

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 765**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2016 PCT/US2016/020284**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16144619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2016 E 16762140 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3265590**

54 Título: **Amplificación selectiva de amplicones solapados**

30 Prioridad:

06.03.2015 US 201562129360 P

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

04.07.2019

73 Titular/es:

**PILLAR BIOSCIENCES INC. (100.0%)
12 Michigan Drive
Natick, Massachusetts 01760, US**

72 Inventor/es:

**WANG, ZHAOHUI y
SONG, GANG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 718 765 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

Amplificación selectiva de amplicones solapados

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a un método para amplificar de forma selectiva fragmentos de ácido nucleico diana que presentan una región solapada. El presente método enriquece copias de amplicones diana sobre copias de las regiones solapadas de amplicones.

Referencia al listado de secuencias, tabla o programa de ordenador.

10 El listado de secuencias se presenta aquí de forma simultánea a la especificación como un texto de formato ASCII a través de EFS-Web con el nombre de archivo Sequence Listing.txt con fecha de creación 23 de febrero de 2016, y con un tamaño de 5,11 kilobytes. El listado de secuencias presentado vía EFS-Web es parte de la especificación y se incorpora a la misma en su totalidad mediante referencia en la presente memoria.

Antecedentes de la invención

15 La PCR múltiple consiste en múltiples conjuntos de cebadores dentro de una única mezcla de PCR para producir amplicones que son específicos de diferentes secuencias de ADN. Actuando sobre múltiples genes a la vez, se puede obtener información adicional a partir de un único ensayo realizado que de otro modo requeriría varias veces la cantidad de reactivos y tiempo para ser llevado a cabo. La temperatura de maduración para cada uno de los conjuntos de cebadores debe optimizarse para trabajar correctamente dentro de una única reacción. Se dispone comercialmente de kits de reactivos generales para PCR múltiple. La técnica de PCR múltiple se ha usado para el enriquecimiento de diana para el secuenciamiento de nueva generación (NGS, del inglés “next-generation sequencing”), que se refiere a tecnologías de secuenciamiento de ADN en paralelo de alta capacidad. Se pueden secuenciar simultáneamente millones o miles de millones de cadenas de ADN como método mejorado para la amplificación de ácido nucleico.

La patente EP 0 519 338A1 se refiere a un método mejorado para amplificación de ácido nucleico.

La patente WO 2008/033442 A2 se refiere a métodos y composiciones para llevar a cabo reacciones de amplificación de ácido nucleico múltiples de bajo ruido de fondo.

25 La patente US 8.318.434 B2 describe métodos para introducir una etiqueta de ADN específica de la muestra en una pluralidad de fragmentos de ADN procedentes de una pluralidad de muestras.

30 Una razón principal para la pérdida de amplicones es la amplificación preferencial de las regiones cortas solapadas entre dos amplicones solapados durante la amplificación. Actualmente, para amplificar dos amplicones de ADN solapados, los pares de cebadores dirigidos específicamente a cada uno de los amplicones están separados físicamente en pocillos de reacción, tubos o micro-partículas diferentes. Por ejemplo, los genes BRCA1 y BRCA2 contienen exones grandes que requieren amplificación de PCR de amplicones de ADN solapados para asegurar el 100% de cobertura de bases. Ion AmpliSeq BRCA1 y BRCA2 Panel, Qiagen GeneRead Human BRCA1 y BRCA2 Panel, y Multiplicom BRCA MASTR Dx separan los pares de cebadores en 3, 4, 5 grupos de cebadores, respectivamente, principalmente debido a la incapacidad para amplificar de forma eficiente amplicones solapados. Sin embargo, los grupos de cebadores múltiples complican significativamente el flujo de trabajo y aumentan el coste del ensayo. RainDance Technologies solvente este inconveniente separando los cebadores de PCR en miles de micro-partículas, pero en un instrumento especial costoso.

35 La combinación de todos los cebadores de PCR para dos regiones de ADN solapadas en una reacción múltiple produce cuatro productos que son resultado de cuatro combinaciones diferentes de los dos cebadores directos con los dos cebadores inversos diferentes. La Fig. 1 muestra un método de PCR convencional. Los cuatro productos de PCR (Fig. 1) son dos amplicones diana (Amplicón 1 y Amplicón 2), un amplicón largo (Amplicón 4_largo) que se extiende por toda la región de los dos amplicones diana y un amplicón corto (Amplicón 3_solapado) que contiene solo las regiones solapadas entre los dos amplicones diana. Usando un diseño convencional de cebadores y condiciones de PCR convencionales, durante el ciclado, el amplicón más largo (Amplicón 4_largo) actúa como plantilla de ADN para la amplificación de los cuatro amplicones, y cada uno de los dos amplicones diana (Amplicón 1 y 2) actúa como plantilla de ADN para la amplificación de su propio amplicón, así como del amplicón más corto (Amplicón 3_solapado). Suponiendo que todas las amplificaciones se producen con una eficiencia del 100%, en el ciclo de PCR n , la cantidad de los cuatro productos – Amplicón 1, Amplicón 2, Amplicón 4_largo y Amplicón 3_solapado – será $n \times 2^n$, $n \times 2^n$, 2^n y $n^2 \times 2^n$, respectivamente. La cantidad del amplicón más corto (Amplicón 3_solapado) es n veces mayor que la de cada uno de los dos amplicones diana (Amplicón 1 y 2), que a su vez es n veces mayor que la cantidad del amplicón más largo (Amplicón 4_largo).

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Ilustra una PCR múltiple tradicional (técnica previa), para la amplificación de segmentos diana solapados.

Fig. 2. Ilustra una realización de una primera ronda de PCR de la presente invención, que es la amplificación mediante

5 cebadores específicos de diana. F1 y R1 son los cebadores directo e inverso del segmento diana 1, mientras que F2 y R2 son los cebadores directo y reverso del segmento diana 2. F2[^] es una secuencia parcial de la porción de extremo 5' del cebador F2. Los oligómeros etiqueta de t1, t2 y t3 no se unen a la diana. Las etiquetas t2 y t3 pueden compartir las mismas secuencias y t1 ser diferente. 1, 2, 3 y 4 indican los productos de amplificación de la combinación de cuatro cebadores. La amplificación del Amplicón 3, los productos cortos de F2 y R1, es inhibida por la formación de una estructura de tallo-bucle.

Fig. 3. Muestra los tamaños y las localizaciones de los Amplicones 1-4 en el cromosoma 13 humano correspondientes a los Ejemplos 1 y 2.

10 Fig. 4. Muestra los resultados de electroforesis de gel de agarosa de los productos de amplificación después de la primera ronda de PGR (Ejemplos 1 y 2).

Fig. 5. Es una ilustración esquemática de los amplicones específicos de gen usados en los ejemplos 3-6. CDS: región de secuencia codificadora de proteína de un gen; ROI: región de interés. En este ejemplo, ROI incluye la CDS del exón 27 de gen BRCA2 más 20 pb por encima y 20 pb por debajo del exón 27 (CDS ± 20 pb).

15 Fig. 6. Muestra los resultados de electroforesis de gel de agarosa de productos de amplificación después de la primera ronda (Ejemplo 3) y de la segunda ronda de PCR (Ejemplo 4).

Fig. 7. Es un gráfico que muestra los datos de cobertura a partir de los resultados de NGS de amplicones (Ejemplo 6).

Descripción detallada de la invención

Definición

20 Un "amplicón" es un trozo de ADN o ARN que es la fuente y/o el producto de eventos de amplificación o replicación artificiales. En este contexto, "amplificación" se refiere a la producción de una o más copias de un fragmento genético o de una secuencia diana, específicamente el amplicón. Como producto de una reacción de amplificación, amplicón se usa de forma indistinta con términos de laboratorio comunes, tal como producto de PCR.

25 "Ácidos nucleicos bloqueados" (LNA[™]) son una clase de análogos de ARN de alta afinidad en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente de metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C, dando como resultado la conformación ideal para la unión de Watson-Crick. Esta modificación aumenta significativamente la temperatura de fusión de un oligonucleótido y también es muy resistente a nucleasa (www.exiqon.com/lna-technology).

30 "Ácidos nucleicos de péptido" (PNAs) son homólogos sintéticos de ácidos nucleicos en los que la cadena principal de fosfato-sacárido polinucleótido es reemplazada por un polímero de pseudo-péptido flexible, al cual están unidas las nucleobases. Debido a que la cadena de PNA no tiene carga, el dúplex PNA-ADN tendrá una temperatura de fusión mayor que el correspondiente dúplex ADN-ADN.

"Cebadores (de PCR) universales" son cebadores no específicos de diana que se hibridan con etiquetas universales (etiquetas no específicas de diana tales como, p.ej., t1, t2 y/o t3 en la Fig. 2) que acompañan a ambos extremos de cualesquier secuencias de inserto de ADN. La PCR que usa cebadores universales puede amplificar cualquier inserto de ADN que esté acompañado por sus secuencias de etiqueta complementarias.

