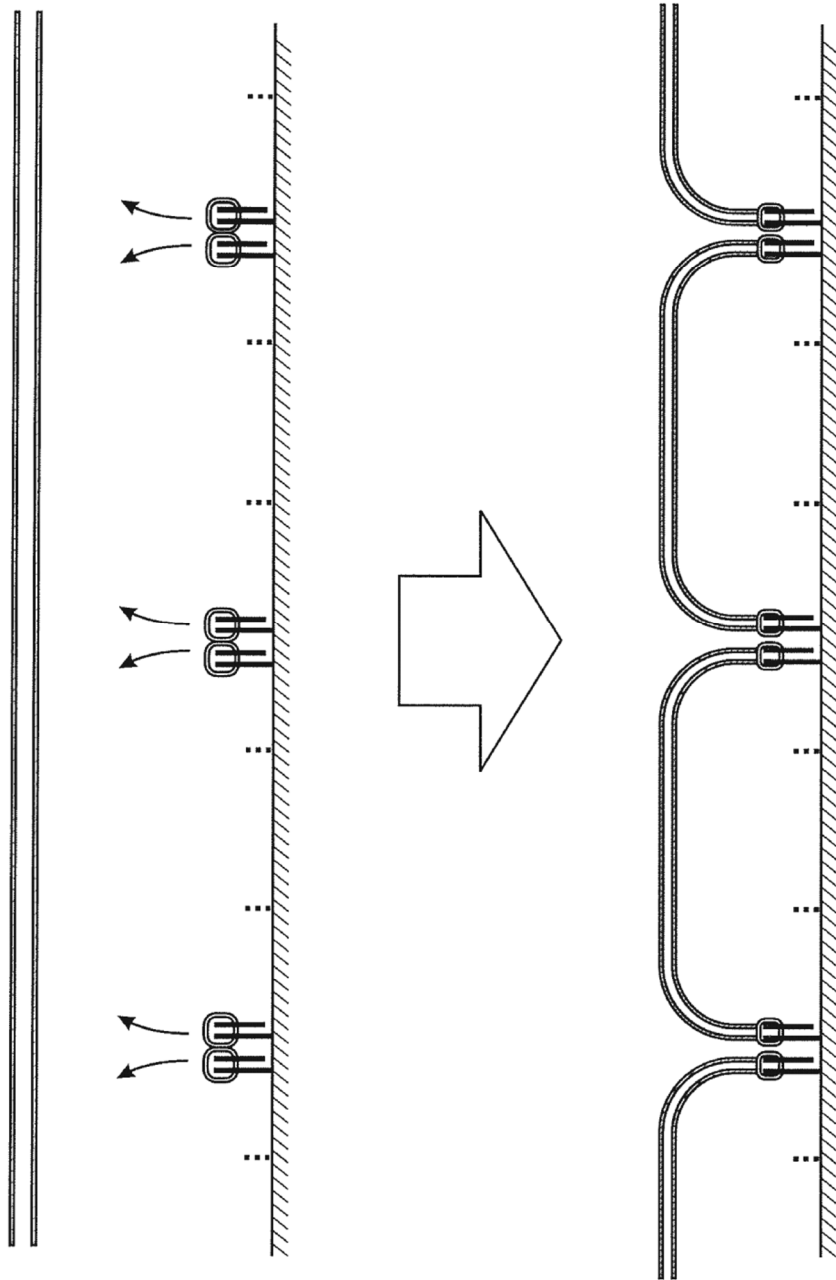


Fig. 12

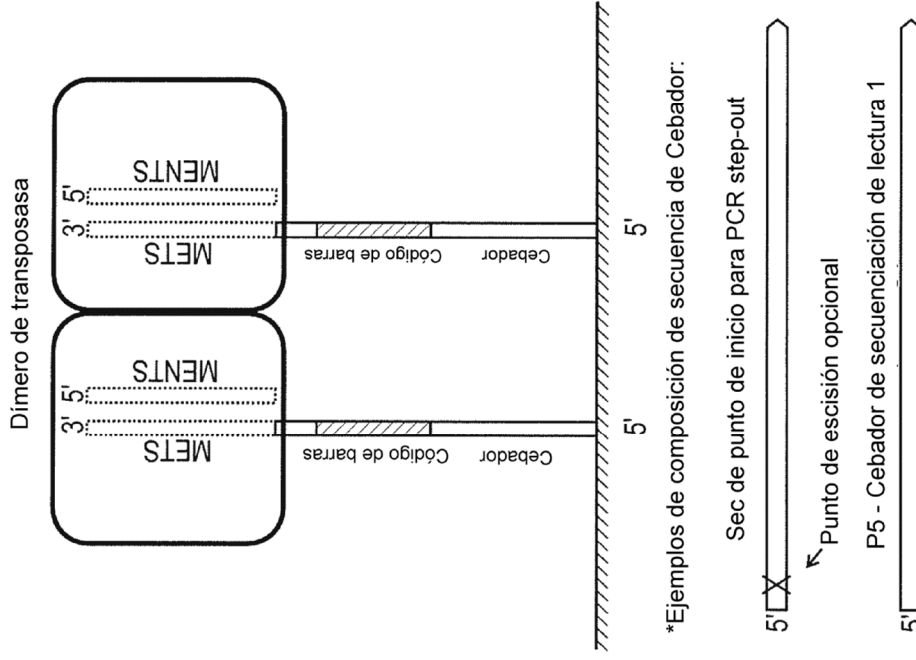


Fig. 13

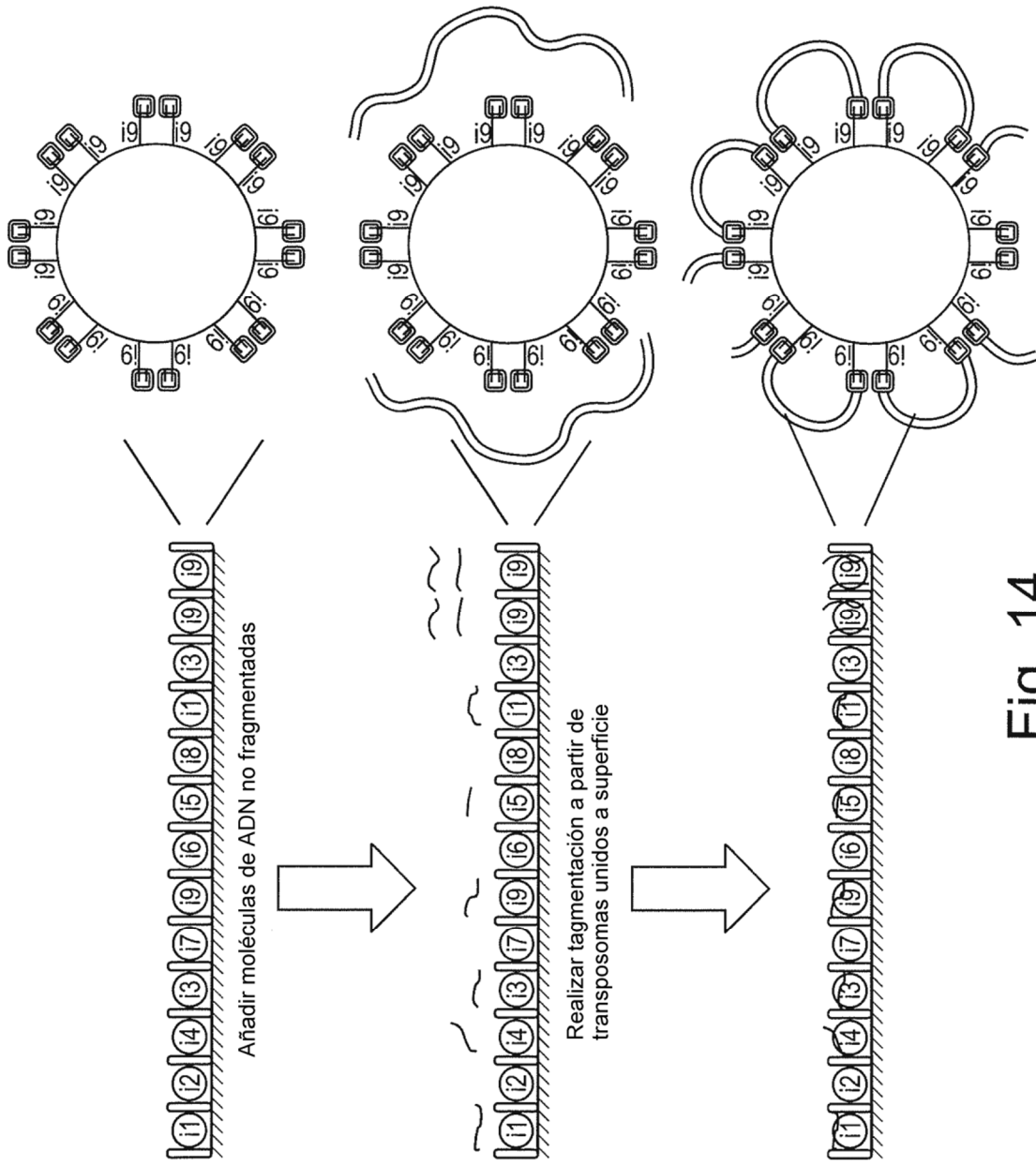


Fig. 14

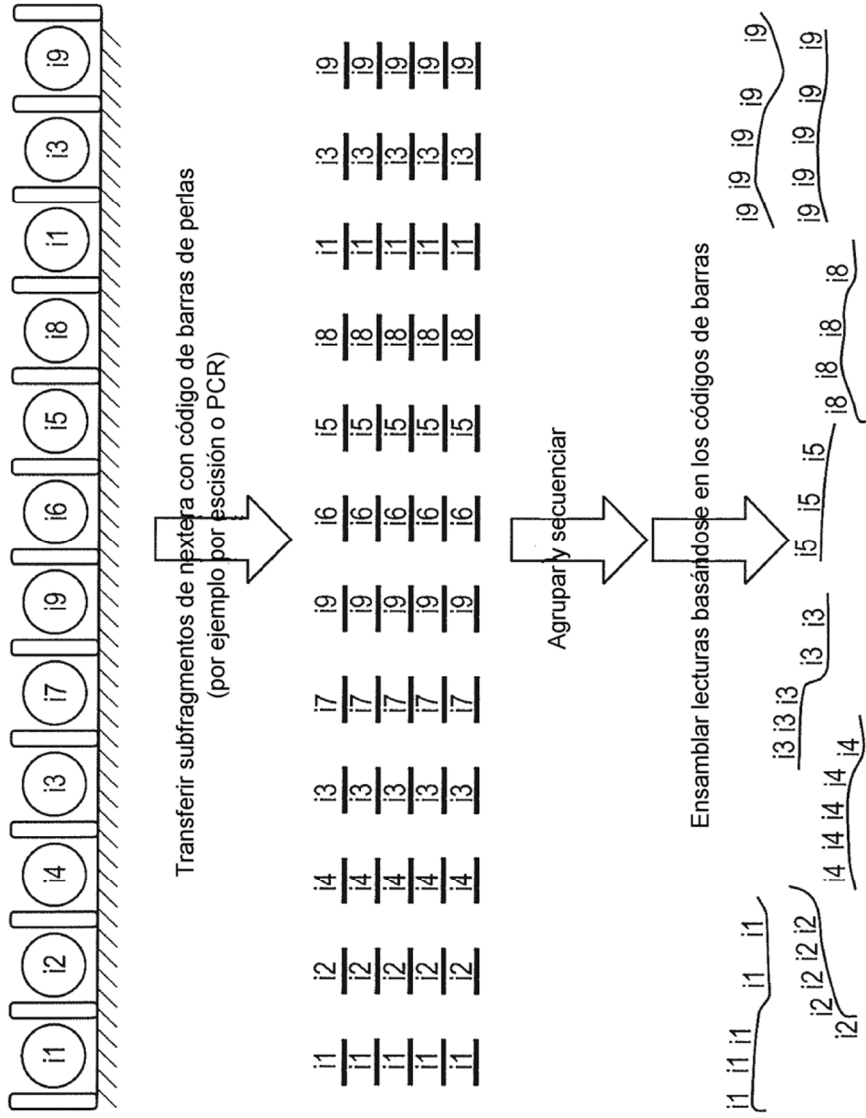


