

MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN: SEGUNDA GENERACIÓN

por JOSÉ MIGUEL VALDERRAMA MARTÍN*, FRANCISCO ORTIGOSA* Y RAFAEL A. CAÑAS⁺

*ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, 4^A PLANTA EDIFICIO I+D, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.

⁺PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA, 4^A PLANTA EDIFICIO I+D, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.

JMVALDERRAMA@UMA.ES, FORTIGOSA@UMA.ES, RCANAS@UMA.ES

Durante el desarrollo del Proyecto Genoma Humano fueron introducidos muchos avances técnicos al método de secuenciación de Sanger. Estos permitieron la paralelización y la automatización de este método y sirvieron como preludio de la revolución que supuso la aparición de una segunda generación de métodos de secuenciación. Con ellos se ha conseguido una reducción espectacular de los costes de secuenciación y la producción de grandes cantidades de información a partir de una muestra de ácido nucleico. Esto ha permitido realizar estudios masivos sobre los genomas y los transcriptomas, dando lugar a la era de las ciencias ómicas, durante la cual se han secuenciado múltiples genomas de diferentes especies y se ha estudiado su dinámica funcional a nivel genético, epigenético y transcripcional.

During the Human Genome Project, many technical advances were introduced to the Sanger sequencing method. Those advances allowed the parallelization and the automation of this method, acting as a prelude for the revolution that led to the appearance of a second generation of sequencing methods. With them, it has been achieved a dramatic reduction in the sequencing cost and the production of large amounts of information from a single nucleic acid sample. This fact has allowed to perform massive studies on genomes and transcriptomes leading to the omics sciences era, in which multiple genomes from different species have been sequenced, and their functional dynamics have been studied at the genetic, epigenetic and transcriptional level.

Palabras clave: secuenciación, segunda generación, NGS, pirosecuenciación, 454, IonTorrent, Illumina. Enviado: 05/05/2020
Keywords: sequencing, second generation, NGS, pyrosequencing, 454, IonTorrent, Illumina. Aceptado: 31/08/2020

De los dos primeros métodos de secuenciación realmente eficaces y extendidos fue el diseñado por Frederick Sanger el que terminó triunfando y permitiendo la secuenciación de genomas completos^[1]. El impulso para el desarrollo definitivo de la secuenciación Sanger lo constituyó el Proyecto Genoma Humano durante la década de los años 90 del siglo XX. Durante su transcurso, esta técnica fue refinada con la introducción de numerosos avances con respecto a su paralelización y automatización, mejorando así la eficiencia y rendimiento del método. Además, estos avances asentaron las bases conceptuales que permitieron el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación que se extendieron durante la primera década del siglo XXI y que están actualmente consolidados. La genómica como disciplina científica requería de nuevos métodos e instrumentos para una evolución adecuada. Los costes y rendimiento del método de Sanger hacían prohibitiva la expansión de la genómica, incluyendo las ideas subyacentes al Proyecto Genoma Humano como la medicina personalizada. Aunque el coste final del proyecto fueron 2.700 millones de dólares^[2], el coste real de secuen-

ciación de un genoma humano completo en el año 2001, cuando se disponía de su primer borrador, era de 100 millones de dólares^[3], algo fuera del alcance económico de cualquier laboratorio individual.

Se hizo evidente la necesidad de nuevos métodos de secuenciación masiva de ácidos nucleicos. El desarrollo definitivo y la implantación de estos métodos transcurrieron durante las dos primeras décadas del siglo XXI, revolucionando las Ciencias Biológicas hasta el punto en el que actualmente existen ramas científicas que no se pueden entender sin esta metodología. El principal objetivo de estos métodos es la secuenciación simultánea de miles o millones de fragmentos de ADN, reducir extraordinariamente el coste por base secuenciada y abordar de una forma más rápida problemas complejos como la secuenciación de grandes genomas eucariotas o la búsqueda de mutaciones causantes de enfermedades raras^[4]. Además, la gran cantidad de secuencias generadas por estas tecnologías permiten realizar estudios de expresión génica o de interacción proteína-ácidos nucleicos mediante una aproximación estadística a los datos. En muchos casos, esto ha permitido sustituir técnicas