35 Los inventores han descubierto una tecnología de PCR múltiplex escalable, SLIMAMP[™] (del inglés "Stem-Loop Inhibition-Mediated Amplification), que permite la amplificación en paralelo de cientos de miles de amplicones en un tubo. Este nuevo método de PCR múltiplex puede amplificar simultáneamente amplicones solapados sin las desventajas de la PCR múltiplex convencional, que amplifica predominantemente las secuencias de ácido nucleico solapadas cortas. El presente método es un método de enriquecimiento de diana, que enriquece en copias de amplicones diana sobre las copias de las regiones de amplicones solapadas.

La presente invención está dirigida a un método para amplificar de forma selectiva fragmentos de ácido nucleico que tienen una región solapada, sin una amplificación predominante de las secuencias cortas de ácido nucleico solapadas. La presente invención permite el uso de todos los cebadores en un único conjunto de cebadores, sin introducir ningún equipamiento caro adicional.

45 El presente método comprende las etapas de: (a) obtener una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una primera etiqueta t2 y un primer cebador directo F1, (t2F1), complementario a un primer fragmento de ácido nucleico diana (amplicón 1), donde t2 está en posición extremo 5' respecto a F1; (b) obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una segunda etiqueta t1 y un primer cebador inverso R1 (t1R1), complementario al primer fragmento de ácido nucleico diana (amplicón 1), donde t1 está en posición extremo 5' respecto a R1; (c) obtener una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende la segunda etiqueta t1 y un segundo cebador directo F2, (t1F2), complementario a un segundo fragmento de ácido nucleico diana (amplicón 2), donde t1 está en posición de extremo 5' respecto a F2; (d) obtener una cuarta secuencia de ácido nucleico que comprende una tercera etiqueta t3 y un segundo cebador inverso R2, (t3R2), complementario al segundo fragmento de ácido nucleico (amplicón 2), en donde t3 está en posición extremo 5' respecto a R2, en donde el primer y el segundo fragmento de ácido nucleico diana

tienen una región solapada; (e) mezclar el primer y el segundo fragmento de ácido nucleico diana, la primera, la segunda, la tercera y la cuarta secuencia de ácido nucleico, y una cantidad efectiva de reactivos necesaria para llevar a cabo la reacción en cadena de polimerasa (PCR); (f) someter a ciclos la mezcla de (e) con etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR durante al menos dos veces; y (g) someter la mezcla a ciclos de (f) con etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR a una temperatura de maduración superior a la de la etapa (f) para obtener productos de amplificación. Las etapas del método anterior describen una primera ronda de ciclos de PCR.

F1, R1, F2, R2 son cebadores específicos de gen, que son complementarios a regiones específicas de ADN genómico. La longitud de dichos cebadores puede ser elegida por una persona especialista en la técnica. En general, los cebadores específicos tienen una longitud de 10-50, 10-40, 10-100, 20-40 o 20-50 nucleótidos.

Las etiquetas t1 y t2 son dos secuencias de etiqueta universales diferentes. La etiqueta t3 puede tener una secuencia igual o diferente a la de t2. Los oligómeros de etiqueta de t1, t2 y t3 no se unen a las secuencias diana. Cada etiqueta se encuentra en el extremo 5' de cada cebador específico de gen.

La presente invención se ilustra en la Fig. 2. La Fig. 2 solo tiene fines ilustrativos y no pretende limitar la invención únicamente a lo representado. La disposición de las etiquetas, los cebadores directos, los cebadores inversos, los ácidos nucleicos diana, los amplicones descritos en las etapas (a)-(d) se muestra en la parte superior de la Fig. 2. La Fig. 2 ilustra una realización de la presente invención, en la que F2[^] es una secuencia parcial de la porción de extremo 5' del cebador F2. En otras realizaciones de la invención, F2[^] es reemplazado por 0 nucleótidos (no presente) o es reemplazado por el cebador F2. En otras realizaciones de la invención, F2[^] es reemplazado por 0 nucleótidos (no presente) o es reemplazado por F2 (secuencia completa del cebador F2) en la Fig. 2.

En la etapa (f), la mezcla de ácidos nucleicos y reactivos se somete a los ciclos de PCR de desnaturalización, maduración y etapas de extensión de cebador al menos dos veces, tal como 2-5 veces o 2-10 veces, a temperaturas o condiciones de PCR estándar conocidas por una persona especialista en la técnica. En el primer ciclo de la PCR, se generan amplicones marcados solo en un extremo. En el segundo ciclo de la PCR, los amplicones marcados en un extremo actúan a continuación como plantilla para los otros cebadores marcados para generar amplicones marcados en los 2 extremos. La etapa (f) se ilustra en la parte media de la Fig. 2, en donde el Amplicón 1 (F1+R1), el Amplicón 2 (F2+R2), el Amplicón 4_largo (F1+R2) y el Amplicón 3_solapado (F2+R1) se generan después de los ciclos iniciales. Después de al menos dos ciclos de PCR, se generan amplicones completos con las secuencias de etiqueta en ambos extremos y están preparados para la siguiente ronda de ciclos de PCR con una temperatura de maduración incrementada de la etapa (g).

En la etapa (g), la mezcla de (f) es sometida a más ciclos de PCR de desnaturalización, maduración y extensión de cebador; esta vez a una temperatura de maduración superior a la de la etapa (f), lo que supone una característica importante de la presente invención. La temperatura de maduración es incrementada para prevenir que el amplicón más corto (Amplicón 3_solapado) se amplifique predominantemente.

Si la temperatura de maduración no es incrementada (como en un método de PCR convencional), toda la amplificación sigue una vía convencional en la que los Amplicones 1, 2 y 4_largo sirven todos como plantillas para la amplificación del amplicón corto (Amplicón 3_solapado); esto es debido a que los Amplicones 1, 2 y 4_largo contienen todos las partes específicas de gen de los cebadores directo e inverso del Amplicón 3_solapado. Como resultado de la amplificación (sin aumentar la temperatura de maduración), la cantidad del amplicón más corto (Amplicón 3_solapado) es $n^2 \times 2^n$, que es n veces mayor que la de cada uno de los dos amplicones diana (Amplicones 1 y 2, $n \times 2^n$), suponiendo que todos los amplicones tienen las mismas eficacias de amplificación. En la práctica, se observa que la eficacia de amplificación se ve afectada por la longitud de amplicón, en donde amplicones más cortos se correlacionan con una mayor eficacia de amplificación (Mallona I., et al, BMC Bioinformatics 2011, 12: 404), y, por tanto, el amplicón más corto se amplifica incluso más favorablemente.

En la etapa (g) de la presente invención, la temperatura de maduración es incrementada, y de esta manera una hibridación exitosa con plantilla de cebador no solo requiere las partes específicas de gen de los cebadores, sino también las partes de etiqueta. Cuando se incrementa la temperatura de maduración, los Amplicones 1, 2 y 4_largo ya no pueden actuar de plantilla para la amplificación del amplicón corto (Amplicón 3_solapado), y solo el propio amplicón corto (Amplicón 3_solapado) puede actuar como plantilla para sí mismo. La presente invención presenta (i) una temperatura creciente de maduración tras los primeros, al menos, dos ciclos de PCR, y (ii) una disposición apropiada de las etiquetas (t1, t2, t3) asociadas a cada amplicón, en particular, los cebadores F2 y R1 son marcados con la misma etiqueta t1; dichas características dan como resultado la producción de 2^n copias de todos los amplicones en teoría, debido a que cada amplicón solo puede usar su propio amplicón como plantilla para su amplificación. Esto supone ya una mejoría sobre un método convencional, en el cual el Amplicón 3 (corto solapado) produciría n veces más que los amplicones diana. En la práctica, los amplicones más cortos típicamente se amplifican de forma más eficaz que los amplicones más largos.

En la etapa (g), la temperatura de maduración es al menos 2°C superior a la temperatura de maduración de la etapa (f). Por ejemplo, la temperatura de maduración es aproximadamente 2-35°C, 4-35°C, 5-25°C, 6-20°C, 6-15°C superior a la temperatura de maduración específica de gen de la etapa (f). En la etapa (g), los ciclos de PCR se repiten al

menos 2 veces, p.ej., 2-50 veces, preferiblemente 2-5, 5-10, 10-30, 10-40 o 10-50 veces.

