

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 893**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09175588 .4**
96 Fecha de presentación: **28.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2145955**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.01.2010**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos en emulsión en perlas**

30 Prioridad:
29.01.2003 US 443471 P
23.04.2003 US 465071 P
06.06.2003 US 476602 P
06.06.2003 US 476504 P
06.06.2003 US 476313 P
06.06.2003 US 476592 P
25.08.2003 US 497985 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2012

73 Titular/es:
**454 Life Sciences Corporation
1 Commercial Street
Branford CT 06405, US**

72 Inventor/es:
**Berka, Jan; Chen, Yi-Ju;
Leamon, John H.; Lefkowitz, Steven;
Lohman, Kenton; Makhijani, Vinod;
Sarkis, Gary J.; Rothberg, Jonathan;
Weiner, Michael y
Srinivasan, Maithreyan**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 380 893 T3

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

DESCRIPCIÓN

Amplificación de ácidos nucleicos en emulsión en perlas

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos para amplificar moldes de ácidos nucleicos desde bajo número de copias hasta cantidades que permiten la secuenciación sobre un soporte sólido tal como una perla. La presente invención se dirige a separación cero de las perlas. También se describe un método de enriquecimiento de soportes sólidos que contienen ácidos nucleicos amplificados.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de amplificar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos tales como un banco genómico o un banco de DNA, es crítica, dada la ineficacia de los métodos actuales de secuenciación. Las tecnologías de secuenciación actuales requieren millones de copias de ácido nucleico por cada reacción de secuenciación. Además, la secuenciación de un genoma humano podría requerir, aproximadamente, decenas de millones de reacciones de secuenciación diferentes. Si el material de partida es limitado, es necesaria la amplificación del DNA inicial antes de realizar la secuenciación genómica. El material de partida puede estar limitado, por ejemplo, si el
15 genoma que ha de ser secuenciado procede de indicios de un patógeno o de un paciente prenatal. Las técnicas actuales de amplificación genómica *in vitro* implican protocolos de clonación y de cultivo que han limitado la utilidad de la secuenciación genómica. Otras técnicas, tales como PCR, si bien rápidas y dignas de confianza, son incapaces de amplificar un genoma de un modo representativo.

20 Aun cuando puede construirse con facilidad por ingeniería genética una PCR aleatoria con cebador para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos en una reacción, este método no es preferido debido a que el banco de DNA amplificado no es representativo del banco de partida. Es decir, en el ambiente de una PCR aleatoria algunas secuencias de DNA son amplificadas preferentemente a expensas de otras secuencias, de modo que el producto amplificado no representa el material de partida. Este problema de la PCR puede ser obviado si cada miembro individual de un banco de DNA es amplificado en una reacción separada. No obstante, este enfoque puede no ser
25 práctico si se requieren muchos miles de tubos de reacción separados para el procedimiento de amplificación, dado que un banco genómico o un banco de DNA puede incluir más de 100.000 fragmentos. La amplificación individual de cada fragmento de estos bancos en reacciones separadas, no es práctica.

Griffiths et al., EMBO Journal, 22:1, Enero 2003, páginas 24-35, se refieren a la evolución dirigida de una fosfotriesterasa, sumamente rápida, mediante compartimentación *in vitro*.

30 El documento WO00/50712 describe un método óptico de clasificación utilizado para aislar uno o más elementos genéticos que codifican un producto génico que posee una actividad deseada.

El documento WO 02/10301 describe un método selectivo de amplificación génica en el que se amplifica selectivamente un ácido nucleico que codifica un producto génico seleccionado que posee una actividad deseada.

