

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 386**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009** E 16180028 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** EP 3133169

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 763 386 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para seleccionar y amplificar polinucleótidos

### 5 Campo de la invención

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

### Antecedentes de la invención

A lo largo de la solicitud se citan varias publicaciones y documentos de patente para describir plenamente el estado de la técnica al que pertenece la presente invención.

Una serie de métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento se basan en una reacción de amplificación universal, por la cual la muestra de ADN se fragmenta aleatoriamente, después se trata de manera que los extremos de los distintos fragmentos contienen todos la misma secuencia de ADN. Los fragmentos con extremos universales se pueden entonces amplificar en una sola reacción con un solo par de oligonucleótidos de amplificación. La separación de la biblioteca de fragmentos hasta el nivel de molécula individual antes de la amplificación asegura que las moléculas amplificadas formen poblaciones discretas que pueden seguir analizándose después. Tales preparaciones se pueden realizar en emulsiones o sobre una superficie. Como alternativa, es posible diseñar oligonucleótidos de amplificación que son específicos para ciertas porciones de muestra de ácido nucleico y así eliminar la necesidad de modificar los extremos de la muestra.

Se han formado matrices de polinucleótidos basándose en la amplificación de ácidos nucleicos en 'fase sólida'. Por ejemplo, se puede utilizar una reacción de amplificación en puente en la que un molde inmovilizado sobre un soporte sólido se amplifica y los productos de amplificación se forman sobre el soporte sólido con el fin de formar matrices comprendidas por agrupamientos de ácido nucleico o 'colonias'. Cada agrupamiento o colonia sobre tal matriz se forma a partir de una pluralidad de cadenas idénticas de polinucleótidos inmovilizados y una pluralidad de cadenas idénticas de polinucleótidos complementarios inmovilizados. En el presente documento se hace referencia a las matrices así formadas como 'matrices agrupadas'.

Así como ocurre en muchas otras técnicas de amplificación, la amplificación en puente en fase sólida utiliza oligonucleótidos de amplificación directos e inversos que incluyen secuencias de nucleótidos 'específicas de molde' que son capaces de hibridar con secuencias en el molde a amplificar o el complemento de las mismas, en las condiciones de las etapas de hibridación de la reacción de amplificación. En el presente documento se puede hacer referencia a las secuencias en el molde con las que los cebadores hibridan en condiciones de la reacción de amplificación como secuencias de 'unión del cebador'.

Algunas realizaciones de métodos de agrupamiento hacen uso de cebadores 'universales' para amplificar una porción de molde variable que se va a amplificar y que está flanqueada en 5' y 3' por secuencias de unión del cebador comunes o 'universales'. Los cebadores directos e inversos 'universales' incluyen secuencias capaces de hibridar con las secuencias de unión del cebador 'universales' en la construcción del molde. La porción de molde variable o 'diana' puede en sí misma ser de una secuencia conocida, desconocida o parcialmente conocida. Este enfoque tiene la ventaja de que no es necesario diseñar un par específico de cebadores para cada secuencia diana a amplificar; se pueden utilizar los mismos cebadores para la amplificación de diferentes moldes siempre que cada molde se modifique por adición de las mismas secuencias de unión al cebador universal en sus extremos 5' y 3'. La secuencia diana variable puede, por tanto, ser cualquier fragmento de ADN de interés. Se puede utilizar un enfoque análogo para amplificar una mezcla de moldes (dianas con extremos conocidos), tal como una pluralidad o biblioteca de moléculas de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico), empleando un solo par de cebadores universales directos e inversos, siempre que cada molécula de molde en la mezcla se modifique mediante la adición de las mismas secuencias de unión de cebadores universales.

Tales enfoques que utilizan un 'cebador universal' para la amplificación por PCR y, en particular, la amplificación en puente en fase sólida, son ventajosos ya que permiten que múltiples moléculas molde de la misma o diferente secuencia, conocida o desconocida, se amplifiquen en una sola reacción de amplificación, que puede llevarse a cabo sobre un soporte sólido que porta un solo par de cebadores 'universales'. La amplificación simultánea de una mezcla de moldes de diferentes secuencias se puede llevar a cabo de otro modo con una pluralidad de pares de cebadores, siendo cada par complementario con un molde único en la mezcla. La generación de una pluralidad de pares de cebadores para cada molde individual puede ser farragosa y cara para mezclas complejas de moldes. En determinadas aplicaciones tales como la detección de la presencia de una infección vírica o microbiana o para caracterizar una población de microbios, se pueden diseñar oligonucleótidos de amplificación de manera que solo se amplifique el ácido nucleico de los microbios.

En la preparación de una matriz agrupada, normalmente cuanto mayor es la concentración de molde utilizado, mayor es la densidad de agrupamientos que se producirán en una matriz agrupada. Si la densidad de agrupamientos es demasiado grande, puede ser difícil resolver individualmente cada agrupamiento y pueden formarse colonias solapantes. Se puede realizar una titulación para determinar la concentración óptima de molde para alcanzar una densidad de agrupamiento óptima sobre la matriz en la que cada agrupamiento se puede resolver por separado. Sin embargo, tales titulaciones pueden conducir a una pérdida de valiosos canales de células de flujo debido a una densidad de agrupamientos que es demasiado alta o demasiado baja, una pérdida de muestra de molde, un incremento del nivel de reactivos necesarios o un incremento en el tiempo de procesamiento de la muestra.

10

Por tanto, se necesita un método para controlar y conseguir la densidad deseada de agrupamiento que sea independiente de la concentración de la muestra de ácido nucleico original y que evite las etapas de titulación de ácido nucleico. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona otras ventajas adicionales.

## 15 Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona, en algunas realizaciones, un método para seleccionar y amplificar polinucleótidos. El método puede incluir (a) proporcionar una muestra de ácido nucleico que tiene una pluralidad de polinucleótidos molde; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido en el que la pluralidad de oligonucleótidos incluye (i) una pluralidad de oligonucleótidos de captura teniendo cada uno una secuencia diferente capaz de hibridar con una región seleccionada de la muestra de ácido nucleico y (ii) una pluralidad de oligonucleótidos de amplificación, en el que los oligonucleótidos de captura se inmovilizan a una densidad más baja que los oligonucleótidos de amplificación; (c) aplicar los polinucleótidos molde al soporte sólido en tales condiciones que los polinucleótidos molde hibridan selectivamente con los oligonucleótidos de captura; (d) elongar los oligonucleótidos de captura para generar productos de elongación complementarios a los polinucleótidos molde; y (e) amplificar los productos de elongación utilizando dichas una o más secuencias de amplificación inmovilizadas sobre el soporte sólido.

En un aspecto particular, la divulgación proporciona un método de control de la secuencia y densidad de colonias de polinucleótidos monocatenarios amplificados formados sobre un soporte sólido. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos molde; (b) proporcionar una pluralidad de al menos tres oligonucleótidos inmovilizados en un soporte sólido en el que al menos uno de los oligonucleótidos es un oligonucleótido de captura capaz de hibridar con los polinucleótidos molde y al menos dos de los oligonucleótidos son oligonucleótidos de amplificación que son incapaces de hibridar con los polinucleótidos molde, en el que los oligonucleótidos de captura se inmovilizan a una densidad más baja que los oligonucleótidos de amplificación y los oligonucleótidos de captura son selectivos para una porción de la pluralidad de polinucleótidos molde; (c) aplicar los polinucleótidos molde al soporte sólido en condiciones adecuadas de manera que las moléculas de polinucleótidos molde hibridan selectivamente con los oligonucleótidos de captura; (d) elongar los oligonucleótidos de captura empleando una polimerasa de ácido nucleico para generar productos de elongación bicatenarios complementarios con los polinucleótidos molde monocatenarios; (e) desnaturalizar los productos de elongación bicatenarios para eliminar las moléculas de molde polinucleotídico monocatenario hibridadas de los productos de elongación para producir moléculas de molde monocatenario inmovilizadas sobre el soporte sólido; y (f) amplificar las moléculas molde monocatenarias inmovilizadas sobre el soporte sólido empleando dichos uno o más oligonucleótidos de amplificación inmovilizados sobre el soporte sólido; en el que la densidad de las colonias inmovilizadas se controla mediante la densidad de los oligonucleótidos de captura más que por la concentración de los polinucleótidos molde monocatenarios.

La divulgación también proporciona en algunas realizaciones una célula de flujo uniformemente injertada con una pluralidad de oligonucleótidos, en la que la pluralidad incluye cuatro especies de oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, en la que dos de las cuatro especies (por ejemplo, una primera especie y una segunda especie) están presentes a una densidad mejor que las otras dos especies (por ejemplo, una tercera y una cuarta especie).

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un método de la divulgación en el que el oligonucleótido de captura es más largo que los oligonucleótidos de amplificación y el molde hibrida selectivamente con el oligonucleótido de captura que se extiende más allá del oligonucleótido de amplificación. El oligonucleótido de captura se extiende frente a la cadena molde y la cadena molde se desnaturaliza y se elimina. La copia del molde inmovilizada puede hibridar con uno de los oligonucleótidos de amplificación inmovilizados y el oligonucleótido de amplificación se puede elongar. El oligonucleótido de captura también comprende una secuencia que corresponde a uno de los oligonucleótidos de amplificación y así tras la síntesis de un dúplex de la copia del molde inmovilizada, ambos extremos del dúplex inmovilizado pueden comprender secuencias complementarias a uno de los oligonucleótidos de amplificación.

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

65

La Figura 3 muestra un método ejemplar de la invención en el que uno de los oligonucleótidos de amplificación está bloqueado inicialmente para la elongación de cadena. Después de elongar la cadena molde inmovilizada, se elimina el bloqueo y la muestra puede continuar mediante ciclos de amplificación en puente.

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

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

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

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

La Figura 8 muestra un ensayo para analizar una población de microbios utilizando la secuenciación de ARN ribosómico 16S. Los oligonucleótidos de captura sobre el soporte se muestran como selectivos para dos de las regiones constantes del gen de ARN ribosómico 16S bacteriano (8F y 553R). Estos dos cebadores se pueden utilizar para amplificar aproximadamente 500 pares de bases del gen de aproximadamente 1500 pares de bases e incluyen las regiones variables V1, V2 y V3. Los oligonucleótidos de captura se producen por elongación de los oligonucleótidos de amplificación P5 y P7. Los oligonucleótidos de captura se utilizan entonces para capturar específicamente los fragmentos de los genes de ARNr 16S de la muestra. Seguidamente se elongan los oligonucleótidos de captura. Cada oligonucleótido de captura elongado puede convertirse en un agrupamiento mediante amplificación de fase sólida utilizando oligonucleótidos de amplificación. La secuenciación de los agrupamientos proporciona información acerca de los miembros de la población de microbios debido a diferentes regiones de ARN 16S capturadas y secuenciadas, dado que cada microbio tiene una secuencia génica 16S característica.

#### Descripción detallada de la invención

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

Los métodos que se exponen en el presente documento se pueden utilizar con aquellos que se describen en la patente de Estados Unidos US8977765 que incluyen, por ejemplo, métodos para controlar la densidad de agrupamientos mediante el uso de oligonucleótidos de captura sobre un soporte sólido. En realizaciones particulares, los métodos que se exponen en el presente documento incluyen el uso de oligonucleótidos de captura para seleccionar un subconjunto de la muestra de ácido nucleico y así controlar la secuencia de los agrupamientos y el número, o densidad, de agrupamientos sobre el soporte.

En realizaciones en las que las superficies se derivatizan con ácidos nucleicos para la formación posterior de agrupamientos amplificados, la densidad de los agrupamientos sobre el soporte se puede controlar mediante la densidad de uno de los cebadores inmovilizados utilizados para capturar las muestras molde. La densidad de cebadores en cada chip se puede controlar durante la fabricación, simplemente mediante la proporción entre los oligonucleótidos de captura y los oligonucleótidos de amplificación y así la densidad de agrupamientos puede ser independiente de la concentración o dilución de la muestra molde. Por ejemplo, se pueden utilizar condiciones en las que la muestra molde se encuentra en un exceso molar respecto a los cebadores, de manera que la densidad de agrupamientos será básicamente la misma incluso si la concentración de molde se incrementa adicionalmente. Esta

independencia de la concentración elimina la necesidad de medir con precisión la concentración inicial de molde bicatenario y es independiente de la dilución exacta de la muestra. La densidad de agrupamientos sobre chips múltiples se puede hacer considerablemente uniforme mediante el control de la proporción y la concentración de oligonucleótidos de captura respecto a los oligonucleótidos de amplificación unidos a la superficie del chip. Dado que los cebadores normalmente se pueden sintetizar y manipular en condiciones más controladas que las muestras molde que se derivan de diferentes fuentes biológicas, los métodos que se exponen en el presente documento proporcionan una reproducibilidad mayor en la creación de matrices de agrupamiento. Se proporcionan ventajas adicionales mediante la creación de grupos de cebadores en una proporción deseada que se pueden reutilizar para crear múltiples matrices de agrupamientos que tienen densidad reproducible.