Cualquier base añadida puede aumentar la temperatura de fusión del cebador cuando las secuencias de cebador coinciden con la plantilla al 100%. En la presente invención, las secuencias de etiqueta tienen una longitud de al menos 2 o 3 nucleótidos, y puede tener una longitud de 5-100, 3-40, 10-30, 10-40, 10-50 nucleótidos. Preferiblemente, las etiquetas se diseñan para añadir al menos 5°C (p.ej., 5-10°C o 5-15°C) a la temperatura de fusión de los cebadores no marcados específicos de gen. Las secuencias de etiqueta proporcionan una mayor temperatura de maduración de las condiciones de ciclo tras los primeros 2 ciclos iniciales en la PCR. Las secuencias de etiqueta pueden ser ácidos nucleicos modificados o no modificados. Algunas bases modificadas (p.ej., LNA o PNA) tienen temperaturas de maduración superiores a las de las bases naturales correspondientes. Cuando se desean secuencias de etiqueta más cortas por diversas razones, se pueden usar tales bases modificadas en lugar de las bases naturales.

En una realización de la invención, la T_m (temperatura de fusión) de las secuencias de etiqueta t1 en ambos extremos del amplicón 3 es suficientemente elevada para formar un tallo-t1 firme, lo que previene la hibridación del cebador t1F2 con la plantilla de amplicón 3, e inhibe una amplificación exponencial adicional del amplicón 3. Para inhibir la unión del cebador t1F2 a la plantilla de amplicón 3, la T_m del tallo-t1 en el extremo del amplicón 3 debería ser igual o superior a la T_m del oligo t1F2 solo. La fusión y la hibridación de tallo-t1 en los extremos del amplicón 3 siguen una cinética intramolecular, y son más favorables que los de las reacciones dúplex oligo intermoleculares. Por lo tanto, las mismas dos secuencias oligo complementarias cortas (p.ej., de 2 a 100 nucleótidos) tiene una T_m mucho mayor cuando forman un tallo conectado por un bucle no complementario en una molécula que la T_m de las mismas dos secuencias oligo complementarias que forman un dúplex lineal. Adicionalmente, la T_m del tallo no solo se ve influida por las secuencias del tallo sino también por la longitud del bucle (que corresponde a la región de solapamiento). En comparación con un tamaño de bucle pequeño (p.ej., 2-200, 5-200 o 10-100 nucleótidos), un tamaño de bucle grande (p.ej., mayor de 500 nucleótidos, tal como 500-1000 o 500-1500 nucleótidos) reduce las velocidades de hibridación de tallo, posiblemente debido a las probabilidades reducidas de contacto entre los extremos del bucle de mayor tamaño, y se asemeja a la cinética de las formaciones de ADN dúplex inter-molecular.

En una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico opcionalmente comprende además una secuencia completa (F2), o una secuencia parcial (F2[^]) consecutivamente desde el extremo 5' del segundo cebador directo (F2), entre la segunda etiqueta (t1) y el primer cebador inverso (R1). En la Fig. 2, se muestra esta realización opcional del cebador 11F2[^]R1. Dependiendo de la longitud de F2, en una realización, la secuencia parcial de F2[^] es 1-50, 1-20, 1-10 o 1-5 nucleótidos más corta que la F2. Por ejemplo, la secuencia parcial de F2[^] puede tener 2-40, 4-40, 8-40, 8-30 o 8-20 nucleótidos. En otra realización, la secuencia parcial de F2[^] contiene 10-50, 10-90, 20-80, 30-70, 40-90 o 50-90% de la secuencia F2.

Tal como se muestra en la parte inferior de la Fig. 2, tras la etapa (g), el Amplicón 1 (F1+R1), el Amplicón 2 (F2+R2) y el Amplicón 4_largo (F1+R2) son amplificados exponencialmente mediante PCR, mientras que la amplificación del Amplicón 3_solapado (F2+R1) se ve inhibida. Esto es debido a que los cebadores F2 y R1 están marcados con la misma etiqueta t1, y por lo tanto en presencia de F2[^] con una longitud apropiada, se forma una estructura de tallo bucle fuerte que contiene las secuencias de t1 y F2[^] y previene la hibridación del cebador t1F2 con la plantilla del amplicón 3, lo que inhibe la amplificación exponencial adicional del amplicón 3. La longitud apropiada de F2[^] que permite una estructura tallo-bucle fuerte puede variar dependiendo de la T_m de la etiqueta t1. La Fig. 2 ilustra la formación del tallo-bucle con t1 y F2[^], lo que constituye una realización preferida. En otra realización, como se ha descrito anteriormente, la T_m de las secuencias de etiqueta t1 en ambos extremos del amplicón 3 es suficientemente elevada para formar un t1-tallo firme, y no se requiere la presencia de F2[^].

En otra realización de la invención, los anteriores productos de amplificación tras la primera ronda de PCR descritos anteriormente son amplificados adicionalmente mediante una segunda ronda de amplificación PCR con cebadores universales que se unen a t1 y t2 en la primera ronda. En esta realización, se requiere que t3 sea igual que t2 durante la primera ronda de PCR. La segunda ronda de PCR comprende las etapas de: (h) mezclar los productos de amplificación de (g), tanto tratados como sin tratar, con un primer y un segundo cebador de PCR universal que se unen a t1 y t2 respectivamente, y una cantidad efectiva de reactivos necesaria para llevar a cabo una PCR, en donde ambos cebadores de PCR universales no comprenden secuencias complementarias a la primera y segunda secuencia de ácido nucleico específicas de diana; y (i) someter la mezcla de (h) a un ciclo de etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR a temperaturas y condiciones estándar para PCR conocidas por la persona especialista en la técnica para obtener los segundos productos de amplificación.

En la etapa (i), el ciclo de PCR se repite al menos 2 veces, p.ej., 5-50 veces, preferiblemente 2-5, 5-10, 10-30, 10-40 o 10-50 veces.

Durante la segunda ronda de PCR, las amplificaciones del Amplicón 3_solapado, corto y solapado, y el Amplicón 4_largo, largo, se ven inhibidas adicionalmente debido a que sus sitios de cebador están bloqueados por la formación de tallo firme de t1 en ambos extremos del Amplicón 3_corto y de t2 en ambos extremos del Amplicón 4_largo. Por lo tanto, las amplificaciones del primer y del segundo amplicón de ácido nucleico diana (Amplicones 1 y 2) dominan en la segunda ronda de PCR. Los productos finales se pueden usar para diferentes propósitos, tal como para secuenciamiento de nueva generación (NGS).

En la segunda ronda de PCR, el producto de (g) de la primera ronda de PCR es pre-tratado opcionalmente antes de la etapa (i), por ejemplo, mediante dilución, digestión con exonucleasa de cadena sencilla, purificación o ligación de adaptador.

5 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la presente invención y no deben considerarse como limitativos.

Ejemplos

La Tabla 1 y la Fig. 3 muestran los tamaños y las localizaciones de los Amplicones 1-4 en el genoma humano hg19. El Amplicón 3 es el solapamiento entre los Amplicones 1 y 2. El Amplicón 4 es el amplicón largo que cubre las secuencias de ambos Amplicones, 1 y 2.

10 **Tabla 1**

Nombre de Amplicón	Gen	Chr. hg19	Inicio hg19	Fin hg19	Tamaño Gen-Específico (pb)	Tamaño con etiqueta (pb)
Amplicón 1	BRCA2	chr13	32914076	32914572	497	538
Amplicón 2	BRCA2	chr13	32914378	32914737	360	401
Amplicón 3_solapado	BRCA2	chr13	32914378	32914572	195	236
Amplicón 4_largo	BRCA2	chr13	32914076	32914737	662	703

15 La Tabla 2 muestra secuencias de oligonucleótido usadas en los Ejemplos 1 y 2, y la Fig. 4 SEQ ID NOs: 1-4 son cebadores gen-específicos para BRCA2 amplicón 1 y amplicón 2 sin secuencias de etiqueta. Las SEQ ID NOs: 5-6 son secuencias de etiqueta procedentes de etiquetas Illumina TSCA. Las SEQ ID NOs: 7-16 son los cebadores marcados usados en los experimentos de ejemplo.

Se usó la SEQ ID NO: 7 solo en PCR múltiplex estándar (Fig. 4, Calle 3). Las SEQ ID NOs: 8-14 se usaron en la presente invención (Calle 4-8). Las SEQ ID NOs: 15-16 se usaron tanto en la PCR múltiplex estándar y en la presente invención (Calle 3-8).

Se evaluaron las temperaturas Tm mediante OligoAnalyzer 3.1 (IDTDNA) con 1,5 mM de concentración de Mg⁺².