35 Fry et al., Biotechniques, 13: 1, Enero, 1992, páginas 124-131, describen un método de hibridación y purificación que emplea partículas paramagnéticas, que se utiliza para la purificación de DNA, específicamente para aplicaciones de secuenciación.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método para enriquecer un amplicón, que comprende:

40 (a) distribuir una solución que comprende una pluralidad de perlas y una pluralidad de especies de moléculas de ácido nucleico de molde, en una pluralidad de gotitas acuosas de emulsión en una fase oleosa termoestable, en el que un primer subconjunto de las gotitas comprende una o más de las perlas y una o más de las especies de moléculas de ácido nucleico de molde encapsuladas en ellas, y un segundo subconjunto de las gotitas comprende una o más de las perlas sin ninguna de las especies de moléculas de ácido nucleico de molde encapsuladas en ellas;

45 (b) amplificar las especies de moléculas de ácido nucleico de molde existentes dentro del primer subconjunto de gotitas, en el que una o más perlas dentro del primer subconjunto de gotitas acuosas tienen un amplicón inmovilizado en ellas;

(c) romper las gotitas acuosas de emulsión para liberar las perlas del primer y el segundo subconjuntos;

50 (d) someter a hibridación de ácidos nucleicos al amplicón inmovilizado en las perlas con un cebador que es complementario del extremo 3' del amplicón; y

o bien:

(e)(i) formar un complejo de perla con amplicón inmovilizado y perla de enriquecimiento, en el que la perla de enriquecimiento y el cebador hibridado forman un par de captura-diana y en el que las perlas de enriquecimiento pueden ser aisladas bajo una condición selectiva; y

5 (f)(i) aplicar la condición selectiva para aislar el complejo de perla con amplicón inmovilizado y perla de enriquecimiento, de aquellas perlas que no tienen amplicón unido;

o bien

10 (e)(ii) exponer las perlas con amplicón inmovilizado a una o más superficies de unión que comprenden restos de captura, cuyos restos de captura forman pares de captura-diana con el cebador hibridado de las perlas con amplicón inmovilizado, y separar las perlas con amplicón inmovilizado de las perlas que no tienen amplicón unido.

15 Se describe en esta memoria un método para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, cada una de las secuencias de un banco de DNA, transcriptoma o genoma) de un modo rápido y económico en un único tubo de reacción. Un uso del método es para llevar a cabo la amplificación clonal simultánea (por ejemplo, por PCR) de una pluralidad de muestras (tantas como varios cientos de miles) en un recipiente de reacción. Esta descripción proporciona, además, medios para encapsular individualmente una pluralidad de muestras de DNA en una microcápsula de una emulsión (es decir, un microrreactor), llevando a cabo simultáneamente la amplificación de la pluralidad de muestras de ácido nucleico encapsuladas, y el desprendimiento desde las microcápsulas de dicha pluralidad de DNA amplificada, para efectuar las reacciones subsiguientes.

20 Copias únicas de las especies de moldes de ácidos nucleicos pueden ser hibridadas con perlas de captura que comprenden, por ejemplo, oligonucleótidos de captura o grupos químicos que se unen al molde de ácido nucleico. Las perlas son suspendidas en una solución de amplificación completa (véase el Ejemplo 2 como ejemplo de una solución de amplificación) y emulsionadas para producir microrreactores (típicamente de 100 a 200 micrómetros de diámetro). Después de esto, se usa amplificación (por ejemplo, por PCR) para aumentar clonalmente en los microrreactores el número de copias de la especie inicial de molde, y estas copias se unen a las perlas de captura de los microrreactores.

25 Alternativamente, pueden añadirse perlas de captura a una mezcla de reacción de amplificación (por ejemplo, una solución de amplificación del Ejemplo 2) que comprende un molde de ácido nucleico, y esta mezcla se emulsiona para producir microrreactores. La amplificación (por ejemplo, por PCR) se utiliza para aumentar clonalmente en los microrreactores el número de copias de la especie de molde inicial, y estas copias se unen a las perlas de captura de los microrreactores.

30 Ventajosamente, los microrreactores permiten la amplificación simultánea clonal y discreta de muchos moldes diferentes sin contaminación cruzada de los productos amplificados o de los reactivos, o el dominio de un molde particular o de una serie de moldes (por ejemplo, predisposición de PCR). La reacción de amplificación, por ejemplo, puede ser llevada a cabo simultáneamente con al menos 3.000 microrreactores por microlitro de mezcla de reacción. Preferiblemente, cada microrreactor comprende una o pocas especies de molde amplificado.