De acuerdo con los métodos expuestos en el presente documento se pueden inmovilizar una pluralidad de oligonucleótidos en un soporte sólido. La pluralidad puede incluir diferentes especies de molécula de oligonucleótido, cada una con una secuencia diferente. Por ejemplo, una pluralidad de oligonucleótidos puede incluir al menos dos especies diferentes de oligonucleótidos, al menos tres especies diferentes, al menos cuatro especies diferentes o más, en la que una primera especie tiene una secuencia diferente respecto a la otra especie en la pluralidad. Se entenderá que diferentes especies de oligonucleótido pueden compartir una secuencia común mientras haya una diferencia de secuencia en al menos una porción de las diferentes especies. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, las dos especies identificadas como P5' y P5'BloqHibr comparten una secuencia común, pero la especie P5'BloqHibr tiene una secuencia que forma una horquilla adicional que no se encuentra en la especie P5'.

El término 'inmovilizado', como se utiliza en el presente documento, tiene por objeto abarcar la unión directa o indirecta a un soporte sólido mediante enlace(s) covalente(s) o no covalente(s). En ciertas realizaciones de la divulgación, se puede utilizar la unión covalente, pero normalmente todo lo que se necesita es que las moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) permanezcan inmovilizadas o unidas a un soporte en condiciones en las que se tiene la intención de usar el soporte, por ejemplo en aplicaciones que requieren amplificación y/o secuenciación de ácido nucleico. Normalmente, los oligonucleótidos que se utilizan como oligonucleótidos de captura o como oligonucleótidos de amplificación se inmovilizan de manera que un extremo 3' queda disponible para la elongación enzimática y al menos una porción de la secuencia es susceptible de hibridación con una secuencia complementaria. La inmovilización puede suceder mediante hibridación con un oligonucleótido unido a la superficie, en cuyo caso el oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado puede estar en la orientación 3'-5'. Como alternativa, la inmovilización puede suceder por otros medios distintos a la hibridación por emparejamiento de bases, tales como la unión covalente que se expuso anteriormente.

El término 'soporte sólido', como se utiliza en el presente documento, se refiere a un sustrato insoluble o matriz a la que se pueden unir moléculas, tales como, por ejemplo, perlas de látex, perlas de dextrano, superficies de poliestireno, superficies de polipropileno, gel de poliacrilamida, superficies de oro, superficies de vidrio y obleas de silicio. El soporte sólido puede ser una superficie de vidrio plana. El soporte sólido se puede montar sobre el interior de una célula de flujo para permitir la interacción con soluciones de diversos reactivos.

En ciertas realizaciones, el soporte sólido puede comprender un sustrato o matriz inerte que se ha 'funcionalizado', por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o revestimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente a moléculas tales como los polinucleótidos. A modo de ejemplo no limitante, tales soportes pueden incluir capas de hidrogel de poliacrilamida sobre un sustrato inerte tal como el vidrio. En tales realizaciones, las moléculas (por ejemplo, polinucleótidos) pueden estar unidas covalentemente directamente a la capa intermedia (por ejemplo, un hidrogel), pero la capa intermedia puede estar en sí misma unida no covalentemente a otras capas del sustrato o matriz (por ejemplo, un sustrato de vidrio). Por consiguiente, se debe considerar que la unión covalente a un soporte sólido abarca este tipo de disposición.

Los 'oligonucleótidos cebadores' u 'oligonucleótidos de amplificación' son secuencias de oligonucleótido que son capaces de hibridar específicamente con una secuencia de polinucleótido monocatenario a amplificar en las condiciones experimentadas en una primera etapa de hibridación del cebador de una reacción de amplificación. Normalmente, los términos 'ácido nucleico', 'polinucleótido' y 'oligonucleótido' se usan de manera intercambiable en el presente documento. Las diferentes expresiones no están destinadas a indicar alguna diferencia en tamaño en particular, secuencia u otra propiedad a menos que se indique específicamente otra cosa. Para una mayor claridad de la descripción, las expresiones se pueden utilizar para distinguir una especie de molécula de otra cuando se describe un método o composición en particular que incluye varias especies moleculares.

Una secuencia de polinucleótido que ha de ser copiada o amplificada normalmente se denomina un 'molde' en el presente documento. Un molde puede incluir sitios de unión al cebador que flanquean una secuencia de molde que ha de ser amplificada. Un molde hibridado con un oligonucleótido de captura puede contener bases que se elongan más allá del extremo 5' del oligonucleótido de captura de tal manera que no todo el molde es susceptible de elongación. En realizaciones particulares, como se expone en mayor detalle a continuación, una pluralidad de polinucleótidos de molde incluye diferentes especies que difieren en sus secuencias molde, pero que tienen sitios de unión al cebador que son los mismos para dos o más de las diferentes especies. Los dos sitios de unión al cebador que pueden flanquear una secuencia molde en particular pueden tener la misma secuencia, tal como una secuencia palindrómica o una secuencia homopolimérica o bien, los dos sitios de unión al cebador pueden tener diferentes secuencias. En

- consecuencia, una pluralidad de diferentes polinucleótidos molde puede tener la misma secuencia de unión al cebador o dos secuencias de unión al cebador diferentes en cada extremo de la secuencia molde. Por tanto, las especies en una pluralidad de polinucleótidos molde pueden incluir regiones de secuencia conocida que flanquean regiones de secuencia desconocida que han de ser evaluadas, por ejemplo, mediante secuenciación. Los polinucleótidos molde pueden llevar una sola especie de adaptador para actuar como una secuencia de unión al cebador en un solo extremo únicamente. En los casos en los que los moldes llevan un adaptador en un solo extremo, este puede estar en el extremo 3' o en el 5'. Los polinucleótidos molde se pueden utilizar sin ningún adaptador, en cuyo caso la secuencia de unión al cebador proviene directamente de una secuencia que se halla en la muestra de ácido nucleico.
- 10 Normalmente, las reacciones de amplificación emplean al menos dos oligonucleótidos de amplificación, a menudo denominados cebadores 'directos' e 'inversos'. Normalmente, los oligonucleótidos de amplificación son estructuras de polinucleótido monocatenario. Pueden también contener una mezcla de bases naturales o no naturales y también uniones a la cadena principal naturales y no naturales, siempre que, al menos en algunas realizaciones, cualquier modificación no natural no impida permanente o irreversiblemente su función como un cebador (ésta definida como la capacidad de hibridar con una cadena de polinucleótido molde durante las condiciones de una reacción de elongación o amplificación y de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de una nueva cadena de polinucleótido complementaria a la cadena molde hibridada). Ahora bien, en ciertas realizaciones, la presente invención puede implicar el uso de un subconjunto de cebadores, directos o inversos, que han sido modificados para impedir la hibridación con una cadena de polinucleótido molde, alterándose o revirtiéndose la modificación en algún momento de manera que la hibridación ya no se impida.

- Los cebadores pueden comprender adicionalmente modificaciones químicas no nucleotídicas, por ejemplo, para facilitar la unión covalente del cebador a un soporte sólido. Algunas modificaciones químicas pueden por sí mismas mejorar la función de la molécula como un cebador o pueden proporcionar alguna otra funcionalidad útil, tales como proporcionar un sitio de escisión que permita al cebador (o una cadena de polinucleótido elongada derivada de la misma) escindirse de un soporte sólido. Las modificaciones químicas útiles pueden proporcionar también modificaciones reversibles que evitan la hibridación o la elongación del cebador hasta que la modificación se elimina o se revierte. Asimismo, otras moléculas unidas a una superficie de acuerdo con la divulgación pueden incluir fracciones enlazadoras escindibles y/o modificaciones reversibles que alteran una actividad química en particular de la función de la molécula.

- Una pluralidad de oligonucleótidos utilizados en los métodos que se exponen en el presente documento pueden incluir especies que funcionan como oligonucleótidos de captura. Los oligonucleótidos de captura pueden incluir una 'porción específica de molde', concretamente, una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con una región seleccionada de la muestra de ácido nucleico en una molécula de polinucleótido de interés, tal como una que se va a amplificar. Los oligonucleótidos de captura pueden comprender una secuencia que es específica para un subconjunto de las moléculas en una muestra de ácido nucleico. Así, en estas realizaciones y en otras relacionadas, se puede seleccionar solo un subconjunto de las moléculas en la muestra mediante oligonucleótidos de captura para convertirse en polinucleótidos molde. Los oligonucleótidos de captura pueden comprender una sola especie de oligonucleótido o pueden comprender dos o más especies con una secuencia diferente. Así, el oligonucleótido de captura puede ser de dos o más secuencias, 10 o más secuencias, 100 o más secuencias, 1.000 o más secuencias o 10.000 o más secuencias. Las secuencias de unión al cebador, normalmente, serán de secuencia conocida y por tanto, complementaria de una región de secuencia conocida de la molécula de polinucleótido monocatenario. Los oligonucleótidos de captura pueden incluir un oligonucleótido de captura y un oligonucleótido de amplificación. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, un oligonucleótido de captura puede ser de mayor longitud que los oligonucleótidos de amplificación que están unidos al mismo sustrato, en cuyo caso el extremo 5' de los oligonucleótidos de captura puede comprender una región con la misma secuencia que uno de los oligonucleótidos de amplificación. Una porción de un molde, tal como el extremo 3' del molde, puede ser complementario del 3' de los oligonucleótidos de captura. El extremo 5' del molde puede contener una región que comprende una secuencia idéntica a uno de los oligonucleótidos de amplificación de manera que tras copiar el molde, la copia puede hibridar con el oligonucleótido de amplificación inmovilizado. Por tanto, una especie de oligonucleótido que es útil en los métodos que se exponen en el presente documento puede tener un oligonucleótido de captura, un oligonucleótido de amplificación o ambos. Por el contrario, una especie de oligonucleótido puede carecer de un oligonucleótido de captura, un oligonucleótido de amplificación o ambos. En este sentido, la especificidad de hibridación de una especie de oligonucleótido se puede ajustar para una aplicación de los métodos en particular.

- La longitud de las moléculas de unión al cebador no tiene por qué ser la misma que las de secuencias conocidas de moléculas molde de polinucleótido y pueden ser más cortas en ciertas realizaciones, por ejemplo, siendo particularmente de 16-50 nucleótidos, más particularmente de 16-40 nucleótidos y aún más particularmente de 20-30 nucleótidos de longitud. La longitud deseada de los oligonucleótidos cebadores dependerá de una serie de factores. Sin embargo, normalmente los cebadores son suficientemente largos (complejos) de modo que la probabilidad de hibridación con secuencias distintas a la secuencia de unión al cebador es muy baja. En consecuencia, las secuencias conocidas que flanquean una secuencia molde pueden incluir una porción de unión al cebador y otras porciones tales como un oligonucleótido de captura, una secuencia etiqueta o una combinación de las mismas.

65

La 'amplificación en fase sólida', cuando se usa refiriéndose a ácidos nucleicos, se refiere a cualquier reacción de amplificación de ácido nucleico llevada a cabo sobre o en asociación con un soporte sólido. Normalmente, todos o una porción de los productos amplificados se sintetizan mediante elongación de un cebador inmovilizado. En particular, el término abarca las reacciones de amplificación en fase sólida análogas a las amplificaciones en fase de solución estándar, excepto que al menos uno de los oligonucleótidos de amplificación está inmovilizado sobre el soporte sólido.

Como se apreciará por el lector experto, una reacción de amplificación de ácido nucleico dada puede llevarse a cabo con al menos un tipo de cebador directo y al menos un tipo de cebador inverso específico para el molde a amplificar. Sin embargo, en determinadas realizaciones, los cebadores directos e inversos pueden incluir porciones específicas del molde de secuencia idéntica. En otras palabras, es posible llevar a cabo la amplificación en fase sólida utilizando solo un tipo de cebador y tales métodos de cebadores individuales se engloban dentro del ámbito de la invención. Dicho tipo de cebador puede incluir (a) un(os) subconjunto(s) de cebador(es) modificado(s) que se ha(n) modificado para impedir la hibridación con una cadena de polinucleótido molde, eliminando la modificación, alterándola o revirtiéndola en algún momento de manera que la hibridación ya no se impida. Otras realizaciones pueden utilizar cebadores directos e inversos que contienen secuencias específicas de molde pero que difieren en algunas características estructurales. Por ejemplo, un tipo de cebador puede contener una modificación no nucleotídica que no está presente en el otro. En otra realización más, las secuencias específicas de molde son diferentes y solo se utiliza un cebador en un método de amplificación lineal. En otras realizaciones de la divulgación, los cebadores directos e inversos pueden contener porciones específicas de secuencia distinta.