20 **Tabla 2**

SEQ ID NO de Oligo	Secuencias*	Tamaño de dirección (nt)	Amplicón	Oligo-Tm gen-específica	Oligo-Tm etiquetado completo	Tallo_Tm formado entre t1_F2^_R1 y t1_F2
1: F1	GTGAAAGACATATTTACAGACAGTTTC	FWD 27	Amplicón 1	60,6	N/A	N/A
2: R1	CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 21	Amplicón 1	61,9	N/A	N/A
3: F2	AGGGAAGCTTCATAAGTCAGTC	FWD 22	Amplicón 2	61,3	N/A	N/A
4: R2	TCCTCTAACACTCCCTTAACCTTGT	REV 25	Amplicón 2	63,1	N/A	N/A
5: t1	caacgatcgtcgaattcgc	20	Etiqueta	61,3 Solo etiqueta	N/A	N/A
6: t2	tacacgacgctctccgatct	21	Etiqueta	64,4 Solo etiqueta	N/A	N/A
7: t1_F1	caacgatcgtcgaattcgc GTGAAAGACATATTTACAGACAGTTTC	FWD 47	Amplicón 1	60,6	72,6	N/A
8: t2_F1	tacacgacgctctccgatct GTGAAAGACATATTTACAGACAGTTTC	FWD 48	Amplicón 1	60,6	73,2	N/A
9: t2_R1	tacacgacgctctccgatct CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 42	Amplicón 1	61,9	75,2	N/A

SEQ ID NO de Oligo	Secuencias*	Tamaño de dirección (nt)	Amplicón	Oligo-Tm gen-específica	Oligo-Tm etiquetado completo	Tallo_Tm_ formado entre t1_F2^_R1 y t1_F2
10: t1_R1 (F2^=0)	caacgatcgtcgaattcgc CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 41	Amplicón 1	61,9	74,7	63,3
11: t1_F2^4_R1	caacgatcgtcgaattcgc <u>AGGG</u> CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 45	Amplicón 1	61,9	76,5	75,2
12: t1_F2^8_R1	caacgatcgtcgaattcgc <u>AGGGAAGC</u> CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 49	Amplicón 1	61,9	77,2	77,2
13: t1_F2^12_R1	caacgatcgtcgaattcgc <u>AGGGAAGCTTCA</u> CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 53	Amplicón 1	61,9	77,2	77,8
14: t1_F2^16_R1	caacgatcgtcgaattcgc <u>AGGGAAGCTTCATAAG</u> CTTGTGAGCTGGTCTGAATGT	REV 57	Amplicón 1	61,9	77,3	77,5
15: t1_F2	caacgatcgtcgaattcgc AGGGAAGCTTCATAAGTCAGTC	FWD 42	Amplicón 2	61,3	73,4	N/A
16: t2_R2	tacacgacgctcttcgatct TCCTCTAACACTCCCTTAACCTTGT	REV 46	Amplicón 2	63,1	74,5	N/A

* Minúsculas indican secuencias de etiqueta; subrayado significa secuencias F2 parciales insertadas en R1; secuencias en mayúsculas no marcadas son secuencias específicas de gen. N/A: no aplicable. FWD: directo. REV: inverso

La Tabla 3 muestra información de mezcla de cebadores de los Ejemplos 1 y 2.

Tabla 3

Calle	Nombre	Mezcla de cebadores múltiplex				Amplicón corto F2_R1
		Amplicón 1		Amplicón 2		Longitud de bucle (nt); Oligo de tallo; Longitud de tallo (nt)
1	M: Escalera 100 pb					
2	Mezcla Singleplex de control*					No aplicable
3	STD_Múltiplex_ctrl	t1_F1	t2_R1	t1_F2	t2_R2	Sin tallo bucle
4	Tallo_t1-F2^0	t2_F1	t1_R1	t1_F2	t2_R2	195;t1_solo; 20
5	Tallo_t1-F2^4	t2_F1	t1_F2^4_R1	t1_F2	t2_R2	195; t1 + 4 nt de F2; 24
6	Tallo_t1-F2^8	t2_F1	t1_F2^8_R1	t1_F2	t2_R2	195; t1 + 8 nt de F2; 28
7	Tallo_t1-F^12	t2_F1	t1_F2^12_R1	t1_F2	t2_R2	195; t1 + 12 nt de F2; 32
8	Tallo_t1-F2^16	t2_F1	t1_F2^16_R1	t1_F2	t2_R2	195; t1 + 16 nt de F2; 36

*Contiene cada producto singleplex de amplificaciones separadas mezcladas en una relación de volúmenes iguales.

5 Ejemplo 1: Primera ronda de amplificación PCR (Cebadores específicos de gen)

Una mezcla de PCR representativa de 25 µL incluyó los siguientes componentes:

12,5 µL de 2x de la mezcla de cebadores Multiplex Master Mix (KAPA Biosystems, Cat nº KK5802), 2 µL de AND genómico humano (Promega, Cat nº G3041) diluido a 5 ng/µL en tampón TE bajo (USB, Cat nº 75793), 6,5 µL de agua

libre de nucleasa, y 4 µL de mezcla de cebadores específicos de gen (1,25 µM de cada uno, ver las calles 5-8 de Mezcla de cebadores múltiplex en la Tabla 3).

La PCR singleplex (Fig. 4, Calle 2), la PCR múltiplex estándar (Fig. 4, Calle 3), y la PCR múltiplex formadora de tallo (Fig. 4, Calles 4-8) se llevaron a cabo en un termociclador como se indica a continuación:

1 ciclo	95°C	2 minutos	Activación enzimática y desnaturalización inicial de ADN
5 ciclos	95°C	30 segundos	Desnaturalización
	60°C	90 segundos	Maduración/extensión
30 ciclos	95°C	30 segundos	Desnaturalización
	72°C	90 segundos	Maduración/extensión a una temperatura incrementada
1 ciclo	72°C	5 minutos	Extensión final
1 ciclo	8°C	Mantener	

5

Ejemplo 2: Electroforesis de gel de agarosa

Los productos del ejemplo 1 fueron analizados en un dispositivo E-base (Life Technologies). Se diluyeron dos µL del producto hasta un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasa y se cargaron en un E-gel SizeSelect al 2%. Se llevó a cabo la electroforesis de ADN de los productos de PCR diluidos (Calles 2-8) y de escalera de ADN Plus de 1 Kb (Invitrogen, Cat. nº 10488-090, Calle 1), y al final del experimento, se capturó una imagen digital del gel mediante un dispositivo E-gel Imager (Life Technologies). Los resultados se muestran en la Fig. 4.

10

En la Calle 2 de la Fig. 4, se mezclan cantidades iguales de los productos de reacciones singleplex del Ejemplo 1 y se pueden observar juntos en el gel, designados Amplicones 1 y 2. La PCR múltiplex estándar produce de forma predominante Amplicón 3 (Calle 3), que es el producto de PCR amplificado a partir del solapamiento de los Amplicones 1 y 2. El Amplicón 4, la región completa cubierta por los Amplicones 1 y 2, pueden apreciarse ligeramente en la Calle 3. Las Calles 4 y 5, que contienen oligonucleótidos tallo de t1 solo y de t1 más F2 parcial (4 nucleótidos desde el extremo 5'), respectivamente, muestran modelos similares con tres bandas detectables: Amplicones 1, 2 y 3. En las Calles 6-8, se pueden observar todos los Amplicones 1, 2 y 3, pero el amplicón 3 se ha reducido sustancialmente en comparación con las Calles 3-5.

15

La Tabla 4 y la Fig. 5 muestran los tamaños de amplicón y sus localizaciones en el genoma humano hg19 dirigidos a BRCA2 Exón 27 (B2X27) usados en los ejemplos 3-6.

20

Tabla 4

Nombre de amplicón	chr-hg19	Inicio hg19	Fin hg19	Tamaño de amplicón gen-específico (pb)	Tamaño de amplicón con etiqueta (pb)
B2X27A1	chr13	32972189	32972455	267	308
B2X27A2	chr13	32972396	32972719	324	365
B2X27A3	chr13	32972638	32972985	348	389
Solapamiento de B2X27A1+A2	chr13	32972396	32972455	60	101
Solapamiento de B2X27A2+A3	chr13	32972638	32972719	82	123

La Tabla 5 muestra las secuencias de oligonucleótidos usadas en los Ejemplos 3, 4, 5 y 6 para la amplificación de

BRCA2 (B2) Exón 27 (X27).

Tabla 5

SEQ ID NO de oligo	Secuencia*	Tamaño direc. (nt)	Amplicón
17: t1 B2X27ZA1F	caacgatcgtcgaaattcgc ACTGTGTGTAATATTTGCGTGCTT	FWD 44	B2X27A 1
18: t2 B2X27A1R	tacacgacgctctccgatct TTCTCTTTTTGCAGTTCTTTTGT	REV 45	B2X27A 1
19: t1 B2X27A2F	caacgatcgtcgaaattcgc CTTCAAAGTCTTGTAAGGGGAGA	FWD 44	B2X27A 2
20: t2 B2X27A2R	tacacgacgctctccgatct TTGAACCAGACAAAAGAGCTTG	REV 43	B2X27A 2
21: t1 B2X27A3F	caacgatcgtcgaaattcgc GAAATTTCTCTTTTGAAAAGTAATTCA	FWD 47	B2X27A 3
22: t2 B2X27A3R	tacacgacgctctccgatct TGTGGTTTGAAATTATATCCAGTCTT	REV 48	B2X27A 3
23:t2_B2X27A1. SLIM.R	tacacgacgctctccgatct <u>CTTCAAAGTC</u> TTCTCTTTTTGCAGTTCTTTTGGT	REV 55	B2X27A 1
24:t2 B2X27A2. SLIM.F	tacacgacgctctccgatct CTTCAAAGTCTTGTAAGGGGAGA	FWD 45	B2X27A 2
25:t1_B2X27A2. SLIM.R	caacgatcgtcgaaattcgc <u>GAAATTTCTCT</u> TTGAACCAGACAAAAGAGCTTG	REV 53	B2X27A 2

*Minúsculas indican secuencias de etiqueta; Subrayado indica secuencias de cebador directo parciales insertadas desde el siguiente amplicón; las secuencias en mayúsculas no marcadas son secuencias específicas de gen.