35 Los microrreactores pueden tener un tamaño medio de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 250 μm . Preferiblemente, los microrreactores tienen un diámetro medio de aproximadamente 60 a aproximadamente 200 μm . Más preferiblemente, los microrreactores tienen un diámetro medio de aproximadamente 60 μm tal como una media de 40 μm a 80 μm de diámetro. Los microrreactores pueden tener un diámetro medio de 60 μm aproximadamente. Preferiblemente, los microrreactores tienen un volumen medio de aproximadamente 113 pl. Lo más preferible, aproximadamente 3.000 microrreactores están contenidos en un microlitro de una emulsión de una proporción 1:2 de agua a aceite.

40 La presente descripción proporciona también un método para producir una pluralidad de perlas que llevan molde de ácido nucleico, en el que cada perla comprende hasta 1.000.000 de copias y más de una única secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, cada perla puede comprender más de 20 millones de copias de un único ácido nucleico.

La presente descripción proporciona, además, un banco de DNA obtenido mediante los métodos de la descripción. El banco puede ser obtenido utilizando como material de partida para la amplificación, por ejemplo, un banco de DNA genómico, un banco de cDNA, o un banco de plásmidos. El banco puede derivarse desde cualquier población de ácidos nucleicos, por ejemplo, de origen biológico o sintético.

50 La presente invención proporciona un método de enriquecimiento de aquellas perlas que contienen el producto de amplificación de DNA con éxito (es decir, por separación de las perlas que no tienen DNA unido).

Descripción breve de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de la estructura de una perla de captura de DNA.

Figuras 2A-2B: Representación esquemática de una realización de un procedimiento de amplificación en emulsión en perlas.

Figura 3: Representación esquemática de un procedimiento de enriquecimiento para retirar las perlas que no tienen DNA unido.

5 Figura 4: Representación del patrón de guía utilizado para alojar tubos sobre la placa de agitación por debajo de la bomba de jeringuillas vertical. El patrón de guía se modificó para alojar tres conjuntos de mezclas de reacción de amplificación en emulsión en perlas. La jeringuilla estaba cargada con la mezcla de PCR y las perlas.

Figura 5: Representación de la colocación óptima de jeringuillas en la bomba de jeringuillas vertical y orientación de los tubos de emulsión por debajo de las salidas de las jeringuillas.

10 Figura 6: Representación de la colocación óptima del bloque impulsor de la bomba de jeringuillas contra los émbolos de las jeringuillas, y orientación óptima del patrón de guía sobre la placa de agitación. Utilizando esta disposición, los contenidos de las jeringuillas fueron expulsados hacia el aceite de la emulsión agitado.

Figura 7: Representación de perlas (véanse las flechas) suspendidas en microrreactores individuales según los métodos de la invención.

15 Figuras 8A-8C: Representación esquemática que muestra las etapas iniciales de amplificación en emulsión en perlas usado en conjunción con la secuenciación de dobles extremos. La perla activada con NHS (Figura 8A) está fijada con cebadores de captura (Figura 8B) y encapsulada en un microrreactor que comprende la perla de captura de DNA y el molde (Figura 8C).

20 Figura 9: Representación esquemática que muestra las etapas de amplificación y captura de la amplificación en emulsión en perlas utilizada en asociación con la secuenciación de dobles extremos. El molde es amplificado por PCR de fase de solución y los productos de la amplificación están unidos a la perla de captura de DNA.

25 Figura 10: Representación esquemática que muestra las etapas finales del procedimiento de amplificación en emulsión en perlas, utilizado en asociación con la secuenciación de dobles extremos. La emulsión se rompe (Figuras 10A –10B), la segunda cadena del producto de amplificación es separada y se utiliza enriquecimiento para maximizar el número de perlas unidas con producto de amplificación (Figura 10C), los cebadores de secuenciación son sometidos a hibridación de los ácidos nucleicos (Figura 10D) y la primera cadena es secuenciada (Figura 10E), seguido de la segunda cadena.