En ciertas realizaciones de la divulgación, los oligonucleótidos de amplificación para la amplificación en fase sólida están inmovilizados por unión covalente al soporte sólido cerca o en el extremo 5' del cebador, de manera que una porción del cebador está libre para hibridar con su molde afín y el grupo de hidroxilo 3' está libre para operar en la elongación del cebador. De nuevo, en ciertas realizaciones se proporciona un subconjunto de cebadores modificados a los que se les impide la hibridación y/o elongación hasta que la modificación se elimina, revierte o altera. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos de amplificación serán incapaces de hibridar con el molde inicial monocatenario. En tales realizaciones, la hibridación del molde monocatenario normalmente será específica para los oligonucleótidos de captura de manera que la cantidad de oligonucleótidos de captura sobre la superficie determina la cantidad de molde capturado y así la densidad de los agrupamientos amplificados resultantes.

La química de unión elegida dependerá normalmente de la naturaleza del soporte sólido y de cualquier funcionalización o derivatización que se le aplique. En el caso de realizaciones de ácidos nucleicos, el propio cebador puede incluir una fracción que puede ser una modificación química no nucleotídica para facilitar la unión. Por ejemplo, el cebador puede contener un nucleófilo que contiene azufre tal como un fosfortioato o un tiofosfato en el extremo 5'. En el caso de hidrogeles de poliacrilamida en soporte sólido, este nucleófilo se puede unir a un grupo bromoacetamida presente en el hidrogel. En una realización, los medios de unión de los cebadores al soporte sólido es mediante unión de fosfortioato 5' a un hidrogel compuesto por acrilamida polimerizada y N-(5-bromoacetamidilpentil)acrilamida (BRAPA).

Se puede formar un 'césped' homogéneamente distribuido de oligonucleótidos inmovilizados acoplando (inertando) una solución de especies de oligonucleótidos en el soporte sólido. La solución puede contener una población homogénea de oligonucleótidos pero normalmente contendrá una mezcla de diferentes especies de oligonucleótido. La mezcla puede incluir, por ejemplo, al menos dos, tres o más especies diferentes de oligonucleótido. Cada superficie que se expone a la solución, por lo tanto, reacciona con la solución para crear una densidad uniforme de secuencias inmovilizadas sobre todo el soporte sólido expuesto. Por tanto, una porción de la superficie que tiene una mezcla de diferentes secuencias inmovilizadas puede estar rodeada de un área de la superficie que tiene una mezcla de las mismas secuencias inmovilizadas. Una densidad adecuada de oligonucleótidos de amplificación es de al menos 1 fmol/mm<sup>2</sup> (6 x 10<sup>10</sup> por cm<sup>2</sup>) o más óptimamente de al menos 10 fmol/mm<sup>2</sup> (6 x 10<sup>11</sup> por cm<sup>2</sup>). La densidad de los oligonucleótidos de captura se puede controlar para dar una densidad de agrupamiento óptima de 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> agrupamientos por cm<sup>2</sup>. La proporción de especies de oligonucleótidos de captura respecto a las especies de oligonucleótidos de amplificación puede ser cualquier valor deseado, incluyendo, pero sin limitarse a al menos 1:100, 1:1.000 o 1:100.000 dependiendo de la densidad de agrupamiento y de la intensidad deseados. Se pueden utilizar densidades o proporciones similares de otras especies moleculares en realizaciones donde las moléculas que no son ácidos nucleicos están unidas a una superficie.

Los oligonucleótidos de captura se pueden depositar sobre el soporte sólido al mismo tiempo que los oligonucleótidos de amplificación. Como alternativa, especialmente en situaciones en las que los polinucleótidos molde no llevan secuencias complementarias a los oligonucleótidos de amplificación, los oligonucleótidos de captura se pueden producir utilizando un soporte sólido que lleva solo oligonucleótidos de amplificación mediante la elongación de una porción de los oligonucleótidos de amplificación utilizando una copia de los oligonucleótidos de captura como un molde. Por ejemplo, se puede preparar una población de sondas de oligonucleótidos que contienen una secuencia complementaria de uno de los oligonucleótidos de amplificación y una secuencia que elonga más allá los oligonucleótidos de amplificación. Esta población de oligonucleótidos puede hibridar con los oligonucleótidos de amplificación sobre el soporte a una densidad suficientemente baja de modo que solo una porción de los oligonucleótidos de amplificación sobre el soporte queden hibridados. Por ejemplo, las moléculas hibridadas pueden

tener resolución individualmente de manera que la distancia media entre moléculas vecinas es suficientemente grande como para que dos moléculas se puedan detectar por separado mediante microscopía óptica. La porción de los oligonucleótidos de amplificación con moléculas hibridadas se puede someter a elongación, por ejemplo, utilizando una polimerasa y nucleósidos trifosfato. Esto tiene la ventaja de que los oligonucleótidos de captura se pueden producir a partir de un soporte sólido convencional estándar que contiene solo los oligonucleótidos de amplificación, es decir, se puede preparar el mismo soporte sólido para utilizarlo en todas las aplicaciones sin necesidad de fabricar un soporte diferente cada vez que se modifica la secuencia de los oligonucleótidos de captura; y diseñar los oligonucleótidos de captura por separado y añadirlos al soporte.

10 Previamente, la densidad de moléculas unidas de polinucleótido monocatenario y por tanto, la densidad de agrupamientos se ha controlado mediante la alteración de la concentración de las moléculas de polinucleótido molde aplicadas a un soporte. Utilizando un cebador modificado u oligonucleótido de captura como se expone en el presente documento, la densidad de agrupamientos sobre la matriz amplificada se puede controlar sin depender de la titulación minuciosa de la concentración de partida de la cadena de polinucleótido molde aplicada al soporte sólido. Esto tiene la ventaja básica de que los métodos no necesitan depender de mediciones de concentración exactas y de diluciones de las moléculas de polinucleótidos molde, conduciendo, por tanto, a una mayor fiabilidad, reducción de errores en la dilución y una reducción en el tiempo y cantidad de reactivos necesarios en los procesos posteriores. Para cada soporte sólido que contiene demasiados o demasiado pocos agrupamientos, hay una reducción de la cantidad de datos generados para un análisis de agrupamientos. Esto puede significar que la generación de la profundidad de la cobertura necesaria de la muestra puede requerir ciclos de análisis adicionales que no serían necesarios si la densidad de los agrupamientos fuese óptima. Demasiados agrupamientos causan saturación óptica y un aumento de solapamiento entre dos moléculas amplificadas; demasiado pocos agrupamientos causan grandes cantidades de indeseable espacio oscuro que no produce ningún dato, desperdiándose de esta manera reactivos que se utilizan más eficazmente con una superficie densamente poblada.

25 En una realización particular, para cada agrupamiento, una copia complementaria inmovilizada de una molécula molde de polinucleótido monocatenario se une al soporte sólido mediante un método de hibridación y elongación del cebador. Los métodos de hibridación para la formación de dúplex estables entre secuencias complementarias por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick son conocidos en la técnica. Los oligonucleótidos de captura inmovilizados pueden incluir una región de secuencia que es complementaria de una porción específica de una región o molde de la molécula de polinucleótido molde monocatenario. Se puede llevar a cabo una reacción de elongación a continuación, en la que el oligonucleótido de captura se elonga mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar una copia complementaria de la secuencia del polinucleótido monocatenario unido al soporte sólido mediante el oligonucleótido de captura. La secuencia de polinucleótido monocatenario no inmovilizado en el soporte se puede separar de la secuencia complementaria en condiciones de desnaturalización y eliminarse, por ejemplo, mediante lavado.

Las expresiones 'separar' y 'que separa', cuando se utilizan refiriéndose a cadenas de un ácido nucleico, se refieren a la disociación física de las bases de ADN que interactúan dentro de, por ejemplo, un dúplex de ADN de Watson-Crick de la secuencia de polinucleótido monocatenario y su complemento. Las expresiones también se refieren a la separación física de estas cadenas. Por tanto, la expresión se puede referir al proceso de crear una situación en la que resulta posible la hibridación de otra secuencia de oligonucleótido o polinucleótido cebador con una de las cadenas de un dúplex. Después de la primera reacción de elongación, el dúplex queda inmovilizado mediante una sola unión 5' y, por tanto, la separación de cadena puede dar como resultado la pérdida de una de las cadenas de la superficie. En los casos en los que ambas cadenas del dúplex queden inmovilizadas, la separación de las cadenas supone que el dúplex se convierte en dos cadenas individuales inmovilizadas.

En un aspecto de la divulgación, uno o más de los oligonucleótidos de amplificación se pueden modificar para impedir la hibridación de una región o porción específica de molde de la molécula de polinucleótido monocatenario. Como alternativa o adicionalmente, uno o más de los oligonucleótidos de amplificación se puede modificar para impedir la elongación del cebador durante una o más reacciones de elongación, impidiendo así la copia de los moldes hibridados. Estas modificaciones pueden ser temporales o permanentes.

Normalmente, los oligonucleótidos de captura incluirán una región de la misma secuencia que la pluralidad de los oligonucleótidos de amplificación. Una vez que el extremo 3' de la copia del molde inmovilizado elongado ha hibridado con uno de los oligonucleótidos de amplificación y se ha elongado, el dúplex resultante se inmovilizará en ambos extremos y todas las bases en la secuencia del oligonucleótido de captura se habrán copiado. Así el oligonucleótido de captura puede incluir la secuencia del oligonucleótido de amplificación, junto a una secuencia adicional que es complementaria del extremo o de la región central del molde. Normalmente la secuencia complementaria del molde no estará presente en ninguno de los oligonucleótidos de amplificación. Como alternativa, los oligonucleótidos de amplificación pueden contener las secuencias complementarias a los moldes, pero los oligonucleótidos de amplificación se pueden bloquear de forma reversible para evitar la hibridación y/o la elongación durante una o más etapas de la elongación, tal como una primera etapa de elongación en un proceso de amplificación en particular.



De acuerdo con un aspecto de la divulgación, uno o más oligonucleótidos de amplificación puede incluir una modificación que actúa como un bloqueo reversible de la hibridación del molde o la elongación o ambos. A modo de ejemplo no limitante, tales modificaciones se pueden manifestar como la presencia de una secuencia adicional de nucleótidos que es complementaria al oligonucleótido de amplificación. Esta secuencia adicional puede estar presente en una porción del oligonucleótido de amplificación y actuar así como un dúplex de horquilla intramolecular o un grupo de bloqueo de 3' que impide la elongación del cebador. Como alternativa, la secuencia adicional se puede encontrar en un oligonucleótido separado que hibrida con el oligonucleótido de amplificación. Una característica particular de tal modificación es que se puede eliminar, alterar o revertir de manera que la funcionalidad del oligonucleótido cebador modificado se restaura y el cebador es capaz de someterse a hibridación y elongación durante las etapas posteriores de los métodos. Entre otros ejemplos, el grupo de bloqueo puede ser una especie química pequeña tal como una fracción 3' fosfato que se puede eliminar enzimáticamente, puede ser un nucleótido abásico de manera que el extremo 3' del cebador no es capaz de hibridar (y por tanto de elongarse) o puede ser una secuencia de nucleótidos que se pueden escindir selectivamente de las cadenas inmovilizadas, por ejemplo, utilizando endonucleasas de restricción que escinden secuencias en particular o desglucosilasas que escinden selectivamente oligonucleótidos que tiene bases exógenas tales como desoxirribonucleótidos de uracilo u 8-oxoguanina.

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

La muestra de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria. Con el fin de obtener una hibridación eficaz, la muestra bicatenaria se puede desnaturalizar para originar moléculas de polinucleótido monocatenario. Las moléculas de polinucleótido monocatenario se han podido originar en forma monocatenaria, como ADN o ARN o se han podido originar en una forma de ADN bicatenario (ADNdc) (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico, productos de amplificación y PCR y similares). Así un polinucleótido monocatenario puede ser la cadena sentido o antisentido de un dúplex de polinucleótido. Se conocen bien en la técnica métodos para la preparación de moléculas de polinucleótidos monocatenarios adecuados para utilizar en el método de la invención empleando técnicas estándar. La secuencia precisa de las moléculas de polinucleótidos primarias puede ser conocida o desconocida durante las distintas etapas de los métodos que se exponen en el presente documento. Se entenderá que una molécula de polinucleótido bicatenario se puede hibridar con un oligonucleótido de captura inmovilizado como se ejemplifica en el presente documento para las moléculas de polinucleótido monocatenario, siempre que una región monocatenaria del polinucleótido bicatenario esté disponible y sea complementaria de la secuencia del oligonucleótido de captura.

En la Figura 2 se muestra un método ejemplar para el aislamiento de una cadena de una construcción molecular bicatenaria. Una muestra de secuencia desconocida se puede fragmentar y se pueden unir los adaptadores a los extremos de cada fragmento. Una cadena de los adaptadores puede contener una fracción para la inmovilización de superficie, por ejemplo una biotina que se puede capturar en una superficie de estreptavidina. Los adaptadores pueden ser adaptadores de desemparejamiento, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0128624 en trámite junto con la presente. La amplificación del desemparejamiento o los adaptadores bifurcados que utilizan un par de oligonucleótidos de amplificación, uno de los cuales lleva una modificación de biotina significa que una cadena de cada dúplex lleva una modificación de biotina. La inmovilización de las cadenas sobre una superficie de estreptavidina significa que la cadena no biotinilada se puede eluir simplemente por desnaturalización/separación de la cadena. Las construcciones eluidas estarán en una forma monocatenaria y, tras la exposición a condiciones de hibridación, se pueden utilizar para hibridar contra los oligonucleótidos de captura inmovilizados, que se pueden elongar.