basadas en la hibridación como las micromatrices (*microarrays*) de ADN por la secuenciación e incluso generar nuevas aproximaciones para el estudio de variantes alélicas o el ajuste alternativo (*splicing*). Sin embargo, esto ha requerido un gran desarrollo en el campo de la bioinformática que permitiese la manipulación de la ingente cantidad de datos que se generan. A pesar de ello, han aparecido nuevos problemas, como la dificultad a la hora de ensamblar las secuencias de genomas eucariotas grandes y complejos (con multitud de secuencias repetitivas) (figura 1).

A la primera ola de métodos de secuenciación masiva se la ha denominado secuenciación de 2.^a generación y se engloban bajo las siglas NGS (*Next Generation Sequencing*). La mayor parte de ellos se basan en la síntesis de moléculas de ADN al igual que el método de Sanger, aunque algunos tienen su base en la ligación de oligonucleótidos como el caso de SOLiD (Thermo). Las NGS presentan claras innovaciones en la forma en la que se produce la paralelización, determinación de los resultados de la secuenciación y en el aprovechamiento de la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) lo que permite tener una cantidad suficiente de ácidos nucleicos de partida para la secuenciación masiva^[4,5]. Son en estos puntos donde radica el avance respecto a las técnicas precedentes. Esta revisión realizará un repaso a los principales métodos de secuenciación de 2.^a generación teniendo en cuenta su importancia histórica y la extensión de su uso en investigación, y excluyendo los métodos de secuenciación poco extendidos o aquellos no basados

en la síntesis de moléculas de ADN.

Pirosecuenciación (Roche 454) e Ion Torrent (Thermo Fisher)

La pirosecuenciación fue desarrollada durante los años 90 del siglo XX, aunque no fue hasta 2005 que apareció en el mercado el primer equipo que usaba la pirosecuenciación de forma masiva (Pirosecuenciador 454 GS20) por parte de la empresa de Jonathan Rothberg, 454 Life Sciences. Posteriormente, la empresa fue adquirida por Roche que abandonó esta tecnología a mediados de 2016^[6]. La importancia de este método de secuenciación radica en que fue la primera tecnología de 2.^a generación disponible. Además, la tecnología 454 presentaba principios comunes con otras tecnologías de secuenciación que se encuentran todavía disponibles.

La paralelización y amplificación clonal de las muestras para la secuenciación se logra gracias a la realización de PCR en emulsión (emPCR). En primer lugar, el ADN es fragmentado y a los fragmentos resultantes se les añaden dos adaptadores distintos a ambos extremos de las secuencias. Posteriormente, se generan micelas que contienen todos los reactivos necesarios para realizar la PCR de forma individual en cada gota. Esto incluye una partícula esférica recubierta de oligonucleótidos complementarios de una de las secuencias adaptadoras que han sido añadidas previamente a los fragmentos de ADN a secuenciar. En este proceso se intenta conseguir que exista una única molécula de ADN por micela para que el resultado de la emPCR sea una amplificación clonal. Esto