Descripción detallada de la invención

Breve visión de conjunto de la amplificación en emulsión en perlas

30 Se discute a continuación una breve visión de conjunto de una realización de la invención. Sigue más adelante una descripción más detallada de cada una de las etapas individuales de esta realización. En esta realización la técnica de amplificación escogida es PCR.

35 En un aspecto de la invención, la amplificación en emulsión en perlas se lleva a cabo uniendo el molde (por ejemplo, un molde de DNA) que ha de ser amplificado, a un soporte sólido, preferiblemente en la forma de una perla generalmente esférica. La perla está ligada a un gran número de una especie de un solo cebador (es decir, el cebador B de la Figura 2) que es complementario de una región del DNA del molde, y las copias de amplificación de este molde. Alternativamente, la perla está ligada a grupos químicos (por ejemplo, biotina) que pueden unirse a grupos químicos (por ejemplo, estreptavidina) incluidos en el molde de DNA y copias de amplificación de este molde. Las perlas se suspenden en una mezcla acuosa de reacción y luego son encapsuladas en una emulsión de agua en aceite. En diferentes aspectos de la invención, el DNA del molde se une a la perla antes de la emulsificación, o el DNA de molde es incluido en solución, en la mezcla de reacción de amplificación. En una realización preferida, se lleva a cabo una etapa de amplificación antes de la distribución de los moldes de ácido nucleico en una placa de gran número de pocillos (por ejemplo, placa de picotitulación).

45 En ciertas realizaciones, la emulsión está compuesta de microgotitas de fase acuosa discretas, por ejemplo, de un diámetro medio de 60 a 200 μm , aproximadamente, incluidas en una fase oleosa termoestable. Cada microgotita contiene, preferiblemente, solución de reacción de amplificación (es decir, los reactivos necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos). Un ejemplo de una solución de reacción de amplificación podría ser una mezcla para llevar a cabo una PCR (polimerasa, sales, dNTPs; véase el Ejemplo 2 como ejemplo de una realización) y un par de cebadores de PCR (cebador A y cebador B). Véase la Figura 2A. En algunos casos el DNA del molde es incluido en la mezcla de reacción. Un subconjunto de la población de microgotitas incluye la perla con DNA y el molde. Este subconjunto de microgotitas constituye la base de la amplificación. Las microcápsulas restantes no contienen DNA de molde y no participan en la amplificación. En una realización, la técnica de amplificación es PCR y los cebadores de PCR están presentes en una razón de 8:1 ó 16:1 (es decir, 8 ó 16 de un cebador respecto a 1 del segundo cebador) para efectuar una PCR asimétrica. En otra realización, la razón de los cebadores de la PCR puede ser sustancialmente igual a la de una PCR normal.

La reacción de amplificación, tal como PCR, puede ser llevada a cabo utilizando cualquier método adecuado- En la visión de conjunto que sigue, se discute como ilustración un mecanismo de PCR. Sin embargo, ha de entenderse que la invención no se limita a este mecanismo. En el ejemplo, una región de la molécula de DNA (región B') es hibridada con un oligonucleótido inmovilizado en una perla (cebador B). Durante la termociclación (Figura 2B), se rompe la unión entre el molde monocatenario y el cebador B inmovilizado en la perla, liberando el molde en la solución microencapsulada circundante. La solución de amplificación, en este caso la solución de PCR, contiene la adición del cebador A y del cebador B en la fase de solución (por ejemplo, en una proporción de 8:1 ó 16:1). Los cebadores B de la fase de solución se unen fácilmente a la región B' complementaria del molde ya que la cinética de unión es más rápida para los cebadores en fase de solución que para los cebadores inmovilizados.