Ejemplo 3: Primera ronda de amplificación PCR gen-específica para BRCA2 exón 27 (B2X27)

5 Una mezcla de PCR representativa de 25 µL incluyó los siguientes componentes:

12,5 µL de 2x mezcla Multiplex Master Mix (KAPA Biosystems, Cat. nº KK5802), 6 µL de ADN (Coriell, Cat. nº NA19240 o NA14622) diluido a 5 ng/µL en tampón TE bajo (IDT, Cat. nº 11-05-01-09), 2,5 µL de agua libre de nucleasa, y 4 µL de mezcla de cebadores gen-específicos (1,25 µM de cada uno).

10 La mezcla de cebadores convencional contenía los siguientes seis oligos de la Tabla 5: SEQ ID NOs: 17 y 18 (B2X27 amplicón 1), 19 y 20 (B2X27 amplicón 2), y 21 y 22 (B2X27 amplicón 3). La mezcla de cebadores SLIMAMP™ (la presente invención) contiene los siguientes seis oligos: 17 y 23 (B2X27 amplicón 1), 24 y 25 (B2X27 amplicón 2), y 21 y 22 (B2X27 amplicón 3).

La PCR múltiplex estándar y la PCR múltiplex formadora de tallo se llevan a cabo en un termociclador como se indica a continuación:

1 ciclo	95°C	2 minutos	Activación enzimática y desnaturalización inicial de ADN
5 ciclos	95°C	15 segundos	Desnaturalización
	60°C	6 minutos	Maduración/extensión
25 ciclos	95°C	30 segundos	Desnaturalización
	72°C	3 minutos	Maduración/extensión a temperatura incrementada
1 ciclo	8°C	Mantener	

Ejemplo 4: Segunda ronda de amplificación PCR (Cebadores universales) y purificación

5 Los productos gen-específicos del Ejemplo 3 fueron diluidos 1000 veces. Una mezcla de PCR representativa de 25 μL incluyó los siguientes componentes: 2,5 μL de 10x tampón de reacción, 0,5 μL de dNTPs, 0,25 μL de enzima (Roche, Cat. n° 12140314001), 2 μL del producto diluido del Ejemplo 3, 2 μL de cebador directo Illumina Index, 2 μL de cebador inverso Illumina Index (25 μM de reserva de cebador del kit TruSeq Custom Amplicon Index Kit, Cat. n° FC-130-1003), y 15,75 μL de agua libre de nucleasa.

La amplificación PCR se llevó a cabo como se indica a continuación:

1 ciclo	95°C	4 minutos	Desnaturalización inicial de ADN
	95°C	30 segundos	Desnaturalización
20 ciclos	66°C	30 segundos	Maduración
	72°C	60 segundos	Extensión
1 ciclo	72°C	5 minutos	Extensión final
1 ciclo	8°C	Mantener	

10 El producto se purificó añadiendo 18 μL de partículas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Cat. n° A63881), separando las partículas del sobrenadante, y desechando el sobrenadante. Se usaron dos lavados de etanol al 70% para lavar las partículas, y el producto fue eluido de las partículas usando 32 μL de agua libre de nucleasa. A continuación se cuantificó la concentración del producto usando 2 μL del producto diluido en 198 μL de tampón Qubit High Sensitivity (Invitrogen, Cat. n° Q32854).

Ejemplo 5: Electroforesis de gel de agarosa

15 Los productos del ejemplo 3 y del ejemplo 4 se analizaron en un dispositivo E-base (Life Technologies). Se diluyeron dos μL del producto hasta un volumen final de 20 μL con agua libre de nucleasa y se cargaron en un E-gel de SizeSelect al 2%. Se llevó a cabo una electroforesis de ADN de los productos de PCR diluidos y de escalera de ADN de 50 pb (Invitrogen, Cat. n° 10488-043). Al final del experimento, se capturó una imagen digital del gel mediante un dispositivo E-gel Image (Life Technologies). Los resultados se muestran en la Fig. 6.

20 Los productos del ejemplo 3 (Primera ronda de productos PCR) se muestran en la Calle 1-4 de la Fig. 6. Las calles 1 y 2 presentan los productos de la PCR múltiplex convencional. Los amplicones pequeños, que son solapamientos de los amplicones 1 con 2 y 2 con 3, fueron producidos junto con los amplicones 1-3. Por otro lado, las reacciones SLIMAMP™, cargadas en las calles 3 y 4, producen principalmente amplicones 1-3, con muy poco de los amplicones solapados.

25 Los productos del Ejemplo 4 (segunda ronda de productos PCR) se muestran en las calles 5-8 de la Fig. 6, que son productos tras la PCR universal y limpieza de las partículas. En el Ejemplo 4 (Calles 5-8), los amplicones fueron etiquetados y amplificados adicionalmente, demostrado por el incremento del tamaño de nucleótidos en comparación con las Calles 1-4. Las muestras que originalmente fueron sometidas a PCR múltiplex convencional produjeron principalmente los amplicones solapados cortos no deseados (Calles 5-6), mientras que las muestras de SLIMAMP™ (la presente invención) contienen solo los amplicones diana 1-3 (Calles 7-8).

Ejemplo 6: Normalización y secuenciación de biblioteca NGS

30 Cada producto del Ejemplo 4 fue normalizado a 4 mM usando Tris-HCl 10 mM w/0,1 % de Tween 20 (Teknova, Cat. n° T7724). Todos los productos normalizados del Ejemplo 4 se mezclan en un volumen igual (3 μL cada uno) para crear una mezcla de librería. Se añaden 5 μL de la mezcla de biblioteca a 5 μL de NaOH 0,2 N para desnaturalizar la biblioteca. Se prepara una biblioteca 20 pM usando tampón HT1, se carga y se secuencia con una longitud de lectura de fin de par de 250 pb (Illumina, Cat. n° MS-102-2003). Las lecturas de secuenciación Fastq resultantes de cada muestra fueron alineadas entonces con el genoma de referencia hg19 mediante BWA-MEM. Las lecturas emparejadas de fin fueron unificadas entonces y se analizaron las coberturas de las regiones de cada amplicón. La información de cobertura se muestra en la Fig. 7.

5 La Fig. 7 muestra el porcentaje de lecturas NGS atribuidas a cada amplicón en cada muestra. En la PCR múltiple convencional, los amplicones solapados fueron amplificados más eficientemente que los amplicones diana y contabilizaron el 78% del total de lecturas NGS, debido a sus tamaños mucho menores (60 y 82 pb). En las muestras SLIMAMP™, todos los amplicones solapados no deseados fueron inhibidos con cerca del 0% de detección en NGS. Con respecto a los amplicones diana en ambas muestras, convencional y SLIMAMP™, como era de esperar, el Amplicón 1 (267 pb) presentó un mayor porcentaje que los amplicones 2 (324 pb) y 3 (348 pb) debido a que un menor tamaño (amplicón 1) típicamente se amplifica más eficientemente.