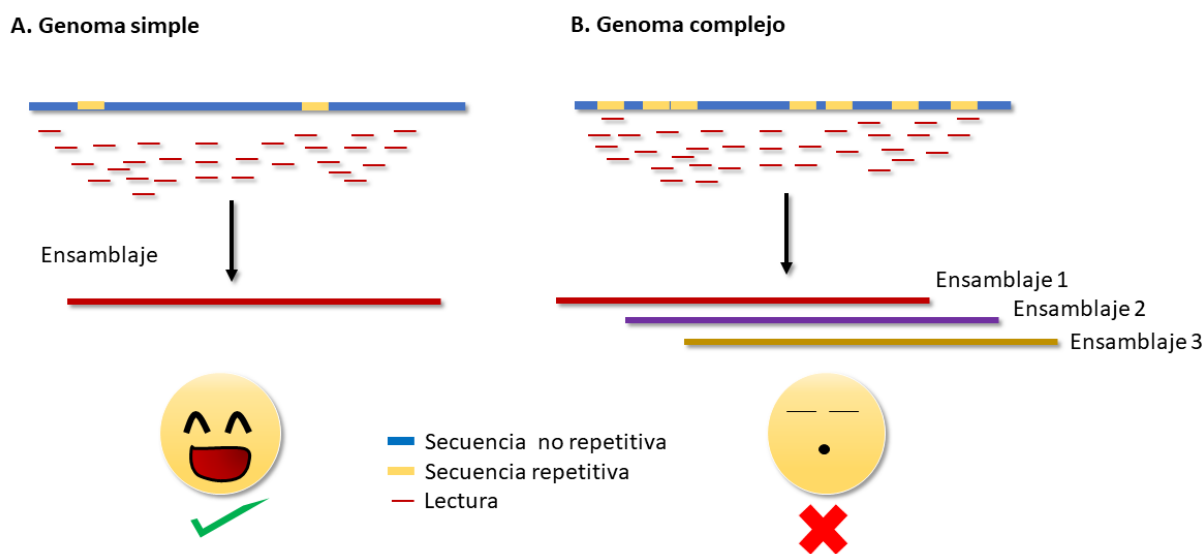


Figura 1: Ilustración del principal inconveniente de las técnicas de secuenciación de 2.^a generación en la genómica estructural. El principal problema de esta tecnología se da en el ensamblaje de genomas complejos, donde el tamaño y la cantidad de secuencias repetitivas son muy grandes, de manera que se puede obtener más de un posible ensamblaje a partir del mismo conjunto de secuencias cortas.

se lleva a cabo ajustando las diluciones y proporciones de la cantidad de partículas y de fragmentos de ADN. En las emPCR las copias del fragmento de ADN se sintetizan sobre la partícula a partir de los oligonucleótidos anclados a ella. Al final del proceso las partículas deben quedar envueltas por moléculas clonales de ADN de hebra simple. Finalmente, la paralelización de la secuenciación se logra introduciendo de forma individual las partículas con el ADN clonal en los pocillos de una placa de microtitulación (microtiter plate). La reacción y detección de la secuenciación ocurre de forma individual y en paralelo en cada pocillo de la placa. Por tanto, el número máximo de lecturas que se pueden obtener está limitado por el número de pocillos en la placa. En un procedimiento con buenos resultados el número de lecturas sería cercano a los 1,5 millones.

En la secuenciación se utiliza un oligonucleótido complementario al adaptador del extremo de las secuencias que no se encuentra unido a la partícula. A partir de este cebador la polimerasa puede ir añadiendo los nucleótidos para sintetizar una hebra complementaria al fragmento clonal de la partícula. Debido al sistema de detección usado, los nucleótidos se añaden de forma individual y cíclica. Por cada nucleótido que sea incorporado se libera un pirofosfato (PPi), que es utilizado por la ATP sulfurilasa

(EC 2.7.7.4) para la producción de ATP a partir de fosfoadenilsulfato. Entonces la enzima luciferasa (EC 1.13.12.7) emplea el ATP producido junto a luciferina añadida para producir luz y oxiluciferina. Esta luz es detectada por una cámara CCD (dispositivo de carga acoplada) de forma individual en cada pocillo y se interpreta como la adición de un nucleótido a la secuencia, puesto que en cada ciclo de adición solamente se suministra un tipo de nucleótido se puede ir siguiendo la secuencia de la hebra que se sintetiza^[7]. Además, se detecta la emisión de luz para cada pocillo de la placa de forma independiente, por lo que el proceso se realiza en paralelo sobre más de un millón de fragmentos distintos de ADN (figura 2A). El sistema en su máximo desarrollo permitía obtener una media de lecturas de unos 700 pares de bases (pb) por ejecución, siendo muy cercana a la secuenciación de Sanger en este sentido^[5]. Sin embargo, tenía el inconveniente de ser muy costosa (en torno a 9.000 euros por gigabase, Gb 10), puesto que se debían gastar grandes cantidades de reactivos debido a los ciclos de adición de nucleótidos. Adicionalmente, las zonas donde existen más de 6/8 nucleótidos iguales (homopolímeros) suponían un problema puesto que producían un exceso de emisión de luz al incorporarse los nucleótidos y causaban la saturación del equipo CCD conllevando errores en las lecturas.