Fig. 15

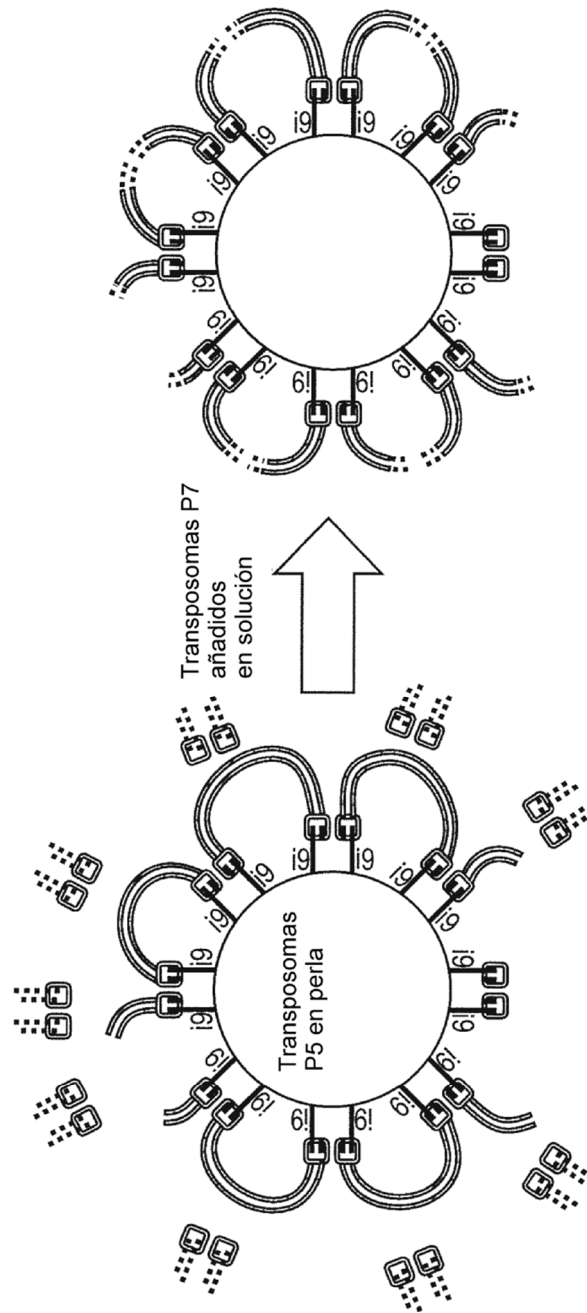


Fig. 16

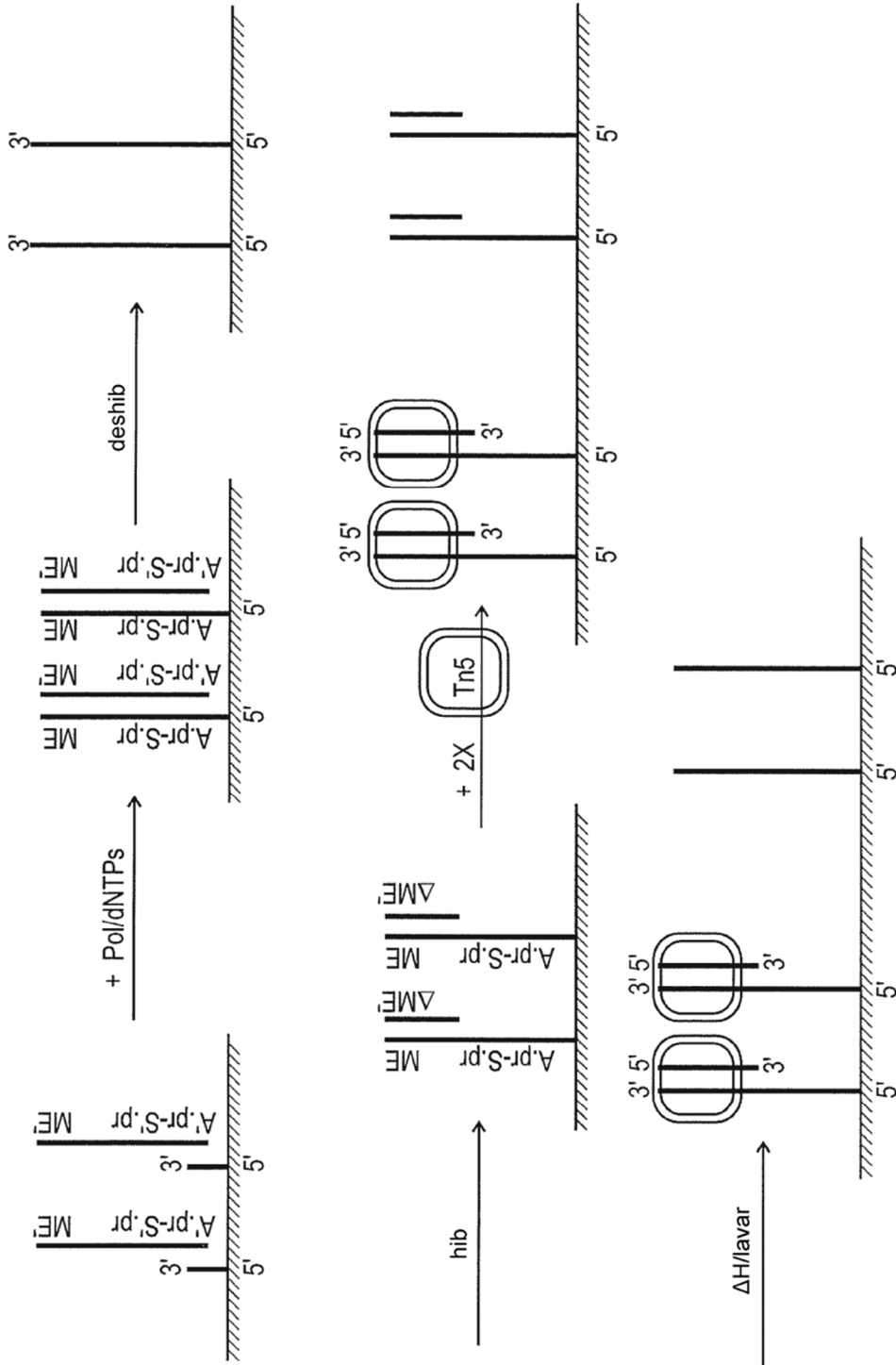


Fig. 17

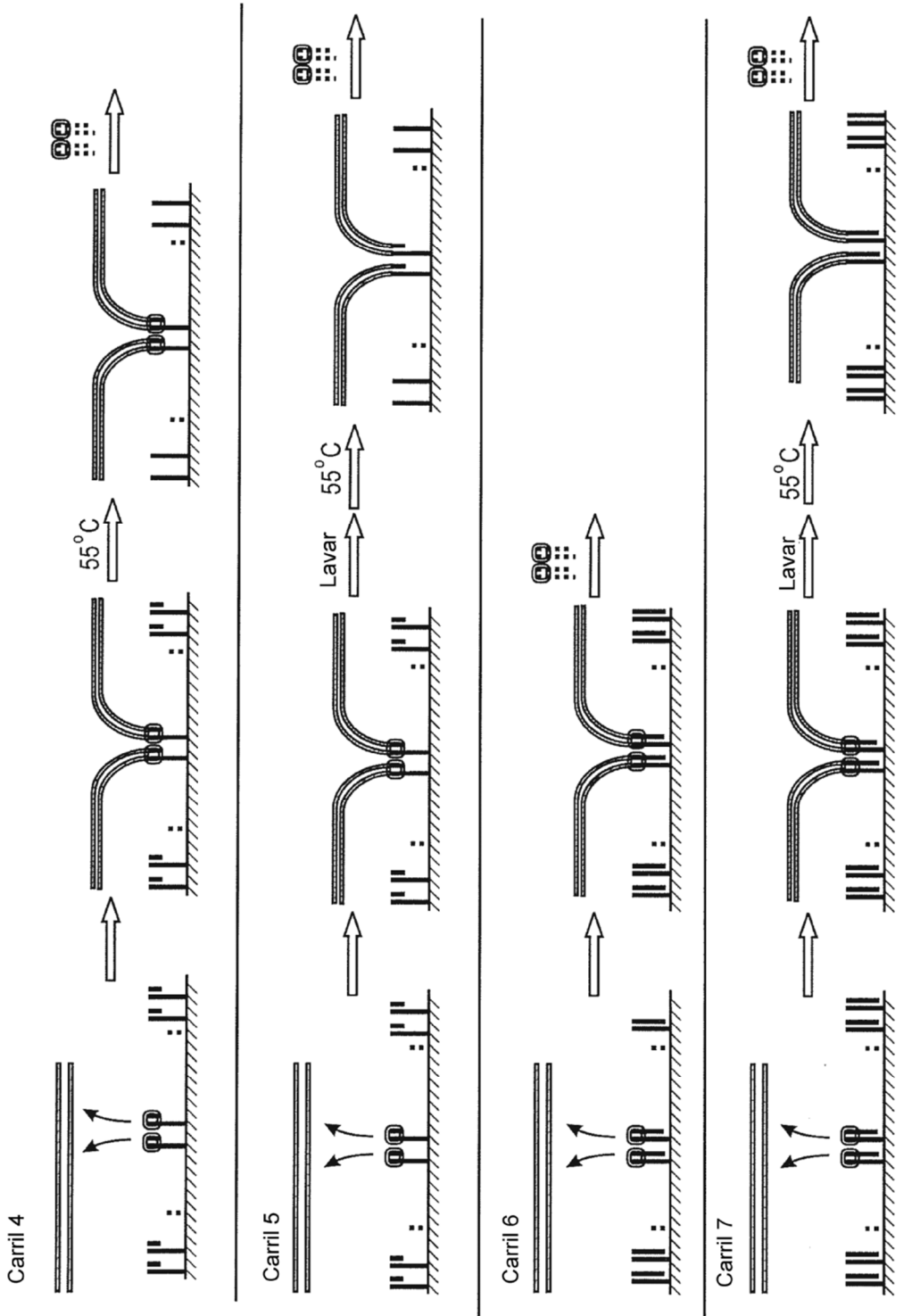


Fig. 18a

	Rendimiento (Mb)	Grupos (sin procesar)	Grupos (PF)	1er Ciclo Int (PF)	% de intensidad después de 20 ciclos (PF)	% de Grupos de PF	% de Alineamiento (PF)	% de Tasa de Desapareamiento (PF)	% >=Q30 bases (PF)	Puntuación de Calidad Media (PF)
carril 1	204	6.172.822	5.821.910	226	84,42	94,32	98,24	0,04	98,75	39,16
carril 2	178	5.676.854	5.096.648	170	84,02	89,78	93,81	0,08	97,78	38,74
carril 3	261	8.915.997	7.450.306	168	82,73	83,56	89,9	0,13	95,42	37,7
carril 4	89	2.963.760	2.542.838	120	85,56	85,8	96,47	0,11	95,99	38,14
carril 5	96	3.223.900	2.728.667	103	83,66	84,64	96,41	0,12	95,22	37,82
carril 6	109	3.801.294	3.103.977	105	85,96	81,66	22,59	0,11	95,21	37,69
carril 7	123	4.239.062	3.513.343	112	85,31	82,88	15,52	0,17	95,64	37,82
carril 8	0	2.230.575	0	0	0	0	0			