5 En la fase precoz de la PCR, ambas cadenas A y B se amplifican igualmente bien (Figura 2C). En la fase intermedia de la PCR (es decir, entre los ciclos 10 y 30) los cebadores B se agotan, deteniendo una amplificación exponencial. La reacción entra entonces en amplificación asimétrica y la población de amplicones se hace dominada por las cadenas A (Figura 2D). En la fase tardía de la PCR (Figura 2E) después de 30 a 40 ciclos, la amplificación asimétrica aumenta la concentración de cadenas A en solución. El exceso de cadenas A comienza a hibridarse con los cebadores B inmovilizados en las perlas. Polimerasas termoestables utilizan entonces la cadena A como molde para sintetizar una cadena B del amplicón inmovilizada, unida a la perla.

10 En la fase final de la PCR (Figura 2F) la ciclación térmica continuada fuerza una hibridación adicional con los cebadores unidos a las perlas. La amplificación en fase de solución puede ser mínima en esta etapa pero la concentración de cadenas B inmovilizadas aumenta. Luego, la emulsión se rompe y el producto inmovilizado se hace monocatenario por desnaturalización (por calor, pH, etc.) lo que separa la cadena A complementaria. Los cebadores A son hibridados con la región A' de la cadena inmovilizada, y la cadena inmovilizada es cargada con enzimas de secuenciación, y cualesquiera proteínas accesorias necesarias. Las perlas, son secuenciadas después empleando técnicas de pirofosfato reconocidas (descritas, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

25 Diseño de moldes

En una realización preferida, el molde de ácido nucleico que ha de ser amplificado por amplificación en emulsión en perlas es una población de DNA tal como, por ejemplo, un banco de DNA genómico o un banco de cDNA. Se prefiere que todos los miembros de la población de DNA tengan una secuencia común de ácido nucleico en el primer extremo y una secuencia común de ácido nucleico en un segundo extremo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, ligando una primera secuencia de DNA adaptador a un extremo y una segunda secuencia de DNA adaptador a un segundo extremo de cada uno de los miembros de la población de DNA. Muchos bancos de DNA y de cDNA, debido a la naturaleza del vector de clonación (por ejemplo, Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA) se ajustan a esta descripción de tener una secuencia común es un primer extremo y una segunda secuencia común en un segundo extremo de cada miembro de DNA. El molde de ácido nucleico puede tener cualquier tamaño que permita la amplificación *in vitro* (que incluyen las técnicas de amplificación preferidas de PCR y PCR asimétrica). En una realización preferida, el molde tiene un tamaño de 150 a 750 bp aproximadamente, por ejemplo, un tamaño de 250 bp aproximadamente.

Unión de moldes de ácido nucleico a perlas de captura

40 En un aspecto de la invención, el molde de ácido nucleico monocatenario que ha de ser amplificado se une a una perla de captura. El molde puede ser capturado en la perla antes de la emulsificación o después de haber sido formada la emulsión. En un aspecto preferido, las copias de amplificación del molde de ácido nucleico se unen a una perla de captura. Como ejemplos no limitativos, estas uniones pueden tener lugar con mediación por grupos químicos u oligonucleótidos que se unen a la superficie de la perla. El ácido nucleico (por ejemplo, el molde de ácido nucleico, las copias de amplificación, o los oligonucleótidos) pueden fijarse al soporte sólido (por ejemplo, una perla de captura) de cualquier modo conocido en la técnica.

Según la presente invención, el enlace covalente químico de un ácido nucleico a la perla puede conseguirse usando agentes estándar de copulación. Por ejemplo, puede usarse una carbodiimida hidrosoluble para ligar el 5'-fosfato de una secuencia de DNA con perlas de captura revestidas con una amina por medio de un enlace de fosfoamidato. Alternativamente, oligonucleótidos específicos pueden copularse a la perla utilizando una técnica química similar, y después puede utilizarse DNA ligasa para ligar el molde de DNA al oligonucleótido situado sobre la perla. Otras técnicas químicas de ligamiento para unir el oligonucleótido a las perlas, incluyen el uso de N-hidroxisuccinamida (NHS) y sus derivados.