Listado de secuencias

- <110> PILLAR BIOSCIENCES INC. WANG, Zhaohui SONG, Gang
- 10 <120> AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE AMPLICONES SOLAPADOS
- <130> 113970-8001.US01
- <150> US 62/129,360
- <151> 2015-03-06
- <160> 25
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> oligonucleótido sintético
- <400> 1
- gtgaaagaca tatttacaga cagtttc 27
- <210> 2
- 25 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido sintético
- 30 <400> 2
- cttgtgagct ggtctgaatg t 21
- <210> 3
- <211> 22
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido sintético
- <400> 3
- aggaagctt cataagtcag tc 22
- <210> 4
- 40 <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 45 <223> oligonucleótido sintético
- <400> 4
- tccttaaca ctccctaac ttgt 25
- <210> 5
- 50 <211> 20
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 5
 5 caacgatcgt cgaaattcgc 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 6
 10 tacacgacgc tttccgatc t 21
 <210> 7
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 7
 20 caacgatcgt cgaaattcgc gtgaaagaca tatttacaga cagtttc 47
 <210> 8
 <211> 48
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 8
 tacacgacgc tttccgatc tgtgaaagac atatttacag acagtttc 48
 30 <210> 9
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 9
 tacacgacgc tttccgatc tctgtgagc tggctgaaat gt 42
 <210> 10
 <211> 41
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 10
 45 caacgatcgt cgaaattcgc cttgtgagct ggtctgaaat t 41
 <210> 11
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 11
caacgatcgt cgaaattcgc agggcctgtg agctggtctg aatgt 45

5 <210> 12
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

10 <400> 12
caacgatcgt cgaaattcgc agggaagcct tgtgagctgg tctgaatgt 49

<210> 13
<211> 53
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 13
caacgatcgt cgaaattcgc agggaagcct cactgtgag ctggtctgaa tgt 53

20 <210> 14
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> oligonucleótido sintético

<400> 14
caacgatcgt cgaaattcgc agggaagcct cataag 36

<210> 15
<211> 42
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 15
35 caacgatcgt cgaaattcgc agggaagcct cataagtcag tc 42

<210> 16
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 16
tacacgacgc tctccgatc ttctctaac actcccttaa ctttgt 46

<210> 17
45 <211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

50 <400> 17

ES 2 718 765 T3

caacgatcgt cgaaattcgc actgtgtgta atattgcgt gctt 44
 <210> 18
 <211> 45
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 18
 tacacgacgc tctccgatc ttctctttt tgcagtctt ttgt 45
 10 <210> 19
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 19
 caacgatcgt cgaaattcgc ctcaaagtc ttgtaaaggg gaga 44
 <210> 20
 <211> 43
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 20
 25 tacacgacgc tctccgatc ttgaaccag acaaaagagc ttg 43
 <210> 21
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 21
 caacgatcgt cgaaattcgc gaaatttctc ttttgaaag taattca 47
 <210> 22
 <211> 48
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 22
 40 tacacgacgc tctccgatc ttgtggttg aaattatatt ccagtctt 48
 <210> 23
 <211> 55
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 23
 tacacgacgc tctccgatc tctcaaagt ctctctttt tgcagtctt ttgt 55
 50 <210> 24

ES 2 718 765 T3

<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 24
tacacgacgc tctccgatc tctcaaagt cttgtaaagg ggaga 45

10 <210> 25
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

15 <400> 25
caacgatcgt cgaaattcgc gaaatttctc ttgaaccag acaaaagagc ttg 53

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar de forma selectiva fragmentos de ácido nucleico que tienen una región solapada, que comprende las etapas de:

5 a) obtener una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una primera etiqueta (t2) y un primer cebador directo (F1) complementario a un primer fragmento de ácido nucleico diana, donde t2 está en posición extremo 5' respecto a F1;

b) obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una segunda etiqueta (t1) y un primer cebador inverso (R1) complementario al primer fragmento de ácido nucleico diana, donde t1 está en posición extremo 5' respecto a R1;

10 c) obtener una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende la segunda etiqueta (t1) y un segundo cebador directo (F2) complementario a un segundo fragmento de ácido nucleico, donde t1 está en posición extremo 5' respecto a F2;

15 d) obtener una cuarta secuencia de ácido nucleico que comprende una tercera etiqueta (t3), y un segundo cebador inverso (R2) complementario al segundo fragmento de ácido nucleico, donde t3 está en posición extremo 5' respecto a R2, en donde el primer y el segundo fragmento de ácido nucleico diana tienen una región solapada;

e) mezclar el primer y el segundo fragmento de ácido nucleico diana, la primera, la segunda, la tercera y la cuarta secuencia de ácido nucleico, y una cantidad efectiva de reactivos necesaria para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR);

20 f) someter la mezcla de (e) a ciclos de etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR durante al menos dos veces; y

g) someter la mezcla de (f) a ciclos de etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR a una temperatura de maduración superior a la de la etapa (f) para obtener productos de amplificación.

2. El método según la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia completa del segundo cebador directo (F2), entre la segunda etiqueta (t1) y el primer cebador inverso (R1).

25 **3.** El método según la reivindicación 1, en donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende además F2[^], que es una secuencia parcial de extremo 5' del segundo cebador directo (F2), entre la segunda etiqueta (t1) y el primer cebador inverso (R1).

4. El método según la reivindicación 3, en donde la secuencia parcial de extremo 5' del segundo cebador directo contienen un 10-90% de secuencia F2.

30 **5.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la temperatura de maduración de la etapa (g) es 2-35 °C superior a la temperatura de maduración de la etapa (f).

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los ciclos de PCR de la etapa (f) se repiten 2-10 veces.

35 **7.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la tercera etiqueta es igual a la segunda etiqueta.

8. El método según la reivindicación 6, que además comprende las etapas de:

40 h) mezclar los productos de amplificación de la etapa (g), tanto tratados como no tratados, con un primer y un segundo cebador de PCR universales que se unen a t1 y t2 respectivamente, pero que no se unen al primer ni al segundo fragmento de ácido nucleico diana, y una cantidad efectiva de reactivos necesarios para llevar a cabo una PCR; y

i) someter la mezcla de (h) a ciclos de etapas de desnaturalización, maduración y extensión de cebador de PCR para obtener los segundos productos de amplificación.

9. El método de la reivindicación 8, en donde los productos de la etapa (g) son pre-tratados mediante dilución, digestión de exonucleasa de cadena sencilla, purificación o ligación de adaptador.

45 **10.** El método de la reivindicación 3, en donde F2[^] contiene 2-40 nucleótidos.