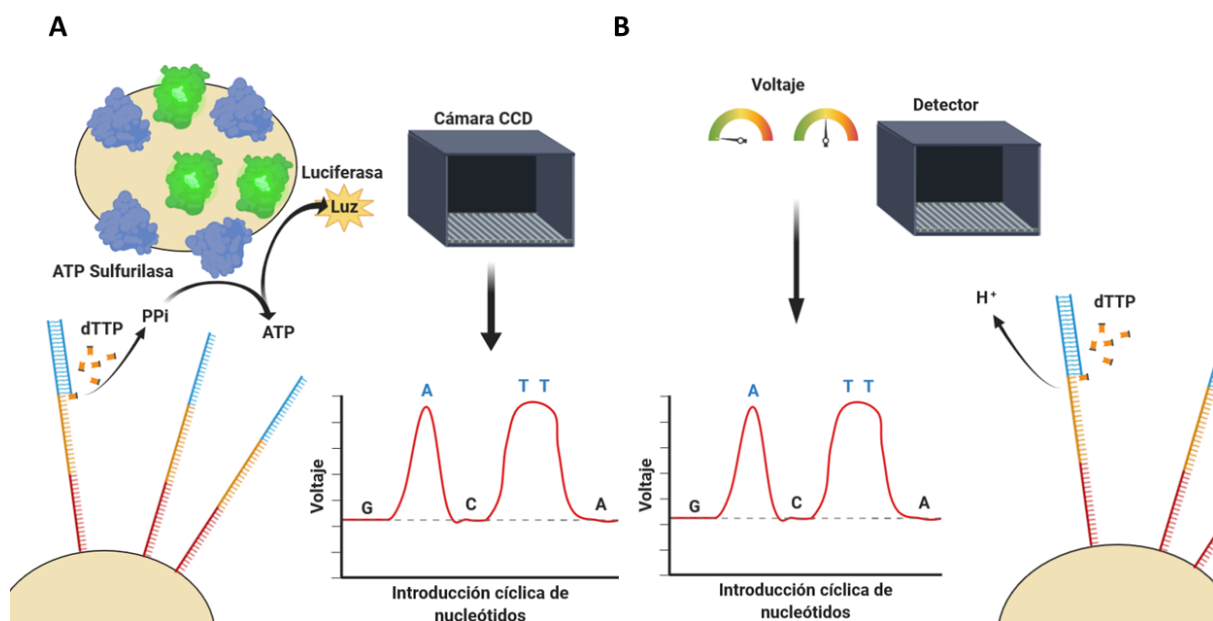


Figura 2: Principios básicos de la secuenciación en los sistemas 454 e Ion Torrent. A) El sistema de secuenciación 454 se sirve de las actividades enzimáticas de la ATP sulfurilasa y luciferasa para producir una señal lumínica cada vez que se introduce un nuevo nucleótido en la hebra que se está sintetizando. Dado que los nucleótidos se añaden de forma cíclica en cada pocillo es posible determinar la secuencia de la hebra que se está sintetizando. B) Ion Torrent permite la detección de la incorporación de un nucleótido mediante el cambio en el voltaje que se produce por la liberación de un protón en la incorporación de un nucleótido. Al igual que con el sistema 454, la adición de nucleótidos es cíclica permitiendo así la determinación de las secuencias. Imagen diseñada con Biorender.