55 En un método que sirve de ejemplo, un extremo de un engarce puede contener un grupo reactivo (tal como un grupo amida) que forma un enlace covalente con el soporte sólido, mientras que el otro extremo del engarce contiene un segundo grupo reactivo que puede unirse con el oligonucleótido que ha de ser inmovilizado. En una realización preferida, el oligonucleótido se une a la perla de captura de DNA mediante enlace covalente. Sin embargo, enlaces no covalentes tales como quelación o complejos de antígeno-anticuerpo, pueden ser utilizados también para fijar el oligonucleótido a la perla.

Como ejemplos no limitativos, pueden emplearse oligonucleótidos que se hibriden específicamente con secuencias únicas situadas en el extremo del fragmento de DNA, tal como el extremo de superposición procedente de un sitio de una enzima de restricción o los "extremos adhesivos" de vectores de clonación, pero también pueden usarse engarces de extremos romos. Estos métodos están descritos con detalle en la patente de EE.UU. No. 5.674.743. Se prefiere que las perlas continúen fijando el oligonucleótido inmovilizado en todas las etapas de los métodos de la invención.

En una realización de la invención, cada perla de captura está diseñada para que tenga una pluralidad de oligonucleótidos que reconocen, es decir, son complementarios de una parte del molde de ácido nucleico, y de las copias de amplificación de este molde. En los métodos descritos en esta memoria, se desea la amplificación clonal de la especie de molde, así que se prefiere que solo una única especie de ácido nucleico se una a una cualquiera de las perlas de captura.

Las perlas utilizadas en esta invención pueden tener cualquier tamaño conveniente y fabricarse partiendo de muchos materiales conocidos. Como ejemplos de tales materiales se incluyen: materiales inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Como ejemplos específicos de estos materiales se incluyen celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinil- y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno, o semejantes (según ha sido descrito por ejemplo, por Merrifield en *Biochemistry* 1964, 3, 1385-1390), poliácridamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicona, plásticos, nitrocelulosa, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poro controlado, metales, dextranos reticulados (por ejemplo, Sephadex™) geles de agarosa (Sepharose™) y otros soportes de fase sólida conocidos por los expertos en la técnica. En realizaciones preferidas, las perlas de captura son perlas de 2 a 100 µm de diámetro, aproximadamente, ó 10 a 80 µm de diámetro, y, lo más preferible, de 20 a 40 µm de diámetro. En una realización preferida, las perlas de captura son perlas de Sepharose.

Emulsificación

Para usar con la presente invención, las perlas de captura con o sin molde de ácido nucleico unido, están suspendidas en una emulsión de agua en aceite termoestable. Se contempla que una pluralidad de los microrreactores incluyan solamente un molde y una perla. Puede haber muchas gotitas que no contienen un molde o que no contienen una perla. Del mismo modo puede haber gotitas que contienen más de una copia de un molde. La emulsión puede formarse según cualquier método adecuado conocido en la técnica. Un método para crear una emulsión se describe más adelante pero puede emplearse cualquier método utilizado para formar una emulsión. Estos métodos son conocidos en la técnica e incluyen métodos con adyuvantes, métodos a contracorriente, métodos de corrientes cruzadas, métodos de tambor giratorio, y métodos de membrana. Además, el tamaño de las microcápsulas puede ajustarse variando el caudal y la velocidad de los componentes. Por ejemplo, en adición gota a gota, el tamaño de las gotas y el tiempo total de distribución pueden variarse. Preferiblemente, la emulsión contiene una densidad de aproximadamente 3.000 perlas encapsuladas por microlitro.

A varias emulsiones adecuadas para reacciones biológicas, aluden Griffiths y Tawfick, en *EMBO*, 22, páginas 24-36 (2003); Ghadessy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, páginas 4552-4557 (2001); patente de EE.UU. No. 6.489.103 y el documento WO 02/22869.