En una realización particular, las moléculas de polinucleótido monocatenario son moléculas de ADN. Más particularmente, las moléculas de polinucleótido monocatenario representan moléculas de ADN genómico o amplicones de las mismas, que incluyen secuencias intrón y exón (secuencia codificante), así como secuencias reguladoras no codificantes tales como secuencias promotoras y potenciadoras. Todavía más particularmente, las moléculas de polinucleótido monocatenario son moléculas de ADN genómico humano o amplicones de las mismas.

En una realización particular, las moléculas de ácido nucleico se pueden aislar de una muestra biológica que comprende una mezcla de diferentes organismos. Por ejemplo, la muestra puede contener o incluir una mezcla de diferentes bacterias o virus, tal como la que puede estar presente en las células, tejidos o fluidos de un organismo individual, que, en ciertas realizaciones, puede ser un ser humano u otro vertebrado. Con el fin de averiguar qué microbios están presentes en la muestra, el 'microbioma', se pueden secuenciar regiones de la muestra específicas de bacterias, por ejemplo la región del gen de ARN ribosómica 16S de la muestra de ADN. Así, los oligonucleótidos de amplificación o los oligonucleótidos de captura pueden ser selectivos para una de las regiones constantes encontradas en la región del gen de ARNr 16S para todas las bacterias o la región del gen 18S común en diferentes eucariotas.

Una realización del método descrito en el presente documento se puede utilizar para seleccionar y formar agrupamientos del gen ribosómico 16S de cualquier bacteria. Entre las bacterias adecuadas se incluyen (pero no se

pretende que se limiten a) *Acinetobacter baumannii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium beijerinckii*, *Deinococcus radiodurans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus gasseri*, *Listeria monocytogenes*, *Methanobrevibacter smithii*, *Neisseria meningitidis*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,  
 5 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pneumoniae*.

- La muestra, por ejemplo, una muestra obtenida de un intestino humano, heces, saliva o piel, se pueden tratar para extraer el ácido nucleico presente en la muestra. El ácido nucleico total extraído de la muestra se puede someter a fragmentación y se puede poner en contacto con un soporte sólido que lleva oligonucleótidos de amplificación y captura  
 10 como se describe en el presente documento. Si los oligonucleótidos de captura individuales llevan una región de secuencia que es complementaria a una secuencia de genes compartida entre todas las bacterias, entonces los ácidos nucleicos bacterianos se capturarán y los otros ácidos nucleicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos virales o humanos no. Los ácidos nucleicos bacterianos se pueden entonces amplificar para formar agrupamientos. Las regiones variables de los ácidos nucleicos capturados se pueden detectar, por ejemplo, mediante secuenciación. La secuencia  
 15 de las regiones variables proporciona información que se puede utilizar para identificar las bacterias a partir de las que se obtuvieron. Tras la secuenciación de los agrupamientos, la proporción entre los números de dos o más bacterias en una muestra se puede calcular contando el número de veces que se obtiene una lectura de secuencia en particular entre los millones de agrupamientos sobre el soporte sólido.
- 20 La amplificación específica de la muestra bacteriana es posible si los oligonucleótidos de amplificación solo son complementarios del ácido nucleico bacteriano. Los oligonucleótidos de captura se pueden modificar para seleccionar ácidos nucleicos a partir de una bacteria o un virus en particular. Se pueden utilizar múltiples oligonucleótidos de captura diferentes para optimizar la selección del ácido nucleico del organismo deseado.
- 25 Los oligonucleótidos de captura para la selección de regiones del gen 16S pueden contener las siguientes secuencias:

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

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

- Los oligonucleótidos de captura pueden estar unidos directamente a los oligonucleótidos de amplificación, por ejemplo, mediante la preparación de oligonucleótidos que contienen oligonucleótidos de amplificación y de captura en una única  
 30 construcción y uniendo ésta a un soporte sólido. Como alternativa, los oligonucleótidos de captura se pueden preparar uniendo los oligonucleótidos de amplificación a un soporte e hibridando un oligonucleótido con una secuencia complementaria a la secuencia del oligonucleótido de captura y la secuencia del oligonucleótido de amplificación al oligonucleótido de amplificación. Los oligonucleótidos complementarios pueden actuar como moldes para la preparación de los oligonucleótidos de captura por extensión de los oligonucleótidos de amplificación.
- 35 En una realización particular, una molécula de polinucleótido diana monocatenario tiene dos regiones de secuencia conocida. Todavía más particularmente, las regiones de secuencia conocida estarán en los extremos 5' y 3' de la molécula de polinucleótido monocatenario de tal manera que la molécula de polinucleótido monocatenario será de la estructura:
- 40 5'[Secuencia conocida I] - [secuencia de polinucleótido diana] - [secuencia conocida II] - 3'
- Normalmente, la 'secuencia conocida I' y la 'secuencia conocida II' comprenderán más de 20 o más de 40 o más de 50 o más de 100 o más de 300 nucleótidos consecutivos. La longitud precisa de las dos secuencias puede o no ser idéntica. Las secuencias de unión al cebador, normalmente, serán de secuencia conocida y, por tanto, serán  
 45 particularmente complementarias de una secuencia dentro de la secuencia conocida I y la secuencia conocida II de la molécula de polinucleótido monocatenario. La longitud de las secuencias de unión al cebador no tiene por qué ser la misma que la de las secuencias conocidas I o II y puede ser más corta, siendo particularmente de 16-50 nucleótidos, más particularmente de 16-40 nucleótidos y aún más particularmente de 20-30 nucleótidos de longitud. La secuencia conocida I puede ser la misma que la secuencia conocida II o las dos pueden ser diferentes.
- 50 Los métodos de hibridación para la formación de dúplex estables entre secuencias complementarias por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick son conocidos en la técnica. Una región o parte de las moléculas molde de polinucleótido monocatenario puede ser complementaria de al menos una parte de los oligonucleótidos de captura

inmovilizados. La pluralidad de polinucleótidos de la muestra que no actúan como moldes debido a la no hibridación con los oligonucleótidos de captura puede ser eliminada del soporte sólido, por ejemplo, mediante lavado u otra forma de flujo de fluido. Dado que los oligonucleótidos de amplificación se modifican para evitar la hibridación y/o la elongación o no son complementarios de las cadenas molde, solo los oligonucleótidos de captura serán capaces de hibridación y elongación. Se puede llevar a cabo una reacción de elongación a continuación, en la que el oligonucleótido de captura se elonga mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar un producto de elongación que es una copia complementaria del polinucleótido molde monocatenario unido al soporte sólido mediante el oligonucleótido de captura. La secuencia de polinucleótido molde monocatenario no inmovilizado en el soporte se puede separar de la secuencia complementaria en condiciones de desnaturalización y eliminarse, por ejemplo, mediante lavado. La distancia entre el oligonucleótido de captura individual sobre la superficie controla entonces la densidad de los polinucleótidos molde monocatenarios y así también se controla la densidad de agrupamientos formados después en la superficie.

En realizaciones tales como la que se muestra en la Figura 3, en las que los oligonucleótidos de cebador directo modificados se bloquean y no se pueden elongar, normalmente todos los oligonucleótidos de amplificación hibridarán con los polinucleótidos molde monocatenarios. Cuando se lleva a cabo la reacción de elongación, solo los oligonucleótidos de captura directos no modificados se elongan mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar una copia complementaria del polinucleótido molde monocatenario unido al soporte sólido mediante el oligonucleótido cebador directo no modificado. Las secuencias de polinucleótido molde monocatenario no hibridado con el soporte se puede separar de los oligonucleótidos cebadores directos bloqueados no elongados en condiciones de desnaturalización y eliminarse, por ejemplo, mediante lavado con un desnaturalizante químico tal como la formamida. La distancia entre los oligonucleótidos del cebador directo no modificado sobre la superficie controla entonces la densidad de los polinucleótidos molde monocatenarios y así también se controla la densidad de agrupamientos formados después en la superficie.

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

En una realización de la divulgación, la molécula de polinucleótido molde monocatenario se puede unir al soporte sólido mediante ligadura a cebadores bicatenarios inmovilizados en el soporte sólido utilizando métodos de ligadura conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, *supra*). Tales métodos utilizan enzimas ligasas como la ADN ligasa para llevar a cabo o catalizar la unión de los extremos de las dos cadenas de polinucleótidos, en este caso, la molécula de polinucleótido molde monocatenario y el oligonucleótido cebador ligan de manera que se forman enlaces covalentes. En este contexto, 'que unen' significa la unión covalente de dos cadenas de polinucleótidos que antes no se han unido covalentemente. Por tanto, un objetivo de ciertas realizaciones de la divulgación también se puede conseguir modificando el extremo 3' de un subconjunto de oligonucleótidos cebadores de manera que no se puedan ligar a los polinucleótidos molde monocatenarios. A modo de ejemplo no limitante, la adición de 2'3'dideoxi AMP (dideoxiAMP) por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) evita eficazmente que la T4 ADN ligasa ligue entre sí moléculas tratadas.

Un método alternativo podría ser tener los oligonucleótidos de captura como cadenas dúplex y los oligonucleótidos de amplificación como cadenas simples. Tras la ligadura de las cadenas simples a los dúplex de captura (que sería la única especie inmovilizada llevando un fosfato 5' libre), el extremo 3' de la cadena inmovilizada se puede elongar como se describió anteriormente. Tras la desnaturalización de la secuencia molde hibridada, la amplificación de la cadena inmovilizada puede continuar como se describe. Otros de tales métodos para unir cadenas simples serán evidentes para los expertos en la materia.

En una siguiente etapa de acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, se aplican las condiciones adecuadas a la molécula de polinucleótido monocatenario inmovilizada y la pluralidad de oligonucleótidos de amplificación de manera que la molécula de polinucleótido monocatenario hibrida con un oligonucleótido de amplificación para formar un complejo en la forma de una estructura en puente. Se conocen bien en la técnica las condiciones adecuadas, tales como la neutralización y/o los tampones de hibridación (véase Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998)). Después se puede retirar el tampón de neutralización y/o de hibridación.

A continuación, aplicando las condiciones adecuadas para la elongación se realiza una reacción de elongación. El oligonucleótido de amplificación del complejo se elonga mediante la adición secuencial de nucleótidos para generar

un producto de elongación complementario de la molécula de polinucleótido monocatenaria. El dúplex resultante se inmoviliza en ambos extremos 5' de manera que se inmoviliza cada cadena.

Se conocen bien en la técnica las condiciones adecuadas, tales como los tampones/soluciones de elongación que comprenden una enzima con actividad de polimerasa (véase Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al. *supra*). En una realización particular, se pueden incluir dNTP en el tampón de elongación. En una realización adicional, los dNTP se pueden añadir antes del tampón de elongación. Esta técnica de amplificación en puente se puede llevar a cabo como se describe, por ejemplo, en los documentos US 7.115.400 y US 2005/0100900 A1.

- 10 Son ejemplos de enzimas con actividad polimerasa que se pueden utilizar en la presente invención la ADN polimerasa (fragmento de Klenow, ADN polimerasa de T4), ADN polimerasas termoestables de una variedad de bacterias termoestables (tales como ADN polimerasas Taq, VENT, Pfu o Tfi), así como sus derivados modificados genéticamente (TaqGold, VENTexo o Pfu exo). También se puede utilizar una combinación de ARN polimerasa y transcriptasa inversa para generar los productos de elongación. Particularmente, la enzima puede tener, en estas y otras realizaciones relacionadas, una actividad de desplazamiento de cadena, más particularmente, la enzima puede ser activa a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, particularmente de pH 7,9 a pH 8,8, y todavía más particularmente las enzimas son, en ciertas realizaciones ejemplares, Bst o Klenow.

Las moléculas de nucleósido trifosfato que se utilizan generalmente son desoxirribonucleótidos trifosfato, por ejemplo dATP, dTTP, dCTP, dGTP o son ribonucleósidos trifosfato, por ejemplo ATP, UTP, CTP, GTP. Las moléculas de nucleósido trifosfato pueden estar presentes en la naturaleza o no.