11. El método de la reivindicación 3, en donde F2[^] contiene 4-40 nucleótidos.

12. El método de la reivindicación 3, en donde F2[^] es 1-5 nucleótidos más corto que F2.

Cebado específico de segmentos diana solapados

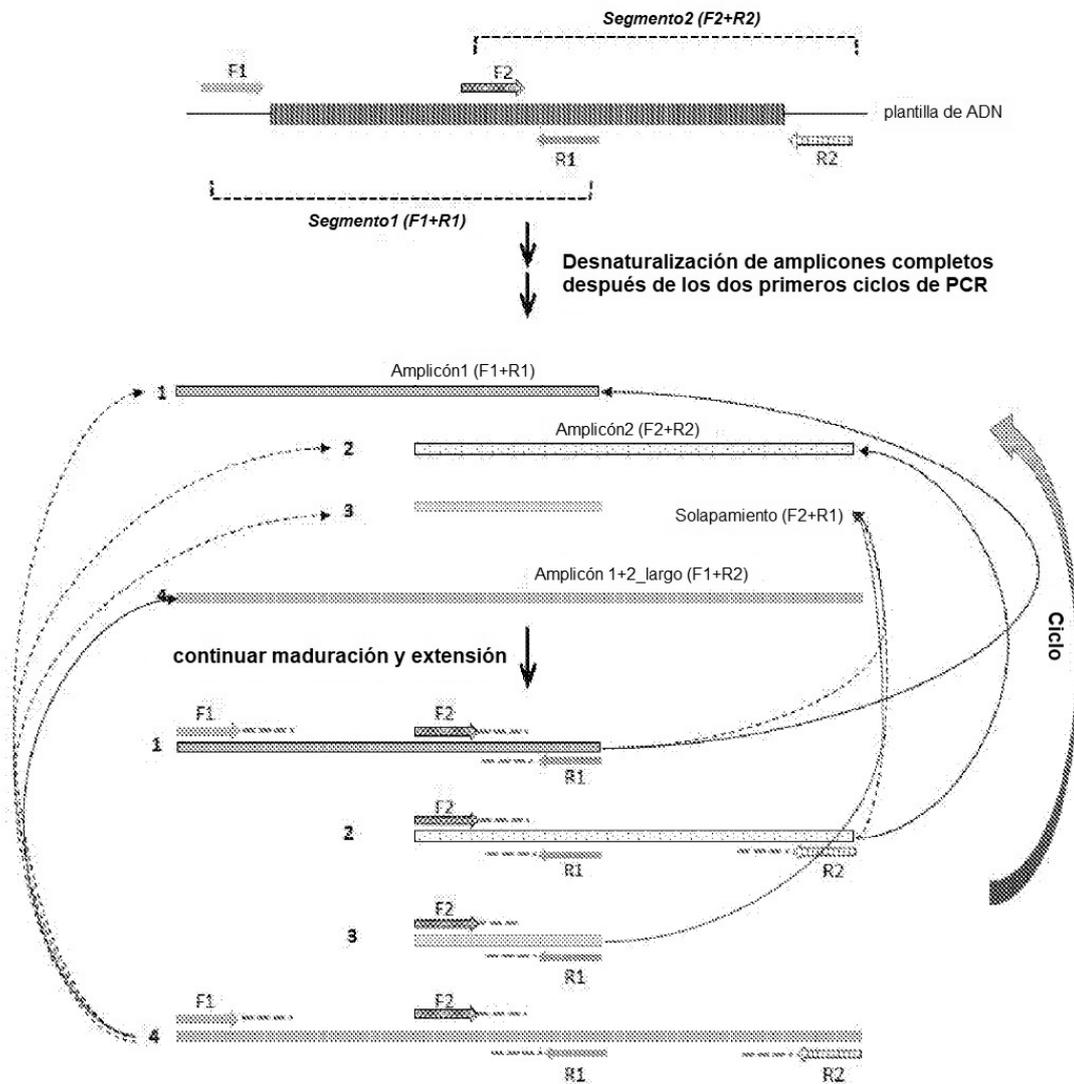


FIG. 1