Hay que hacer notar que Griffiths et al. (patente de EE.UU. No. 6.489.103 y documento WO 99/02671) se refieren a un método de clasificación *in vitro* de uno o más elementos genéticos que codifican productos génicos que poseen una actividad deseada. Este método implica compartimentalizar un gen, expresar el gen y clasificar el gen compartimentalizado basándose en el producto expresado. Por contraste con la presente invención, el método de Griffiths de clasificación de microencapsulados no es adecuado para el análisis paralelo de muchas microcápsulas debido a que su producto de ácido nucleico no está fijado y no puede ser fijado. Dado que los ácidos nucleicos de Griffiths no están fijados, podrían mezclarse durante la desemeulsificación.

La emulsión se genera, preferiblemente, añadiendo perlas a una solución de amplificación. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "solución de amplificación" significa la mezcla suficiente de reactivos que es necesaria para realizar la amplificación de DNA de molde. Un ejemplo de una solución de amplificación, una solución de amplificación de PCR, se proporciona en los Ejemplos que figuran más adelante. Ha de apreciarse que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones de la solución de amplificación basándose en el tipo de amplificación a realizar y en si el DNA de molde está unido a las perlas o se proporciona en solución. En una realización, la mezcla de perlas y de la solución de amplificación se añade gota a gota a una mezcla en rotación de un aceite biocompatible (por ejemplo, aceite mineral ligero, Sigma) y se deja emulsionar. En otra realización, las perlas y la solución de amplificación se añaden gota a gota a contracorriente con el aceite biocompatible. El aceite utilizado puede ser suplementado con uno o más estabilizantes de emulsiones biocompatibles. Estos estabilizantes de emulsiones pueden incluir Atlox 4912, Span 80 y otros estabilizantes de emulsiones reconocidos y de los que se dispone en el comercio. En aspectos preferidos la emulsión es termoestable lo que permite la ciclación térmica, por ejemplo, hasta por lo menos 94°C, por lo menos 95°C o, por lo menos, 96°C. Preferiblemente, las gotitas formadas varían en tamaño desde aproximadamente 5 micrómetros hasta aproximadamente 500 micrómetros, más preferiblemente, desde aproximadamente 10 micrómetros hasta aproximadamente 350 micrómetros, aún más preferiblemente, desde aproximadamente 50 a 250 micrómetros y, lo más preferible, desde aproximadamente 100

micrómetros hasta aproximadamente 200 micrómetros. Ventajosamente, la mezcla de fluidos a contracorriente permite regular la formación de las gotitas y la uniformidad del tamaño de la gotita. El solicitante ha observado que pueden estar presentes en la emulsión gotitas de agua más pequeñas que no contienen perlas.

5 Los microrreactores deben ser lo suficientemente grandes para encerrar reactivos de amplificación suficientes para el grado de amplificación que se requiera, Sin embargo, debe ser lo suficientemente pequeños para que pueda amplificarse mediante un equipo convencional de laboratorio una población de microrreactores cada uno de los cuales contiene un miembro de un bando de DNA, por ejemplo, un equipo de termociclación de PCR, tubos de ensayo, incubadores y equipación semejante. Notablemente, el uso de microrreactores permite amplificar mezclas complejas de moldes (por ejemplo, muestras de DNA genómico o RNA de células totales) sin entremezclas de 10 secuencias o dominio de uno o más moldes (por ejemplo, predominio de selección de PCR, véanse las publicaciones de Wagner et al., 1994; Suzuki y Giovannoni, 1996; Chandler et al., 1997; Polz y Cavanaugh, 1996)

Con las limitaciones anteriormente descritas, el tamaño óptimo de un microrreactor puede tener, por término medio, un diámetro de 100 a 200 micrómetros. Los microrreactores de este tamaño permitirían amplificar un banco de DNA que comprendiera aproximadamente 600.000 miembros, en una suspensión de microrreactores de un volumen menor que 10 ml. Por ejemplo, si PCR es el método de amplificación escogido, 10 ml de microrreactores podrían ajustarse en 96 tubos de un aparato de termociclación regular con capacidad para 96 tubos. En una realización preferida la suspensión de 600.000 microrreactores podría tener un volumen menor que 1 ml. Una suspensión de volumen menor que 1 ml puede ser amplificada en aproximadamente 10 tubos de un aparato de termociclación convencional de PCR. En la realización más preferida, la suspensión de 600.000 microrreactores podría tener un 20 volumen menor que 0,5 ml.