El sistema Ion Torrent usa buena parte de los principios técnicos de la secuenciación 454: se trata de un método de secuenciación por síntesis, para la amplificación clonal del ADN se usa emPCR, las placas de microtitulación permiten alojar partículas con fragmentos clonales en cada pocillo para la paralelización de la secuenciación y la adición de nucleótidos es cíclica. Esto se explica porque también fue ideado por Jonathan Rothberg y desarrollado por la empresa que fundó y que comparte nombre con la tecnología, Ion Torrent, aunque luego fue adquirida por Thermo Fisher. Esta tecnología se diferencia de la 454 en que la detección de la incorporación de los nucleótidos se realiza mediante la detección de los cambios en el voltaje provocados por la liberación de un protón (H^+) que ocurre cuando se añade un nucleótido a la cadena de ADN que se sintetiza por parte de la ADN-polimerasa^[8] (figura 2B). Al contar con los mismos principios técnicos que el sistema de secuenciación 454, también presenta problemas con la saturación de señal en la secuenciación de regiones homopoliméricas: la adición de 6-8 moléculas del mismo nucleótido de forma consecutiva en la secuencia causa un exce-

so de liberación de protones que termina saturando la capacidad del sensor. No obstante, las placas de microtitulación tienen mayor capacidad que las de 454: cuentan con millones de pocillos y de sensores capaces de detectar los cambios eléctricos causados por la liberación de los protones, lo que hace que haya equipos capaces de generar en torno a 130 millones de lecturas y 50 Gb de secuenciación. El tamaño medio de las lecturas es inferior al sistema 454 siendo de unas 200 pb, pero el precio por Gb secuenciada es muy inferior al requerir una cantidad mucho menor de reactivos (40 euros aproximadamente). La capacidad de obtener un gran número de lecturas y el bajo coste de secuenciación han permitido la subsistencia de esta tecnología.

Illumina-Solexa y GeneReader (Qiagen)

Otro tipo de sistemas de secuenciación de 2.^a generación que se basan en la síntesis de ADN usan como base la terminación cíclica reversible donde se emplean nucleótidos terminadores marcados que son regenerados para que pueda continuarse con la