Después de las etapas de hibridación y elongación, el soporte y los ácidos nucleicos unidos se pueden someter a condiciones de desnaturalización. Se puede utilizar una célula de flujo de manera que, el tampón de elongación normalmente se elimina mediante el flujo del tampón de desnaturalización. Se conocen bien en la técnica los tampones de desnaturalización adecuados (véase Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al. *supra*). A modo de ejemplo, se sabe que las alteraciones en el pH y las soluciones de baja fuerza iónica pueden desnaturalizar los ácidos nucleicos a temperaturas básicamente isotérmicas. La formamida y la urea forman nuevos enlaces de hidrógeno con las bases de los ácidos nucleicos alterando los enlaces de hidrógeno que provocan el emparejamiento de bases de Watson-Crick. En una realización particular, la concentración de formamida es del 50% o más. Esto da como resultado moléculas de ácido nucleico monocatenario. Si se desea, las cadenas se pueden separar mediante tratamiento con una solución muy baja en sal (por ejemplo, menos de unas condiciones catiónicas de 0,01 M) y pH alto (> 12) o mediante el uso de una sal caotrópica (por ejemplo, cloruro de guanidino). En una realización particular se utiliza una base fuerte. Una base fuerte es un compuesto químico básico que tiene la capacidad de desprotonar ácidos muy débiles en una reacción ácido-base. La fuerza de una base se indica mediante su valor  $pK_b$ , los compuestos con un valor  $pK_b$  de menos de aproximadamente 1 se denominan bases fuertes y se conocen bien por los expertos en la materia. En una realización particular, la base fuerte es una solución de hidróxido de sodio (NaOH) utilizada a una concentración de 0,05 M a 0,25 M, en particular 0,1 M.

Después de las etapas de hibridación, elongación y desnaturalización ejemplificadas anteriormente, estarán presentes dos ácidos nucleicos inmovilizados, conteniendo el primero una secuencia igual que la de la primera molécula de polinucleótido monocatenario molde (que se inmovilizó inicialmente) y siendo el segundo un ácido nucleico complementario del mismo, que se elonga desde uno de los oligonucleótidos de captura inmovilizados. Ambas cadenas inmovilizadas son después capaces de iniciar nuevas rondas de amplificación sometiendo el soporte a ciclos adicionales de hibridación, elongación y desnaturalización. Así, la amplificación avanza desde una cadena simple a un dúplex, desde un dúplex a dos dúplex, desde dos dúplex a cuatro dúplex, etc., a través de los ciclos de hibridación, elongación y desnaturalización.

Puede ser ventajoso realizar etapas de lavado opcionales entre cada etapa del método de amplificación. Por ejemplo, se podría aplicar un tampón de elongación sin enzima polimerasa con o sin dNTP al soporte sólido antes de que sea eliminado y reemplazado con todo el tampón de elongación.

Se pueden utilizar tales rondas adicionales de amplificación para producir una colonia de ácido nucleico o 'agrupamiento' que comprende múltiples copias inmovilizadas de la secuencia de polinucleótido monocatenario y su secuencia complementaria.

La inmovilización inicial de la molécula de polinucleótido molde significa que el producto de elongación puede hibridar con oligonucleótidos de amplificación situados a una distancia dentro de la longitud total de la molécula de polinucleótido molde. Otros cebadores unidos a la superficie que están fuera de alcance no hibridarán con el producto de elongación. Por tanto, el límite de la colonia o agrupamiento de ácido nucleico formado está limitado a un área relativamente local alrededor de la ubicación en la que se inmovilizó la molécula de polinucleótido molde inicial.

Una vez más, las copias de la molécula de productos de elongación del polinucleótido y sus complementarias se han sintetizado mediante la realización de rondas adicionales de amplificación, es decir, rondas adicionales de hibridación, elongación y desnaturalización, entonces el límite de la colonia o agrupamiento de ácido nucleico que se está

generando se podrá elongar adicionalmente, aunque el límite de la colonia formada está todavía limitado a un área relativamente local alrededor de la ubicación en la que se inmovilizó la molécula de polinucleótido molde inicial. Por ejemplo, el tamaño de cada agrupamiento amplificado puede ser de 0,5-5 micrómetros y se puede controlar por el número de ciclos realizados.

5 Por tanto, se puede ver que el método de la presente divulgación permite la generación de una pluralidad de colonias de ácidos nucleicos a partir de múltiples moléculas de polinucleótido monocatenarias inmovilizadas y que la densidad de estas colonias se puede controlar mediante la alteración de las proporciones de los oligonucleótidos de captura/amplificación modificados utilizados para injertar la superficie del soporte sólido.

10 En una realización, las etapas de hibridación, elongación y desnaturalización se llevan todas a cabo a la misma temperatura, básicamente isotérmica. Por ejemplo, la temperatura va de 37 °C a aproximadamente 75 °C, particularmente de 50 a 70 °C, todavía más particularmente de 60 °C a 65 °C. En una realización particular, la temperatura básicamente isotérmica puede ser la temperatura óptima para la polimerasa deseada.

15 En un aspecto particular, el método de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación se utiliza para preparar matrices agrupadas de colonias de ácido nucleico, análogas a las descritas en los documentos US 7.115.400, US 2005/0100900 A1, WO 00/18957 y WO 98/44151, mediante amplificación en fase sólida.

20 En otro aspecto adicional, más de un oligonucleótido de captura y más de dos oligonucleótidos de amplificación, por ejemplo, al menos tres o cuatro o más, secuencias diferentes de oligonucleótidos de amplificación se pueden injertar en el soporte sólido. De este modo, se podrían utilizar para preparar agrupamientos más de una biblioteca, con secuencias comunes que difieren entre bibliotecas, tales como, por ejemplo, bibliotecas preparadas de dos pacientes diferentes. Como alternativa, se podrían amplificar distintas regiones seleccionadas simultáneamente mediante el uso  
25 de distintos oligonucleótidos de amplificación. Si bien los agrupamientos pueden solapar en el espacio, se podrían secuenciar uno tras otro debido a las diferencias entre los extremos de los moldes. Por ejemplo, se pueden capturar dos muestras diferentes utilizando dos oligonucleótidos de captura diferentes. Estos se pueden amplificar a partir de los mismos dos oligonucleótidos de amplificación. Las muestras se pueden diferenciar gracias a los dos oligonucleótidos de captura diferentes, que se pueden utilizar como los sitios para la hibridación de dos cebadores de  
30 secuenciación diferentes. Así, el uso de diferentes oligonucleótidos de captura genera un método de indización de la muestra utilizando cebadores de secuenciación diferentes.

Las matrices agrupadas formadas mediante los métodos de la invención son adecuadas para su uso en aplicaciones que a menudo se llevan a cabo en matrices ordenadas tales como las micromatrices. Tales aplicaciones incluyen, a  
35 modo de ejemplo no limitante, análisis de hibridación, análisis de expresión génica, análisis de unión a proteínas, secuenciación, genotipado, análisis de metilación de ácido nucleico y similares. La micromatriz se puede secuenciar antes de utilizarse para aplicaciones posteriores tales como, por ejemplo, hibridación con ARN fluorescente o estudios de unión que utilizan proteínas marcadas fluorescentes.

#### 40 **Métodos de secuenciación**

La divulgación también abarca métodos de secuenciación de ácidos nucleicos amplificados generados mediante amplificación en fase sólida. Por tanto, la divulgación proporciona un método de secuenciación de ácido nucleico que comprende la amplificación de un grupo de moldes de ácido nucleico utilizando la amplificación en fase sólida como  
45 se describió anteriormente y llevando a cabo una reacción de secuenciación de ácido nucleico para determinar la secuencia de todo o una parte de al menos una cadena de ácido nucleico amplificada producida en la reacción de amplificación en fase sólida.

La secuenciación se puede llevar a cabo utilizando cualquier técnica de secuenciación adecuada. Un método  
50 particularmente útil es aquel en el que los nucleótidos se añaden sucesivamente a un grupo hidroxilo 3' libre, lo que da como resultado la síntesis de una cadena de polinucleótido en la dirección 5' a 3'. La naturaleza del nucleótido añadido se puede determinar después de cada adición de nucleótidos o al final del proceso de secuenciación. Las técnicas de secuenciación que utilizan la secuenciación mediante ligadura, en las que no se secuencian todas las bases contiguas y las técnicas tales como la secuenciación masiva en paralelo (MPSS) en la que las bases se eliminan,  
55 en vez de añadirse a las cadenas sobre la superficie, entran también dentro del alcance de la divulgación.

La hibridación de un cebador de secuenciación con un producto de la reacción de amplificación en fase sólida puede proporcionar el punto de iniciación para la reacción de secuenciación. A este respecto, uno o los dos adaptadores añadidos durante la formación de la biblioteca de moldes puede incluir una secuencia de nucleótidos que permite la  
60 hibridación de un cebador de secuenciación con los productos amplificados obtenidos del genoma total o la amplificación en fase sólida de la biblioteca de moldes.

Los productos de las reacciones de amplificación en fase sólida en los que los oligonucleótidos de amplificación directos e inversos están inmovilizados covalentemente sobre la superficie sólida son las llamadas estructuras 'en  
65 puente' formadas por la hibridación de pares de cadenas de polinucleótidos inmovilizadas y cadenas complementarias

inmovilizadas, estando ambas cadenas unidas al soporte sólido en el extremo 5'. Las matrices compuestas de tales estructuras en puente proporcionan moldes ineficaces para las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos típicas, ya que la hibridación de un cebador de secuenciación convencional con una de las cadenas inmovilizadas no se ve favorecida en comparación con la hibridación de esta cadena con su cadena complementaria inmovilizada en 5 condiciones estándar para la hibridación.

Con el fin de proporcionar moldes más adecuados para la secuenciación de ácidos nucleicos, puede resultar ventajoso eliminar o desplazar básicamente todas o al menos una porción de una de las cadenas inmovilizadas en la estructura 'en puente' para generar un molde que al menos es parcialmente monocatenario. La porción del molde que es 10 monocatenario estará disponible, por tanto, para la hibridación con un cebador de secuenciación. El proceso de eliminación de toda o una porción de una cadena inmovilizada en una estructura de ácido nucleico 'en puente' bicatenario puede denominarse en el presente documento 'linealización' y se describe con más detalle en los documentos WO07010251 y US20090118128.

15 Las estructuras de molde en puente se pueden linealizar mediante escisión de una o ambas cadenas con una endonucleasa de restricción o mediante la escisión de una cadena con una endonucleasa de corte. Se pueden utilizar otros métodos de escisión como alternativa a las enzimas de restricción o las enzimas de corte, incluyendo, entre otros, la escisión química (por ejemplo, la escisión de un enlace diol con peryodato), escisión de sitios abásicos mediante escisión con endonucleasa (por ejemplo, 'USER', como la suministrada por NEB, Ipswich, Massachusetts, 20 Estados Unidos de América, número de referencia M5505S), o por exposición al calor o a álcali, escisión de ribonucleótidos incorporados en los productos de amplificación, por lo demás compuestos por desoxirribonucleótidos, escisión fotoquímica o escisión de un enlace peptídico.

Después de la etapa de escisión, independientemente del método utilizado para escindir, el producto de la reacción 25 de escisión se puede someter a condiciones de desnaturalización para eliminar la(s) porción (porciones) de la(s) cadena(s) escindida(s) que esté(n) unida(s) al soporte sólido. Las condiciones de desnaturalización adecuadas, por ejemplo, solución de hidróxido sódico, solución de formamida o calor, serán evidentes para el lector experto en referencia a los protocolos estándar de biología molecular (Sambrook et al., *supra*; Ausubel *et al. supra*). La desnaturalización da como resultado la producción de un molde de secuenciación que es parcial o básicamente 30 monocatenario. Seguidamente puede iniciarse una reacción de secuenciación mediante la hibridación de un cebador de secuenciación con la porción monocatenaria del molde.

Por tanto, dicha divulgación abarca métodos en los que la reacción de secuenciación del ácido nucleico comprende 35 hibridar un cebador de secuenciación con una región monocatenaria de un producto de amplificación linealizado, incorporar secuencialmente uno o más nucleótidos en una cadena de polinucleótido complementaria de la región de cadena molde amplificada a secuencia, identificar la base presente en uno o más de (los) nucleótido(s) incorporado(s) y determinar de este modo la secuencia de una región de la cadena molde.

Un método de secuenciación que se puede utilizar de acuerdo con la divulgación se basa en el uso de nucleótidos 40 modificados que tienen bloqueos de 3' que se pueden quitar, por ejemplo, como se describe en los documentos WO04018497, US 2007/0166705A1 y US7057026. Una vez que el nucleótido modificado se ha incorporado en la cadena del polinucleótido en crecimiento complementaria de la región del molde a secuenciar, no queda ningún grupo 3'-OH libre disponible para dirigir más elongación de la secuencia y, por lo tanto, la polimerasa no puede añadir nucleótidos adicionales. Una vez determinada la naturaleza de la base incorporada en la cadena en crecimiento, el 45 bloqueo de 3' se puede quitar para permitir la adición del siguiente nucleótido sucesivo. Mediante la ordenación de los productos derivados utilizando estos nucleótidos modificados, es posible deducir la secuencia de ADN del molde de ADN. Tales reacciones se pueden realizar en un único experimento si cada uno de los nucleótidos modificados tiene un marcador diferente unido al mismo, conocida por corresponder a la base en particular, para facilitar la discriminación entre las bases añadidas durante cada etapa de incorporación. Como alternativa, se puede llevar a cabo una reacción 50 separada que contenga cada uno de los nucleótidos modificados por separado.