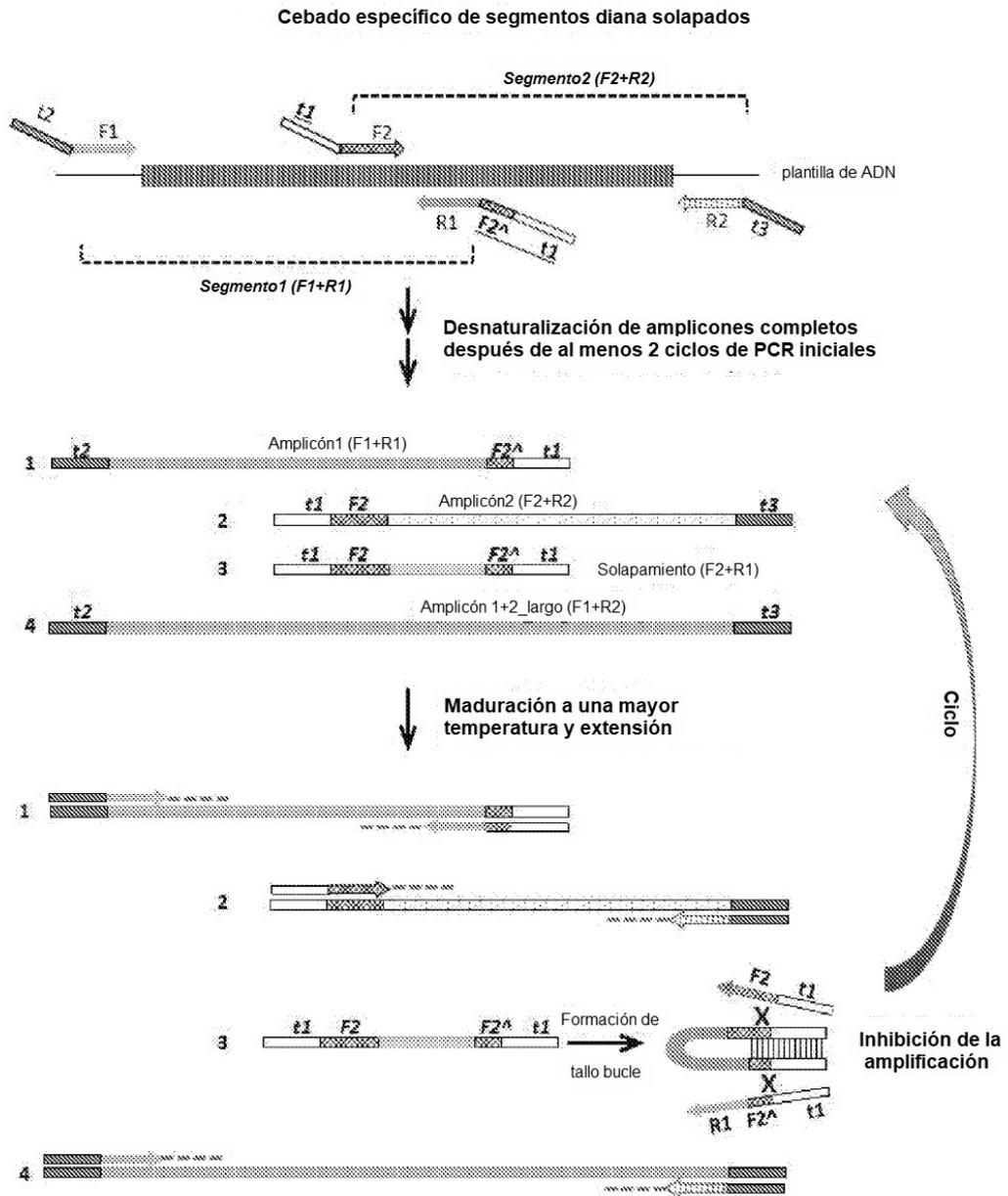


FIG. 2

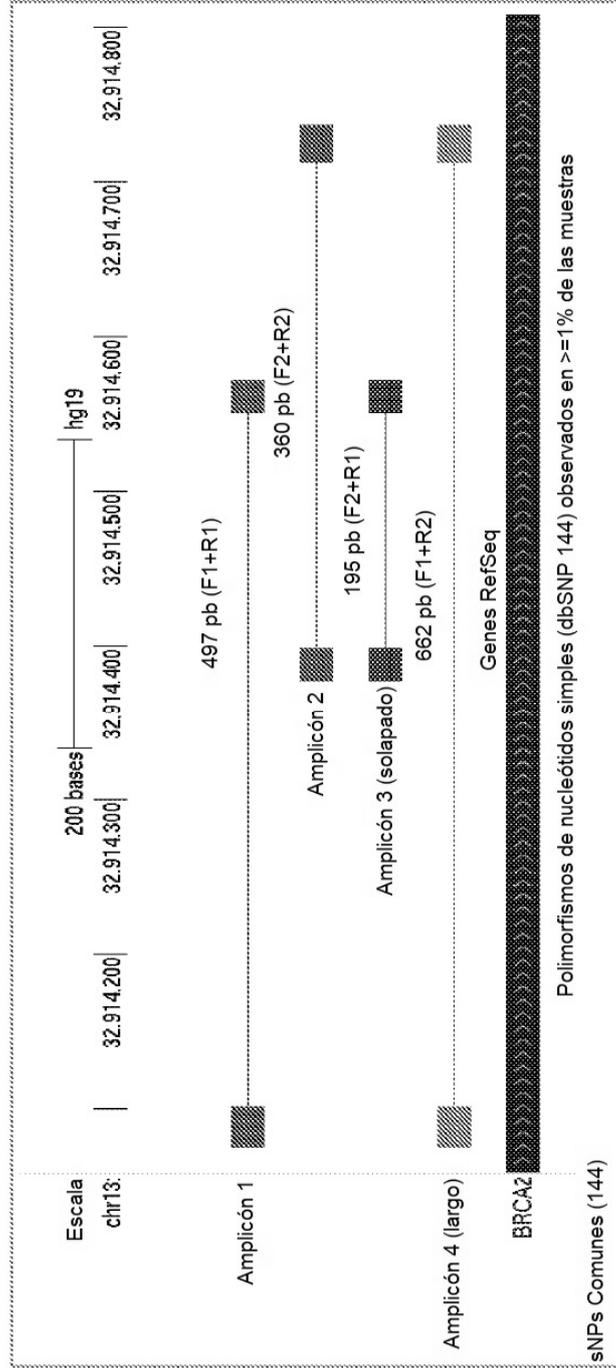


FIG. 3

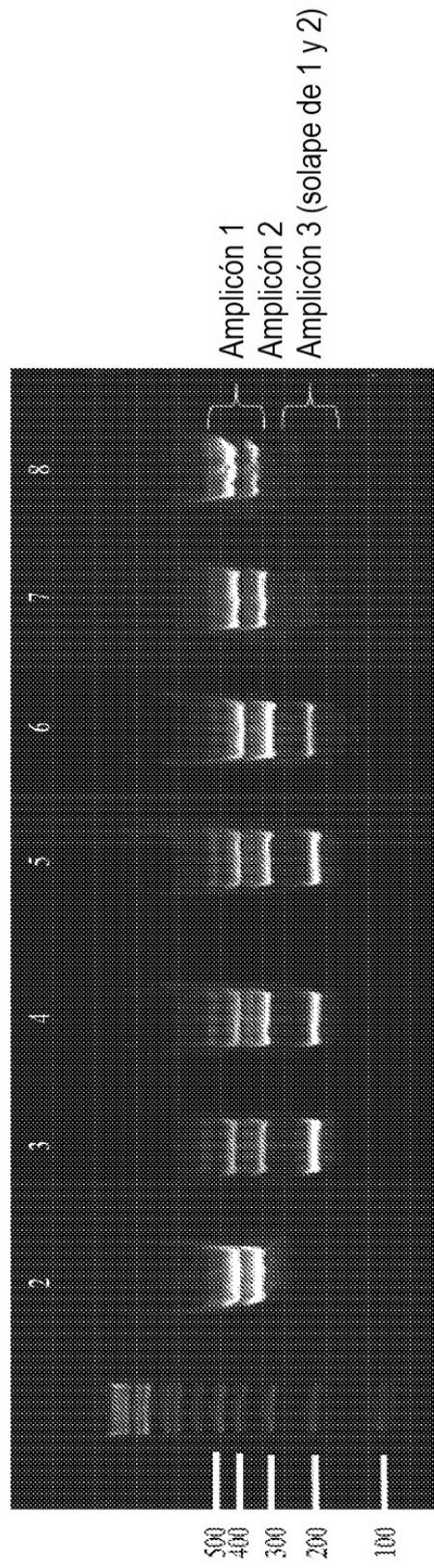


FIG. 4

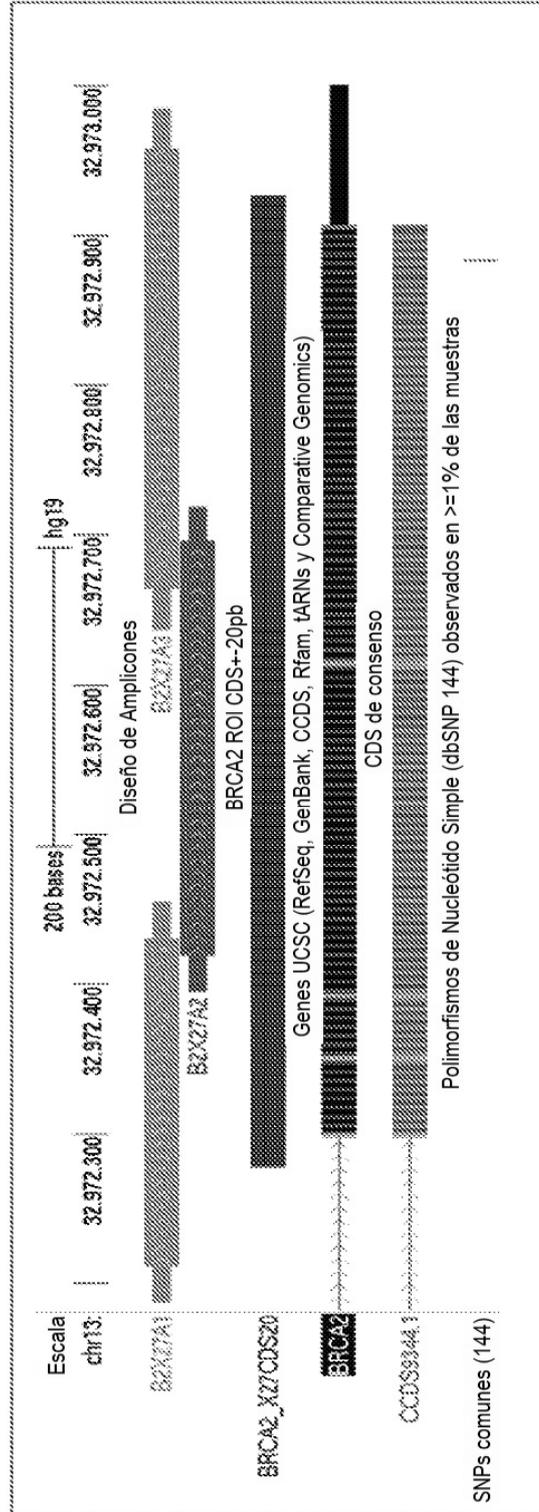


FIG. 5

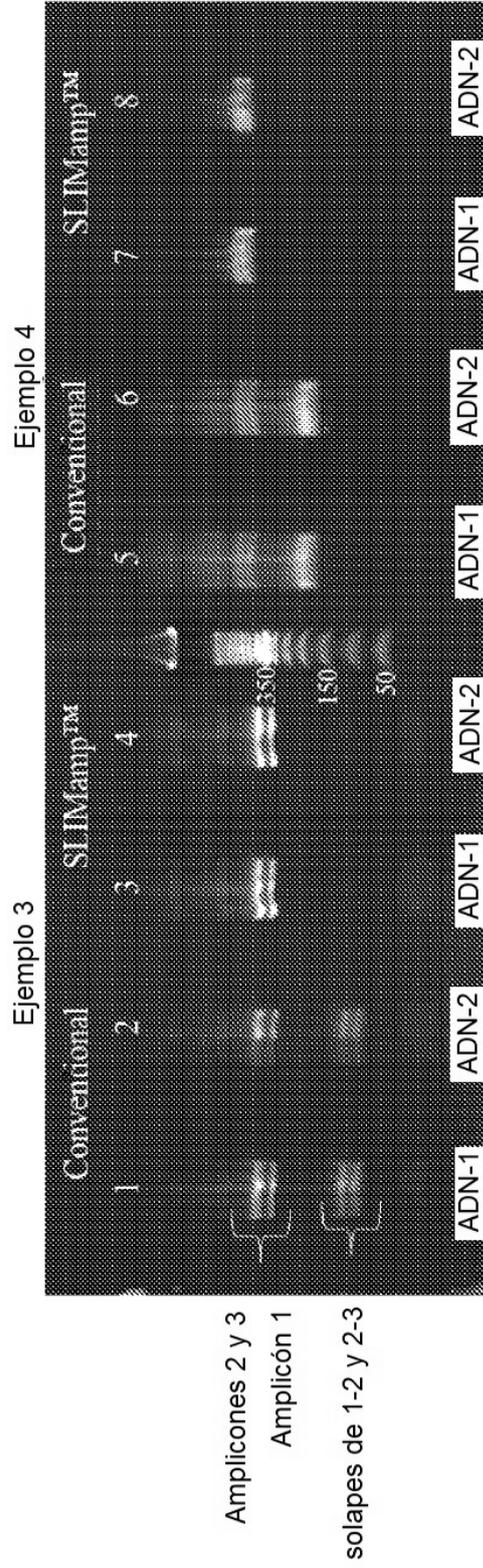


FIG. 6

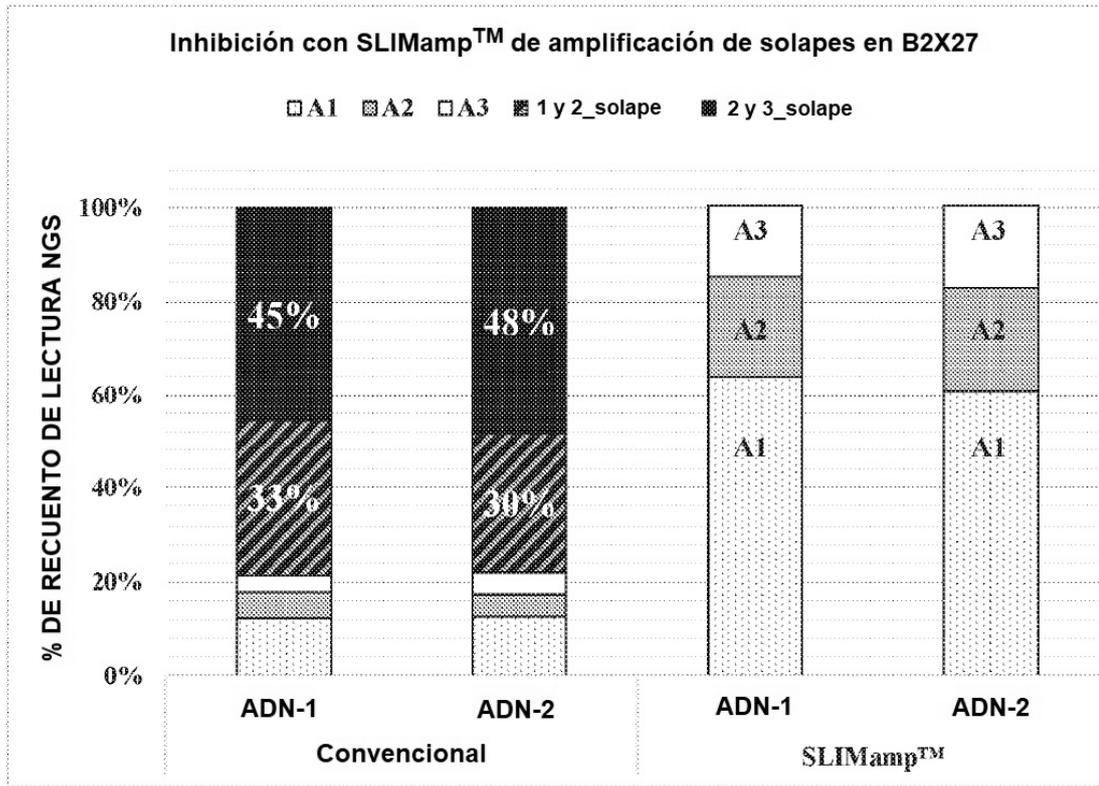


FIG. 7