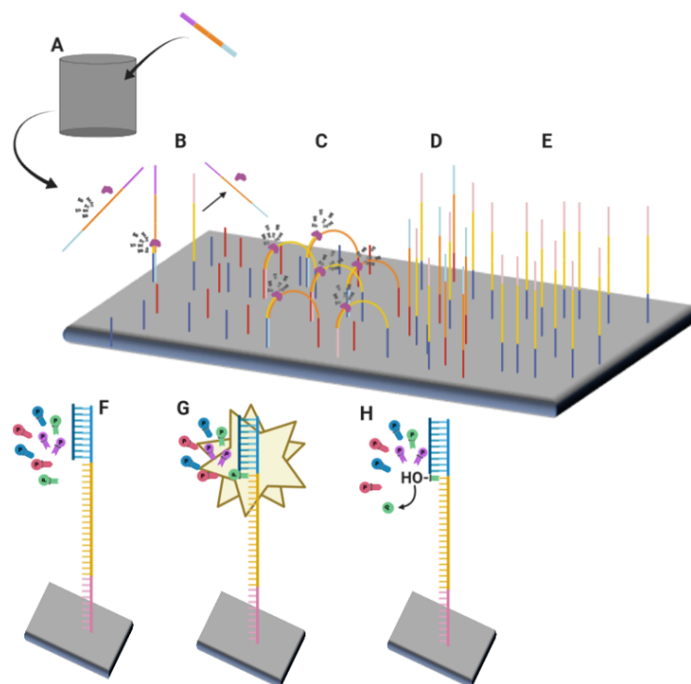


Figura 3: Sistema de secuenciación Illumina. Sólo un fragmento de ADN entra en cada micropocillo o región clonal (A), se une a los adaptadores del fondo de dicho micropocillo y, por acción de una polimerasa, este fragmento es duplicado y queda unido al fondo por un adaptador (B). El adaptador libre de este fragmento se une a otro adaptador complementario del fondo del micropocillo permitiendo la amplificación, conocida como PCR puente (C) y originando multitud de fragmentos clonales (D), seleccionándose de ellos sólo una de sus hebras (E). Posteriormente, estos fragmentos se secuenciarán gracias a nucleótidos terminadores reversibles y marcados con distintos fluoróforos para cada base nitrogenada (F). Al incorporar la ADN polimerasa un nucleótido a la secuencia se determina la señal de fluorescencia de cada región clonal para componer cada una de las secuencias (G), posteriormente se eliminan los fluoróforos de los nucleótidos añadidos y se regeneran sus extremos 3'-OH por eliminación del 3'-O-azidometilo para poder continuar con la siguiente ronda incorporación de nucleótidos (H). Imagen diseñada con Biorender.

síntesis. El caso más representativo y de mayor éxito comercial hasta la fecha, marcando el estándar para numerosas aplicaciones, es el de Illumina-Solexa. La compañía Solexa desarrolló la tecnología al final del siglo XX y comienzos del siglo XXI lanzando su primer secuenciador comercial en 2006 (Genome Analyzer). Ante su éxito, fue adquirida por la compañía Illumina en 2007 y desde entonces se ha convertido en la plataforma NGS de mayor implantación a nivel mundial.

Esta plataforma utiliza la técnica de PCR puente en placas conocidas como celdas de flujo (*flow cell*) para la amplificación clonal y paralelización del proceso. Su tecnología miniaturizada permite la generación de miles de millones de regiones clonales en los micropocillos de las placas de los aparatos más avanzados (NovaSeq 6000). Para realizar la PCR puente los fragmentos de ADN han de ser seleccionados por tamaños y a cada extremo ha de unirse un adaptador distinto (3' o 5'). En los micropocillos se encuentran dos tipos de oligonucleótidos unidos a la placa siendo cada uno específicamente complementario de uno de los adaptadores que tienen los fragmentos de ADN de la librería en sus extremos. Este oligonucleótido es usado como cebador para la amplificación y el ADN como cadena molde para realizar la síntesis de una hebra de ADN que quedará unida a la placa por el cebador. Posteriormente se dejará hibridar el adaptador del extremo libre de la cadena con su oligonucleótido complementario unido a la placa, generando una estructura en forma de puente. A partir de ella se realizará la síntesis de la hebra complementaria. Estos ciclos de PCR se repetirán hasta formar una masa clonal suficiente en el micropocillo. Finalmente, únicamente se seleccionan las moléculas pertenecientes a una hebra del fragmento de ADN de partida para comenzar la secuenciación^[5] (figura 3A-E).

Una vez realizadas las amplificaciones clonales la secuenciación se realiza utilizando nucleótidos con terminadores reversibles y marcados con fluoróforos (diferentes para cada base nitrogenada). A cada ciclo de síntesis se incorpora a la hebra naciente un nucleótido terminador y se registra el tipo de emisión de luz que emite cada micropocillo, lo que indica cuál es el nucleótido añadido a la secuencia. Posteriormente se elimina el fluoróforo de los terminadores, para evitar interferencias en la señal durante el siguiente ciclo de adición, y se regenera el grupo hidroxilo en el carbono 3' de la desoxirribosa eliminando el grupo de bloqueo 3'-*O*-azidometilo (figura 3F-H). Esto se hace mediante el uso de agentes químicos reductores como la tris(2-carboxietil)fosfina. Este sistema de secuenciación permite que todos los grupos clo-

nales se secuencien al mismo tiempo generando un gran número de lecturas (hasta 20.000 millones) y abaratando mucho los costes por Gb secuenciada, menos de 6 euros. El gran número de lecturas que se obtienen permite la realización de análisis estadísticos que suministran datos que van más allá de la simple secuencia de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden determinar el nivel de expresión génica de cada uno de los genes de un genoma completo (RNA-Seq)^[5] o los sitios de interacción de proteínas con el ADN de un genoma (ChIP-Seq)^[5]. El problema de este sistema es que el tamaño de las lecturas que se obtienen es pequeño, entre 50 y 300 pb, debido a los ciclos de regeneración de los terminadores reversibles que no son totalmente eficaces. Esta característica dificulta mucho el ensamblaje de genomas eucariotas grandes y repetitivos mediante técnicas computacionales. Aun así, sigue siendo el sistema más usado en la actualidad, precisamente por su gran capacidad de secuenciación (alto número de lecturas y hasta 6.000 Gb).