Los nucleótidos modificados pueden llevar un marcador para facilitar su detección. Por ejemplo, puede utilizarse un marcador fluorescente para la detección de nucleótidos modificados. Cada tipo de nucleótido puede llevar, por tanto, un marcador fluorescente diferente, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de Estados 55 Unidos N.º 60/801.270 (Nuevos colorantes y el uso de sus conjugados etiquetados), publicada como el documento WO07135368. El marcador detectable no tiene por qué ser, sin embargo, un marcador fluorescente. Se puede utilizar cualquier marcador que permita la detección de un nucleótido incorporado.

Un método para la detección de nucleótidos marcados con fluorescencia comprende el uso de luz láser de una longitud 60 de onda específica para los nucleótidos marcados o el uso de otras fuentes adecuadas de iluminación. Se puede detectar la fluorescencia del marcador en el nucleótido mediante una cámara CCD u otros medios de detección adecuados. La instrumentación adecuada para la grabación de imágenes de las matrices agrupadas se describe en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º 60/788.248 (Sistemas y dispositivos para secuencia mediante análisis de la síntesis), publicada como el documento WO07123744.

65

La divulgación no pretende limitarse al uso del método descrito anteriormente, principalmente porque se puede utilizar cualquier metodología de secuenciación que se basa en la incorporación sucesiva de nucleótidos en una cadena de polinucleótidos. Las técnicas alternativas adecuadas incluyen, por ejemplo, Pyrosequencing™, FISSEQ (secuenciación fluorescente *in situ*), MPSS y secuenciación por métodos basados en la ligadura, por ejemplo, como se describe en el documento US6306597.

La muestra de ácido nucleico se puede analizar adicionalmente para obtener una segunda lectura desde el extremo opuesto del fragmento. La metodología para secuenciar ambos extremos de un agrupamiento se describe en las solicitudes pendientes de tramitación WO07010252, PCTGB2007/003798 y US 20090088327. En un ejemplo, la serie de etapas se puede realizar como sigue; generar agrupamientos, linealizar, hibridar el primer cebador de secuenciación y obtener la primera lectura de secuenciación. El primer cebador de secuenciación se puede eliminar y en los casos en los que una secuencia de etiqueta esté en el agrupamiento, un segundo cebador hibridado y la etiqueta secuenciada. La cadena de ácido nucleico se puede 'invertir' seguidamente sobre la superficie mediante la síntesis de una copia complementaria del resto de cebadores inmovilizados utilizados en la amplificación del agrupamiento. Este proceso de resíntesis de cadena regenera el agrupamiento bicatenario. La cadena molde original se puede eliminar, para linealizar la cadena resintetizada que, a continuación, se puede hibridar con un cebador de secuenciación y secuenciar en un segundo o tercer ciclo de secuenciación.

En los casos en el que se emplea la resíntesis de cadena, ambas cadenas están inmovilizadas en la superficie de manera que se permita la liberación posterior de una porción de la cadena inmovilizada. Esto se puede lograr a través de varios mecanismos como se describe en los documentos WO07010251 y US20090118128. Por ejemplo, un cebador puede contener un nucleótido de uracilo, lo que significa que la cadena puede escindirse en la base de uracilo utilizando las enzimas uracilo glicosilasas (UAG) que eliminan la base nucleosídica y la endonucleasa VIII que escinde el nucleótido abásico. Esta combinación de enzimas está disponible como USER™ de New England Biolabs (NEB, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos de América, número de referencia M5505). El segundo cebador puede comprender un nucleótido de 8-oxoguanina, que se puede escindir a continuación mediante la enzima FPG (NEB número de referencia M0240). Este diseño de cebadores permite controlar cuál es el cebador que se escinde, en qué momento del proceso y también en qué parte del agrupamiento se produce la escisión. Los cebadores también pueden modificarse químicamente, por ejemplo, con una modificación disulfuro o diol que permite la escisión química en ubicaciones específicas.

### **Células de flujo**

La divulgación también se refiere a células de flujo para la preparación de matrices amplificadas de ácidos nucleicos en las que las células de flujo contienen un revestimiento uniforme de tres, cuatro o más cebadores inmovilizados. Por tanto, un sustrato descrito en el presente documento puede darse dentro o como una parte de una célula de flujo y los métodos expuestos en el presente documento se pueden llevar a cabo en una célula de flujo. En contraste con las matrices de dos canales de secuencias múltiples, los tres, cuatro o más oligonucleótidos pueden revestir toda superficie de la matriz, en lugar de ubicaciones discretas que comprenden diferentes secuencias en cada pequeña ubicación. Las matrices pueden ser del tamaño de 1 cm<sup>2</sup> o mayor en virtud del cual la totalidad de ese 1 cm<sup>2</sup> o más comprende un revestimiento homogéneo de múltiples copias de las mismas tres, cuatro o más secuencias. Una célula de flujo se puede diferenciar de una "matriz de dos canales" o matriz fotolitográficamente sintetizada por el hecho de que los oligonucleótidos están unidos en todas y cada una de las superficies; parte superior, parte inferior, paredes y fondos de la cámara de la célula de flujo, más que ser una matriz que está montada en una carcasa. Sin embargo, si se desea, una célula de flujo que se utiliza en un método expuesto en el presente documento puede tener superficies con diferente reactividad para oligonucleótidos de manera que los oligonucleótidos solo estén unidos a una o a un subconjunto de las superficies anteriormente mencionadas o incluso a solo un subconjunto de regiones dentro de estas superficies.

En ciertas realizaciones, la célula de flujo puede estar revestida con tres especies de oligonucleótidos de diferente composición de secuencia, concretamente, dos oligonucleótidos de amplificación y un oligonucleótido de captura. En ciertas realizaciones, la célula de flujo puede estar revestida con no más de las tres especies de oligonucleótidos. Sin embargo, en otras realizaciones particulares, la célula de flujo puede incluir adicionalmente una o más especies de oligonucleótidos, ya sea un oligonucleótido de amplificación, oligonucleótido de captura u otras especies de oligonucleótido. El oligonucleótido de captura puede estar presente a una concentración más baja que el oligonucleótido de amplificación, por ejemplo, al menos una concentración relativa 100, 1.000 o 100.000 veces más baja. Los dos oligonucleótidos de amplificación pueden estar presentes en similares proporciones entre sí, por ejemplo, variando en menos de un factor de dos. Los oligonucleótidos de captura pueden ser más largos que los oligonucleótidos de amplificación y pueden comprender la región de la secuencia del oligonucleótido de amplificación más una región del oligonucleótido de captura, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1. Como alternativa o adicionalmente, los oligonucleótidos de amplificación se pueden bloquear para evitar la hibridación y/o la elongación. La secuencia de los oligonucleótidos de captura puede ser distinta entre diferentes oligonucleótidos de captura. En ciertas realizaciones relacionadas, pero diferentes, la célula de flujo puede estar revestida con al menos cuatro especies de oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, en la que al menos una primera y una segunda de las cuatro especies están presentes a una densidad más baja que la tercera y cuarta de las cuatro especies. Por ejemplo,

la primera y segunda especie pueden ser oligonucleótidos de captura y la tercera y cuarta especie pueden ser oligonucleótidos de amplificación. Por tanto, en las realizaciones descritas anteriormente y en otras realizaciones relacionadas que están contempladas, un soporte sólido puede llevar dos o más oligonucleótidos de captura de diferentes secuencias. La secuencia de los oligonucleótidos de captura puede permitir la selección de una porción conocida de la muestra de ácido nucleico. Las secuencias de captura se pueden producir mediante la elongación de algunas o todas las secuencias de amplificación.

Aunque la invención se ha ejemplificado en el presente documento para realizaciones que utilizan especies de ácido nucleico, se entenderá que se pueden aplicar los mismos principios a otras especies moleculares. Por ejemplo, se pueden derivatizar superficies de sustratos con otras moléculas sintéticas tales como péptidos, ligandos de moléculas pequeñas, sacáridos o similares. Controlando la cantidad de especies diferentes de tales moléculas en la etapa de derivatización, se puede generar una densidad deseada de cada especie. Se pueden utilizar muestras de moléculas que se unen a una o más de estas moléculas de la fase sólida sin la necesidad de titulación de las muestras porque la densidad de moléculas de la muestra que se unen a las superficies estará controlada por la densidad de sus parejas sobre la superficie. En consecuencia, la fijación de moléculas de la muestra se puede controlar termodinámicamente en un proceso que se permite que avance hasta el equilibrio al contrario de un proceso cinético que requiere de un control más preciso de las condiciones de reacción y tiempos de incubación. Una vez unidas las moléculas de la muestra a la superficie, posteriormente se pueden modificar o detectar. En tales realizaciones, la superficie puede incluir moléculas sintéticas modificadas reversiblemente de manera que la alteración o la eliminación de la modificación puede permitir que las moléculas de la muestra se modifiquen o se detecten para un ensayo analítico particular o etapa.

Aunque la invención expuesta se ha descrito en algún detalle con fines de claridad y comprensión, estará claro para los expertos en la materia, a partir de la lectura de esta divulgación, que pueden hacerse diversos cambios en la forma y el detalle sin alejarse del verdadero alcance de dicha invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente se pueden utilizar en diversas combinaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Illumina, Inc.
- <120> MÉTODOS PARA SELECCIONAR Y AMPLIFICAR POLINUCLEÓTIDOS
- <130> ILU090803PEP
- 35 <160> 6
- <170> BiSSAP 1.3.6
- 40 <210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 1  
agagtttgat cctggctcag 20
- 50 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 2  
aaggagtgat tccagccgca 20
- 60 <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 3  
 actcctacgg gaggcagcag 20

<210> 4  
 <211> 19  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 4  
 ttaccgcggc tgctggcac 19

<210> 5  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 5  
 mwacgcgarr aaccttacc 19

<210> 6  
 <211> 19  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6  
 35 cgacarccat gcascacct 19

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de secuenciación de un polinucleótido selectivo, que comprende:
  - 5 a) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de amplificación inmovilizados sobre un soporte sólido;
  - b) hibridar una población de sondas de oligonucleótidos con un subconjunto de los oligonucleótidos de amplificación para producir una población de oligonucleótidos de amplificación hibridados, comprendiendo cada una de las sondas de oligonucleótido una primera porción complementaria a uno o más de los oligonucleótidos de amplificación y una segunda porción que comprende una secuencia de una región seleccionada de un polinucleótido plantilla;
  - 10 c) llevar a cabo la reacción de elongación para elongar los oligonucleótidos de amplificación hibridados para producir una población de oligonucleótidos de captura inmovilizados sobre el soporte sólido, comprendiendo cada uno de los oligonucleótidos de captura una secuencia complementaria de una región seleccionada de un polinucleótido plantilla; en la que los oligonucleótidos de captura comprenden al menos 10 secuencias de captura diferentes;
  - 15 d) hibridar selectivamente una población de polinucleótidos plantilla con los oligonucleótidos de captura para producir una población de oligonucleótidos de captura hibridados, en el que cada uno de los polinucleótidos plantilla comprende una secuencia adaptadora 5' idéntica a al menos una porción de los polinucleótidos de amplificación que permanecen sin elongar;
  - 20 e) elongar los oligonucleótidos de captura hibridados para generar una población de productos de elongación, teniendo cada uno de los productos de elongación una primera porción complementaria a un polinucleótido molde y una segunda porción complementaria a al menos una porción de los oligonucleótidos de amplificación no elongados;
  - 25 f) amplificar los productos de elongación mediante hibridación de uno o más de los oligonucleótidos de amplificación no elongados con uno o más de los productos de elongación, produciendo de este modo una pluralidad de productos de amplificación en fase sólida; y
  - g) secuenciar los productos de amplificación en fase sólida para obtener al menos secuencias parciales de nucleótidos de los polinucleótidos plantilla.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en el que cada uno de los productos de amplificación en fase sólida comprende un sitio de unión para un cebador de secuenciación universal.
3. El método de la reivindicación 1, en el que los oligonucleótidos de amplificación no elongados están bloqueados de forma reversible durante la elongación de los oligonucleótidos de captura hibridados.
- 35 4. El método de la reivindicación 3, en el que el bloqueo reversible se efectúa mediante una especie química unida al extremo 3' de los oligonucleótidos de amplificación no elongados.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la especie química es un grupo fosfato.
- 40 6. El método de la reivindicación 1, en el que la amplificación es isotérmica.
7. El método de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos plantilla comprenden secuencias diferentes y la secuencia de adaptador es la misma para cada uno de los polinucleótidos plantilla.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en el que cada uno de los oligonucleótidos de amplificación comprende una secuencia común idéntica a la secuencia de adaptador.
9. El método de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos plantilla comprenden amplicones de PCR.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos plantilla comprenden fragmentos de ADN genómico.
11. El método de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos plantilla proceden de ADN libre de células.
- 55 12. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente la etapa de someter los oligonucleótidos de captura de la etapa c) a condiciones de desnaturalización antes de la etapa d).
13. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente la etapa de someter los productos de elongación de la etapa e) a condiciones de desnaturalización antes de la etapa f).