Lectura 1

Fig. 18b

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 20121106546 A2 [0003]
- WO 2010048605 A1 [0004]
- WO 2012103545 A1 [0005]
- US 20120530630 A1 [0007]
- 15 • US 20100120098 A [0028] [0029] [0031]
- WO 2005065814 A [0034]
- US 20080280773 A [0034]
- US 13661524 B [0036]
- US 20120316086 A1 [0036]
- 20 • WO 04018497 A [0038] [0067]
- US 7057026 B [0038] [0067]
- WO 9106678 A [0038] [0067]
- WO 07123744 A [0038] [0067]
- 25 • US 7329492 B [0038] [0067]
- US 7211414 B [0038] [0067]
- US 7315019 B [0038] [0067]
- US 7405281 B [0038] [0067]
- US 20080108082 A [0038] [0067]
- 30 • US 7985565 B [0042] [0059]
- US 7115400 B [0042] [0059]
- WO 2012025250 A [0053] [0054] [0056]
- US 20120282617 A [0055]
- 35 • US 8003354 B [0061]
- US 7582420 B [0062] [0072]
- US 5185243 A [0062]
- US 5679524 A [0062]
- US 5573907 A [0062]
- 40 • EP 0320308 B1 [0062]
- EP 0336731 B1 [0062]
- EP 0439182 B1 [0062]
- WO 9001069 A [0062]
- 45 • WO 8912696 A [0062]
- WO 890983 A [0062]
- US 7611869 B [0062]
- US 6214587 B [0063]
- US 5455166 A [0063]
- US 5130238 A [0063]
- US 7670810 B [0063]
- US 6210891 B [0068]
- US 6258568 B [0068]
- US 6274320 B [0068]
- US 1157111 W [0068]
- US 20050191698 A1 [0068]
- US 7595883 B [0068]
- US 7244559 B [0068]
- US 20090026082 A1 [0070]
- US 20090127589 A1 [0070]
- US 20100137143 A1 [0070]
- US 20100282617 A1 [0070]
- US 7001792 B [0071]
- US 6890741 B [0072]
- US 6913884 B [0072]
- US 6355431 B [0072]
- US 20050053980 A1 [0072]
- US 20090186349 A1 [0072]
- US 20050181440 A1 [0072]
- US 20100111768 A1 [0073]
- US 13273666 B [0073]
- US 67031812 A [0081]
- WO 2010115122 A [0089] [0090] [0101]
- US 5604097 A [0105]
- WO 2006064199 A [0109]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 50 • **ADEY et al.** disclose an ultra-low-input, tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing method. *Genome Research*, 2012, vol. 22, 1139-1143 [0006]
- **BENTLEY et al.** *Nature*, 2008, vol. 456, 53-59 [0038] [0067]
- 55 • **MANIATIS et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0045]
- *Short Protocols in Molecular Biology* [0045]
- **LIZARDI et al.** *Nat. Genet.*, 1998, vol. 19, 225-232 [0062]
- 60 • **DEAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 5261-66 [0063]
- **WALKER et al.** *Molecular Methods for Virus Detection*. Academic Press, Inc, 1995 [0063]
- **WALKER et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1992, vol. 20, 1691-96 [0063]
- **LAGE et al.** *Genome Research*, 2003, vol. 13, 294-307 [0063]
- **GROTHUES.** *Nucleic Acids Res.*, 1993, vol. 21 (5), 1321-2 [0064]
- **RONAGHI et al.** *Analytical Biochemistry*, 1996, vol. 242 (1), 84-9 [0068]
- **RONAGHI.** *Genome Res.*, 2001, vol. 11 (1), 3-11 [0068]
- **RONAGHI et al.** *Science*, 1998, vol. 281 (5375), 363 [0068]

5

- **LEVENE et al.** *Science*, 2003, vol. 299, 682-686 [0069]
- **LUNDQUIST et al.** *Opt. Lett.*, 2008, vol. 33, 1026-1028 [0069]
- **KORLACH et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105, 1176-1181 [0069]
- **DEAMER et al.** *Trends Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 147-151 [0071]
- **DEAMER et al.** *Acc. Chem. Res.*, 2002, vol. 35, 817-825 [0071]
- **LI et al.** *Nat. Mater.*, 2003, vol. 2, 611-615 [0071]
- **SONI et al.** *Clin. Chem.*, 2007, vol. 53, 1996-2001 [0071]
- **HEALY.** *Nanomed.*, 2007, vol. 2, 459-481 [0071]
- **COCKROFT et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, vol. 130, 818-820 [0071]
- **WU et al.** *Anal Chem.*, 2011, vol. 4, 1321-7 [0091]
- **NITIN et al.** *Ann Biomed Eng.*, 2009, vol. 37, 2018-2027 [0091]