Otro sistema de secuenciación que utiliza terminadores reversibles marcados con fluoróforos es el GeneReader de Qiagen. Fue desarrollado en primer lugar por la empresa Intelligent BioSystems que en 2012 fue adquirida por Qiagen, que relanzó el equipo en 2015 unido a otros equipos propios de la marca para crear una plataforma de tipo «todo en uno» (desde la preparación de las muestras hasta el análisis de los resultados), con un claro enfoque biomédico y clínico^[5]. En este caso la amplificación clonal que se utiliza es mediante emPCR, pero la secuenciación al igual que la de Illumina se basa en el uso de nucleótidos terminadores reversibles marcados con fluoróforos. Sin embargo, en el sistema GeneReader no todos los terminadores que se incorporan tienen marcaje fluorescente, solamente una porción de ellos. Se trata de tener una señal suficiente durante la secuenciación al contrario de Illumina que pretende asegurar que todos los terminadores incorporados emitan fluorescencia^[5]. La ventaja de esto es que se reducen los problemas derivados de la efectividad de eliminar los fluoróforos. Debido al uso tan específico con el que se pretende comercializar no es una plataforma muy extendida. Además, tiene una baja capacidad de generar lecturas (máximo de 50 millones) y con longitudes pequeñas (100-150 pb).

Problemas con el tamaño de las lecturas

Uno de los principales inconvenientes de las tecnologías de secuenciación de 2.^a generación es el tamaño de las lecturas que se producen. Esto es una gran desventaja para los trabajos de genómica estructural

o para ver dinámicas de ajuste alternativo (*alternative splicing*). Esto se debe a que las herramientas bioinformáticas no consiguen generar ensamblajes de novo con gran calidad a partir de estas secuencias cortas en el caso de tratarse de genomas grandes y complejos, con multitud de secuencias repetitivas. Con el objetivo de sortear estas dificultades se han planteado diversas estrategias. Debido a la extensión del uso de la tecnología de Illumina la mayor parte se han centrado en realizar ajustes técnicos de la secuenciación que permitan un ensamblaje más sencillo de las lecturas obtenidas. Estos métodos consisten en el marcaje previo de los fragmentos de ADN con etiquetas o códigos de barra (*tags*, oligonucleótidos de secuencia conocida) que ayudan a reconocer las lecturas como miembros de una misma región genómica. A esta aproximación se la ha llamado «secuenciación de lecturas largas sintéticas»^[5]. Esta estrategia ha sido desarrollada por la misma Illumina apoyándose en la infraestructura de la que ya disponen.

Por otro lado, en este tipo de aproximaciones también cabe destacar a la compañía 10X-Genomics que ha desarrollado su propio método para la generación de «lecturas enlazadas» usando la secuenciación Illumina^[9]. Entre las capacidades del equipo conocido como *Chromium* se encuentra la de realizar una amplificación isotérmica de fragmentos de ADN genómico de alto peso molecular dentro de micelas generadas por emulsión. En primer lugar, se fragmenta el ADN genómico en moléculas de alto peso molecular. Gracias a un sistema de microfluídica se crean micelas que contienen una molécula de ADN de alto peso molecular y una partícula que contiene en su superficie las etiquetas o códigos de barra necesarios para la amplificación clonal y marcaje de las moléculas de ADN. Posteriormente, se realiza la amplificación isotérmica^[10] y los fragmentos de ADN se