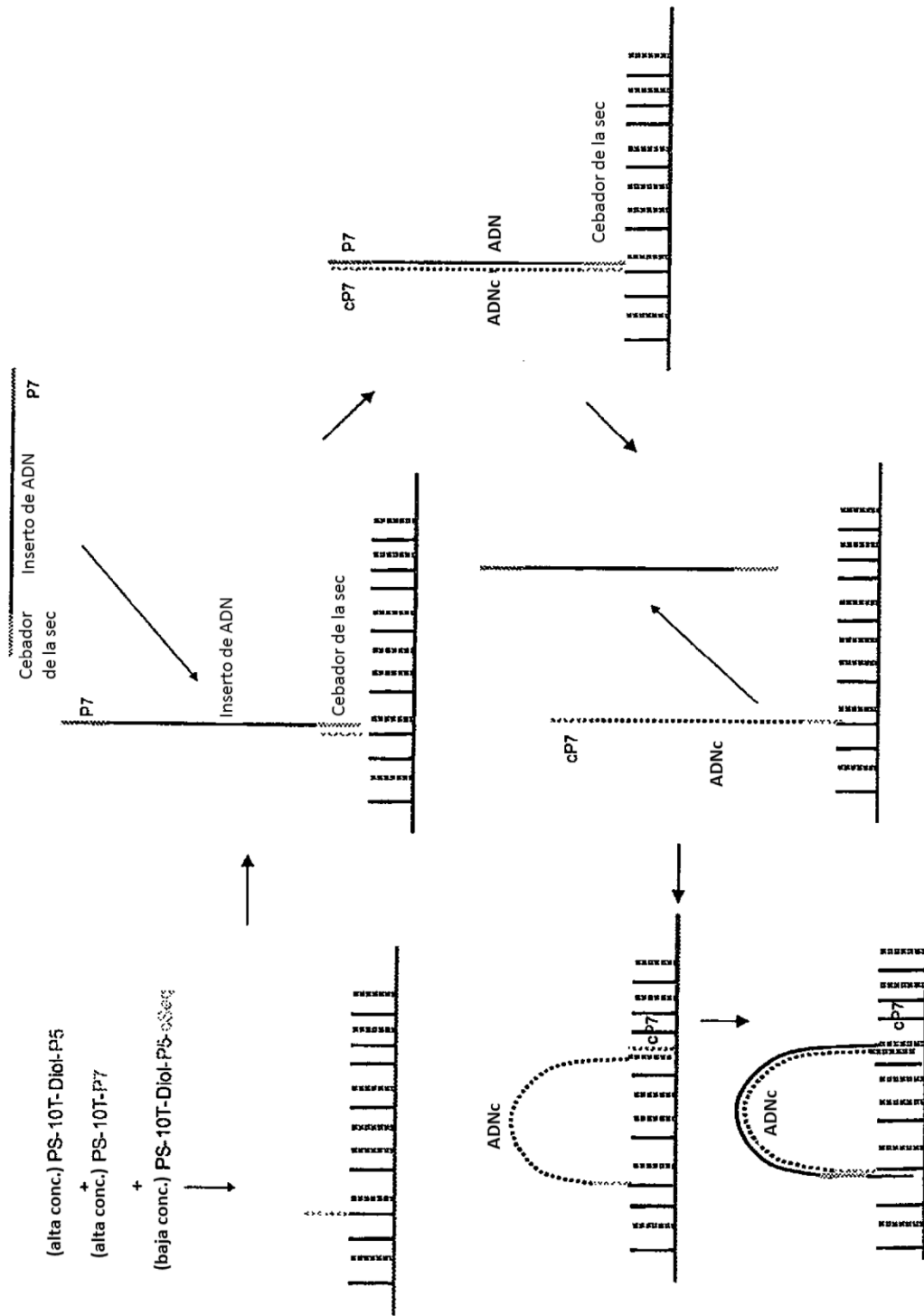


Fig 1

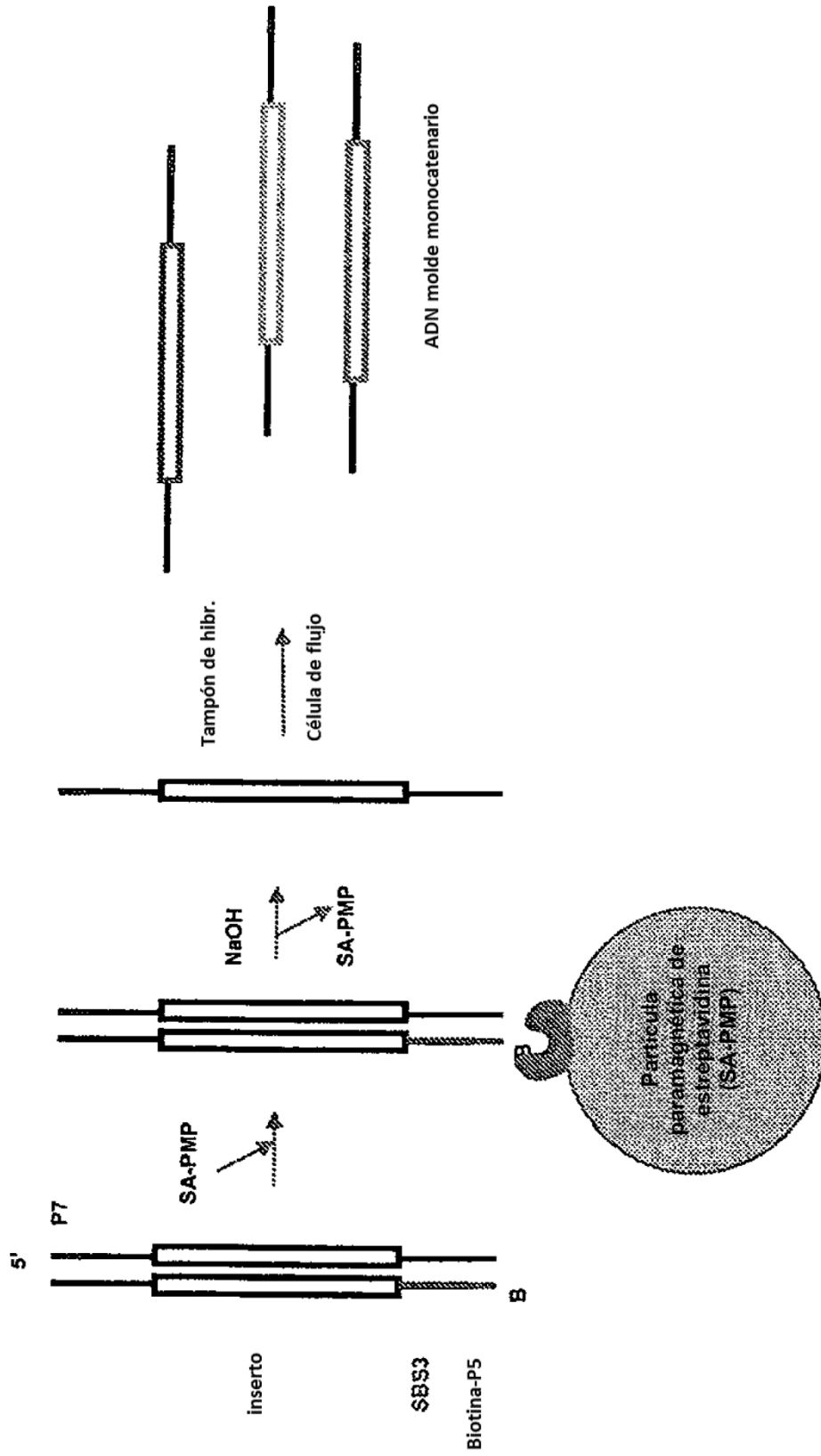


Fig 2

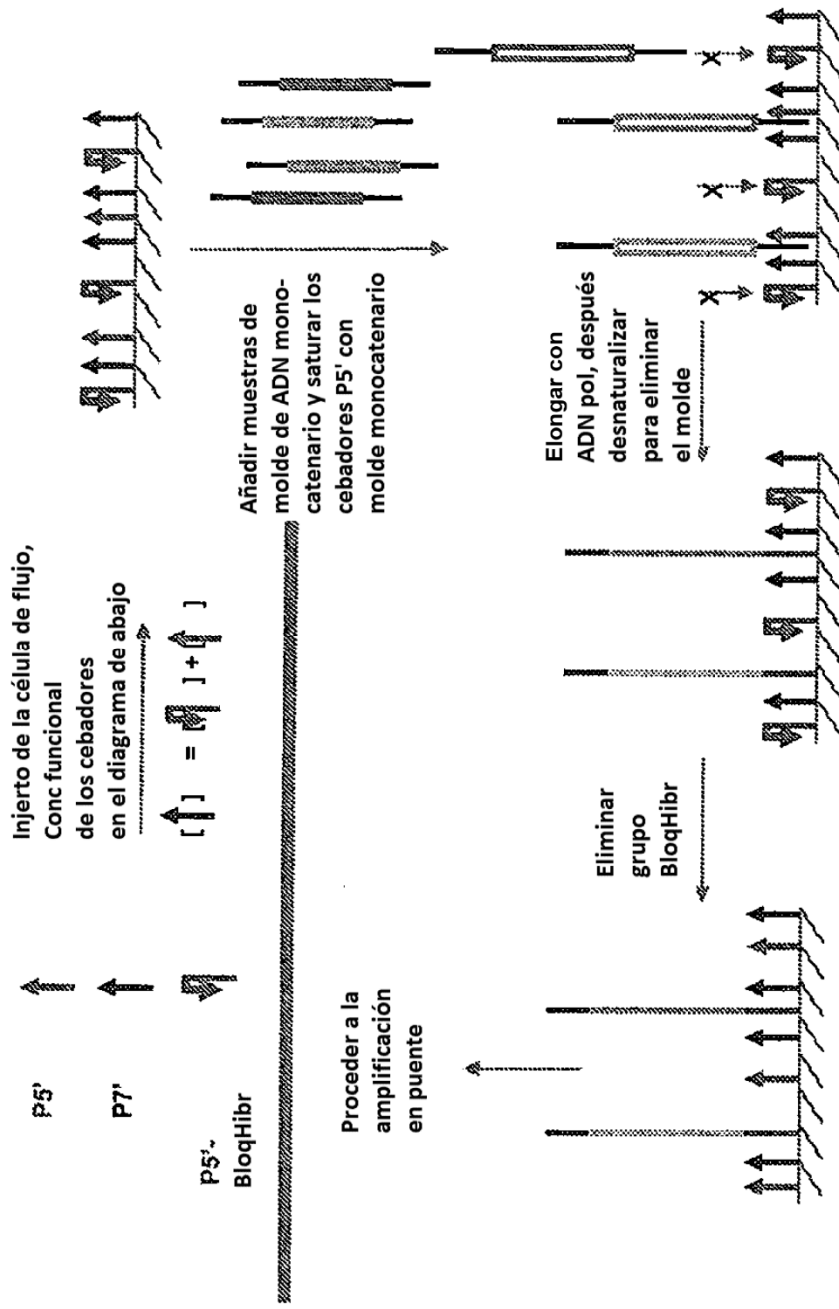


Fig 3

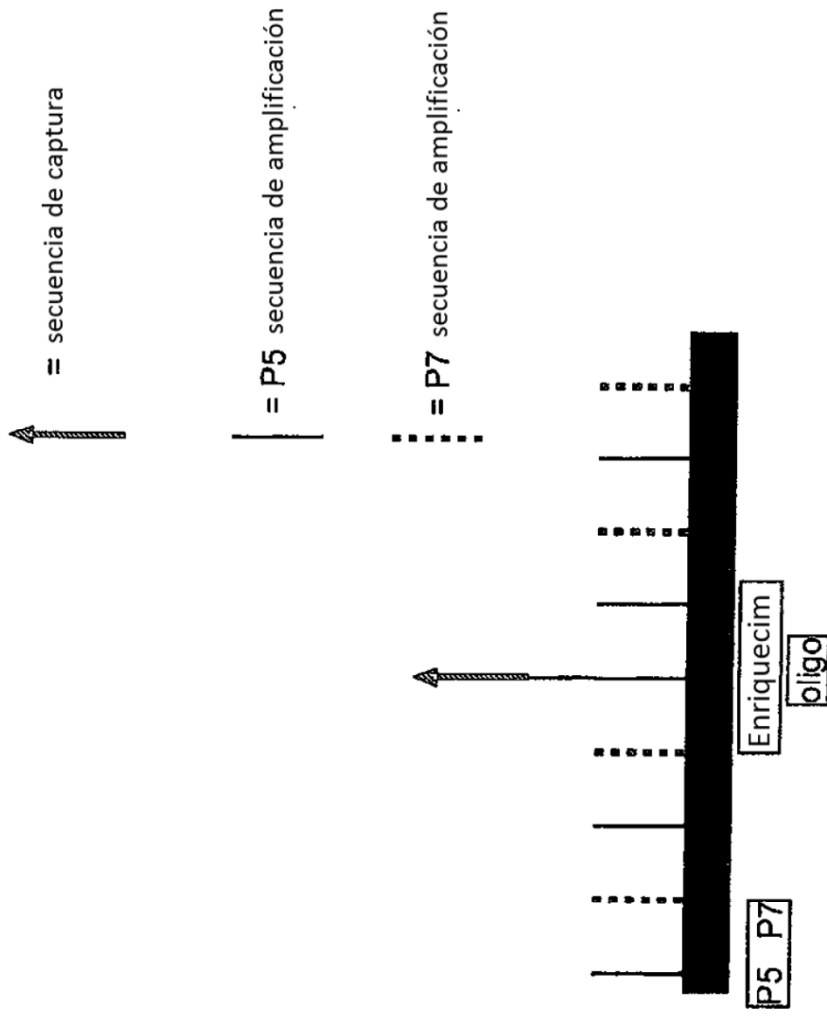


Fig 4

2. Construcción de la biblioteca

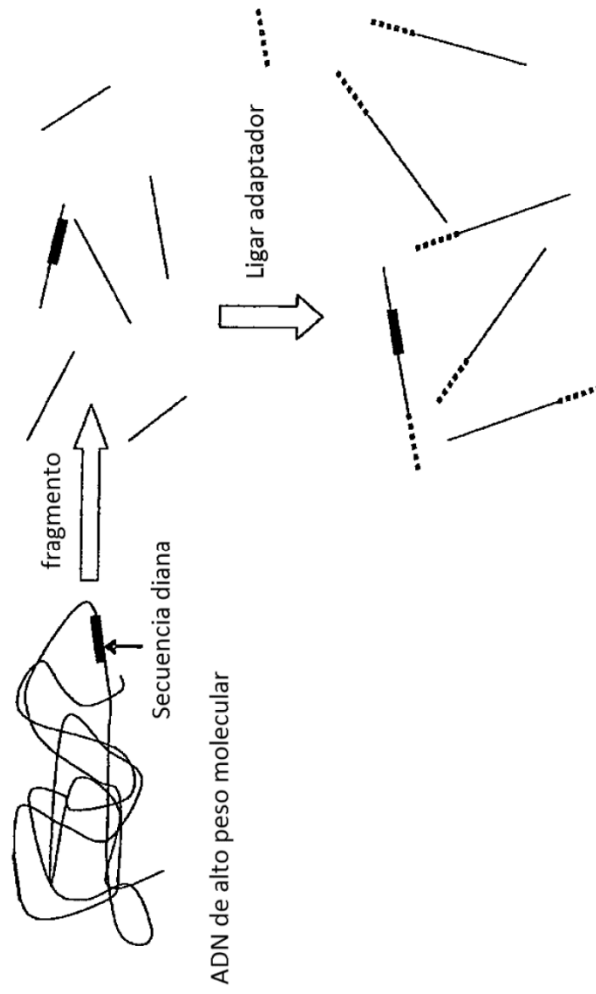


Fig 5

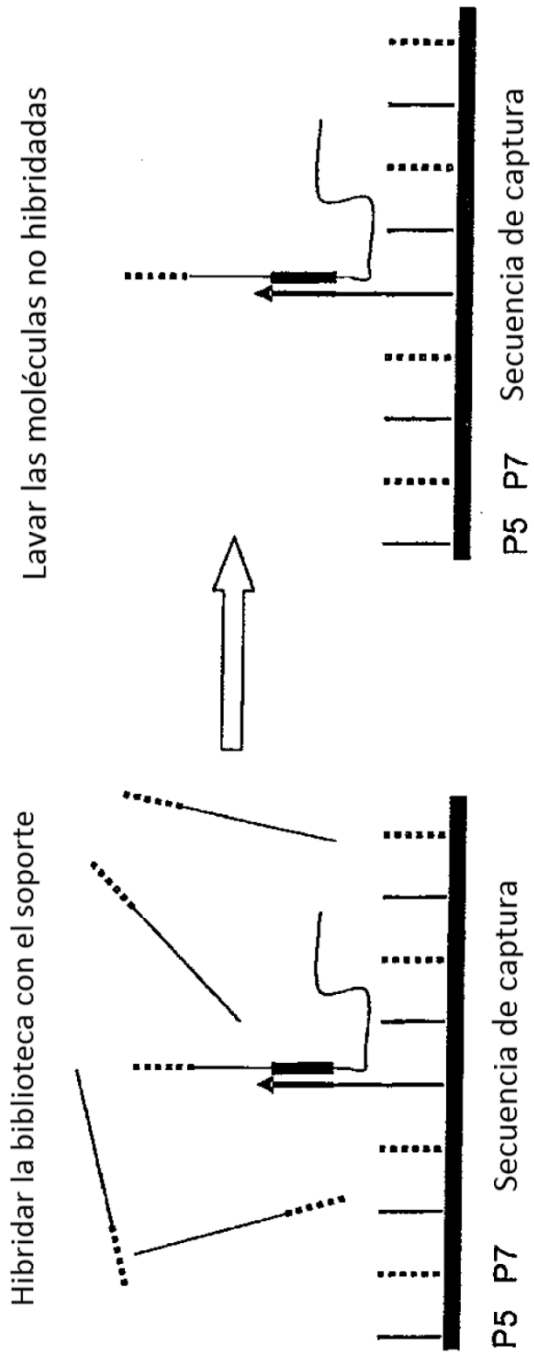


Fig 6



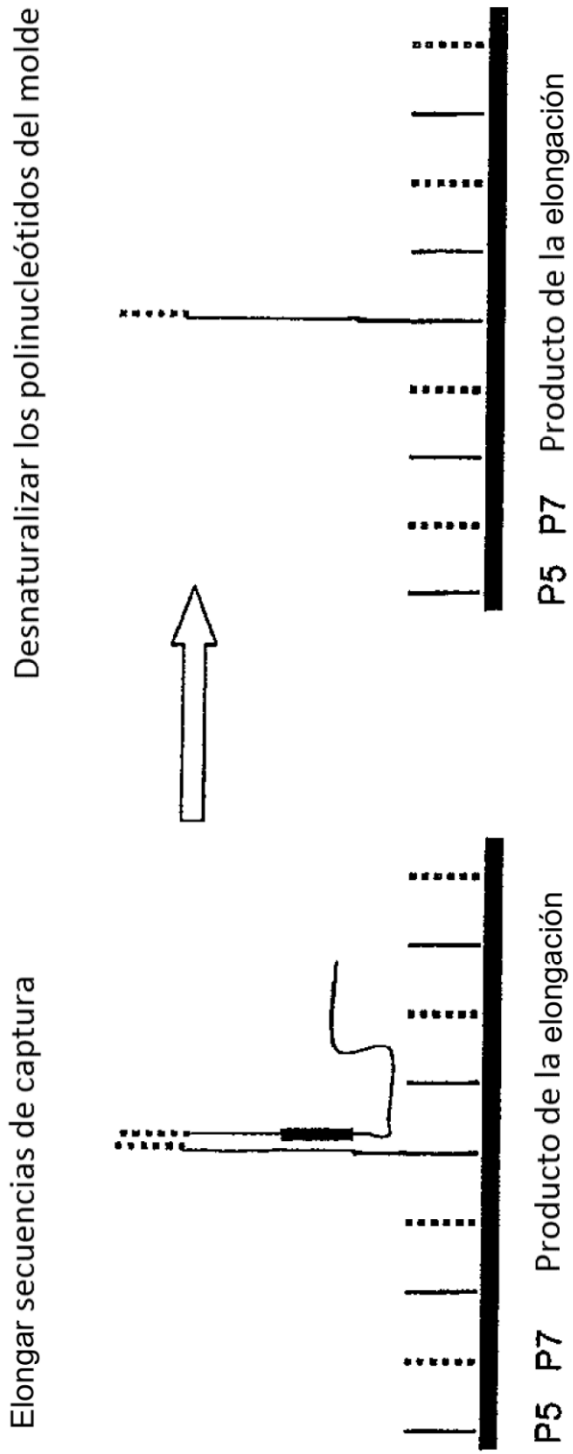


Fig 7

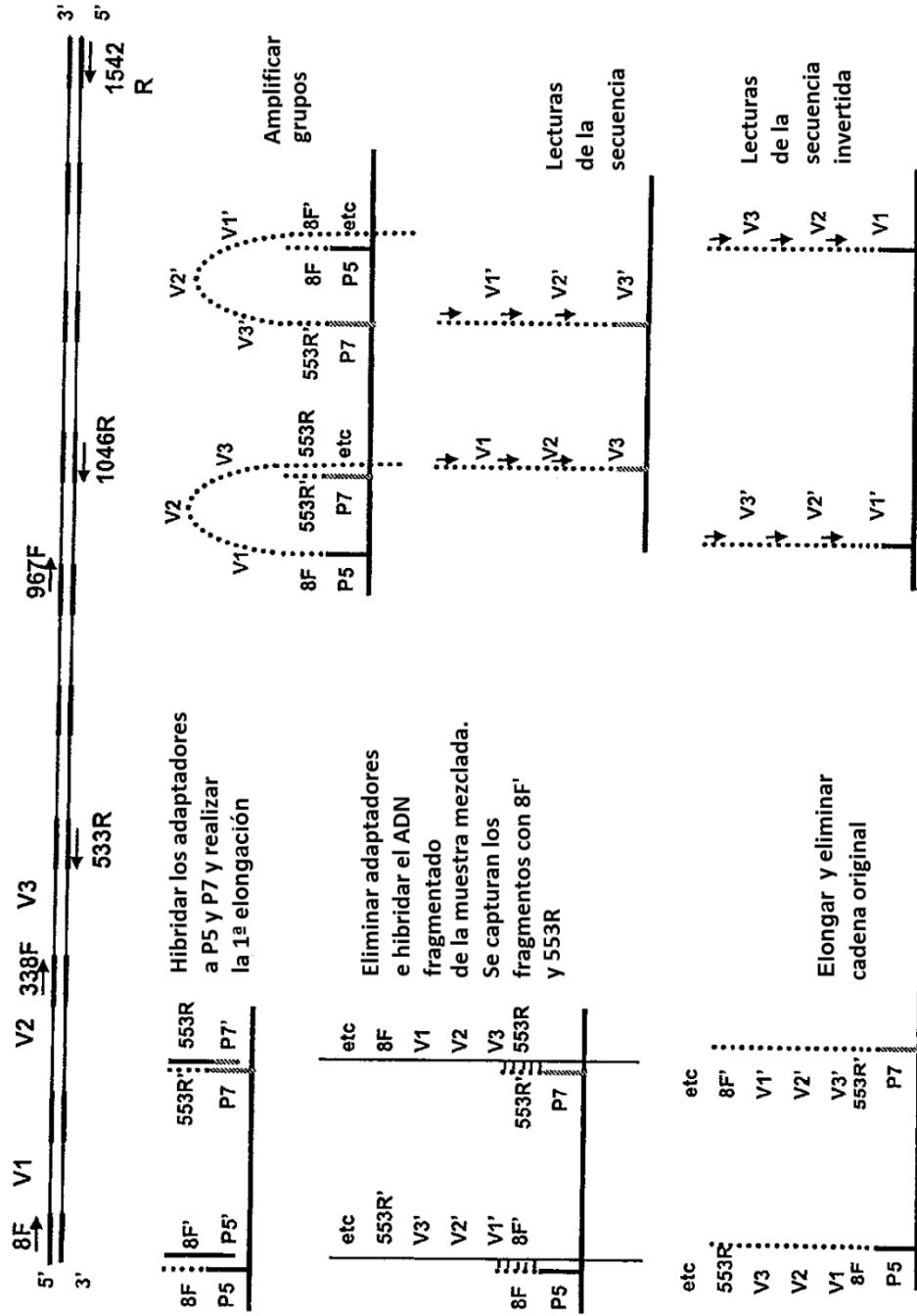


Fig 8

**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 • US 8977765 B [0015]
- US 20070128624 A [0041]
- US 7115400 B [0058] [0069]
- US 20050100900 A1 [0058] [0069]
- WO 0018957 A [0069]
- 15 • WO 9844151 A [0069]
- WO 07010251 A [0076] [0085]
- US 20090118128 A [0076] [0085]
- WO 04018497 A [0080]
- US 20070166705 A1 [0080]
- 20 • US 7057026 B [0080]
- US 60801270 B [0081]
- WO 07135368 A [0081]
- US 60788248 B [0082]
- WO 07123744 A [0082]
- 25 • US 6306597 B [0083]
- WO 07010252 A [0084]
- GB 2007003798 W [0084]
- US 20090088327 A [0084]

**30 Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- **SAMBROOK ; RUSSELL.** Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0053]
- **AUSUBEL et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1998 [0056]