pueden secuenciar en cualquier plataforma de secuenciación, siendo principalmente utilizada la plataforma de Illumina (figura 4). Sin embargo, el recorrido de esta aproximación no parece que vaya a prolongarse mucho en el tiempo. De hecho, algunas compañías especialistas en servicios de secuenciación han dejado de ofrecerla en sus catálogos. La mayor extensión de las tecnologías de secuenciación de tercera generación está claramente disminuyendo la utilidad de estas aproximaciones para la secuenciación genómica. Las tecnologías de secuenciación de 2.^a generación se encuentran actualmente en su mayor apogeo, permitiendo realizar análisis avanzados tanto de genómica estructural como funcional. La fiabilidad de las lecturas resultantes de estos métodos es muy alta como la capacidad de generar lecturas y la cantidad de nucleótidos que se secuencian en cada proceso. No obstante, estas tecnologías presentan limitaciones que han empujado a nuevos desarrollos tecnológicos, siendo algunos de ellos el pequeño tamaño de las lecturas y la necesidad de amplificar el ADN de la muestra a secuenciar. Esta última característica hace que siempre se secuencien copias de las moléculas originales, perdiéndose las marcas epigenéticas o modificaciones químicas del ADN y el ARN, lo que ha impulsado el desarrollo de la 3.^a generación de los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos.

Referencias

- [1] Valderrama-Martín J.M. y otros. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros en la Biología* 173: 19-25, 2020.
- [2] NIH, Coste de la secuenciación de un genoma humano. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>, último acceso 7 de septiembre de 2020.
- [3] NIH, Coste de la secuenciación. <https://www.genome.gov/>

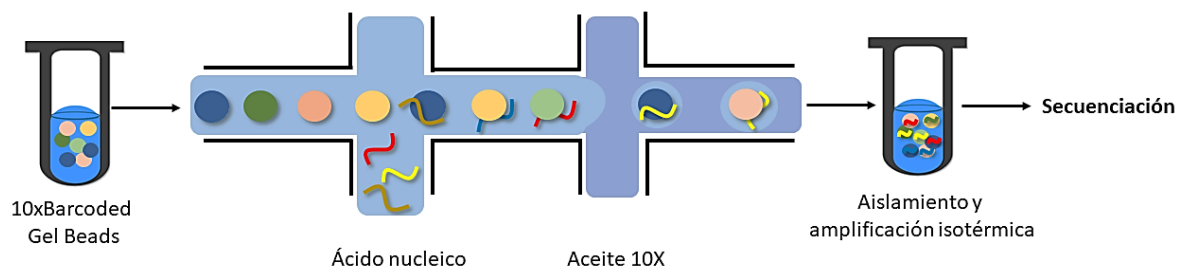


Figura 4: Representación esquemática del funcionamiento de la tecnología basada en microfluídica de 10XGenomics. Las partículas marcadas que contienen todo lo necesario para la amplificación isotérmica pasan al sistema microfluídico donde entran en contacto con fragmentos de ADN de alto peso molecular. Tras la formación del complejo partícula-fragmento, con la ayuda de un aceite altamente concentrado, se procede al aislamiento de los fragmentos de ADN unidos a las partículas y su amplificación isotérmica. Tras la amplificación isotérmica se procede a la secuenciación mediante la plataforma Illumina.

-
- [about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data](#), último acceso 7 de septiembre de 2020.
- [4] Mardis E. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470: 198-203, 2011.
- [5] Goodwin S. y otros. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17: 333-351, 2016.
- [6] GenomeWeb. Roche shutting down 454 sequencing business. *GenomeWeb* [online], <https://www.genomeweb.com/sequencing/roche-shutting-down-454-sequencing-business>, 2015, último acceso 7 de septiembre de 2020.
- [7] Margulies M. y otros. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380, 2005.
- [8] Rothberg J.M. y otros. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348-352, 2011.
- [9] Mostovoy Y. y otros. A hybrid approach for de novo human genome sequence assembly and phasing. *Nature Methods* 13: 587-590, 2016.
- [10] Ma Z. y otros. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 14320-14322, 2013.
-