Otra realización de la invención se dirige a un método para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos con un molde y una perla, pero sin unión del molde a la perla. En un aspecto, la perla puede comprender una molécula de engarce que puede unir el ácido nucleico amplificado después de la amplificación. Por ejemplo, el engarce puede ser un engarce que pueda ser activado. Tales engarces son bien conocidos e incluyen pares de unión sensibles a la 25 temperatura o sensibles a las sales, tales como estreptavidina/biotina y antígeno/anticuerpos. El ácido nucleico de molde puede ser encapsulado con una perla y amplificado. Después de la amplificación, el ácido nucleico amplificado puede ligarse a las perlas, por ejemplo, ajustando la temperatura o la concentración salina.

Amplificación

Después de encapsular, el ácido nucleico de molde puede ser amplificado, mientras está unido o sin unir a perlas, mediante cualquier método de amplificación adecuado que incluye sistemas de amplificación basados en transcripción (Kwoh D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Gingeras T.R. et al., documento WO 88/10315; Davey et al., Publicación de EP No. 329.822; Miller, H.I. et al., documento WO 89/06700, "RACE" (Frohman, M.A. en :PCR Protocols; A Guide to Methods and Applications, Academic Press. NY (1990) y PCR de un 35 lado (Ohara, O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5673-5677 (1989)). Todavía otros métodos tales como amplificación de dioligonucleótidos, amplificación isotérmica (Walker, G.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:392-396 (1992)). Amplificación basada en las secuencias de ácidos nucleicos (NASBA; véase, por ejemplo, la publicación de Deiman, B. et al., en Mol. Biotechnol. 20(2): 163-79, 2002), amplificación del genoma total (véase, por ejemplo, la publicación de Hawkins, TL. et al., en Curr Opin Biotechnol. 13(1):65-7, 2002), amplificación por desplazamiento de cadena (véase, por ejemplo, la publicación de Andras, SC. en Mol. Biotechnol.19(1): 29-44, 2001), amplificación en círculo rodante (revisado en la patente de EE.UU. No. 5.714.320), así como otras técnicas bien conocidas, pueden emplearse según la presente invención.

En una realización preferida la amplificación de DNA se realiza por PCR. La PCR según la presente invención puede llevarse a cabo encapsulando el ácido nucleico diana con una solución de PCR que comprende todos los reactivos necesarios para realizar la PCR. Después, puede llevarse a cabo la PCR exponiendo la emulsión a cualquier 45 régimen adecuado de termociclación conocido en la técnica. En una realización preferida se efectúan 30 a 50 ciclos, de amplificación, de preferencia, aproximadamente, 40 ciclos. Es deseable, pero no necesario, que después del procedimiento operatorio de amplificación haya uno o más ciclos de hibridación y extensión que sigan a los ciclos de amplificación. En una realización preferida se efectúan 10 a 30 ciclos, de preferencia aproximadamente 25 ciclos, de hibridación y extensión (por ejemplo, según se describe en los ejemplos). Rutinariamente, el DNA de molde es amplificado hasta que, típicamente, al menos 10.000 a 50.000.000, de copias están inmovilizadas sobre cada perla. Se reconoce que para aplicaciones de detección de ácidos nucleicos, se necesitan menos copias del molde. Para aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos se prefiere que al menos dos millones a cincuenta millones de copias, de preferencia aproximadamente diez millones a treinta millones de copias del DNA de molde, estén inmovilizadas en cada perla. Los expertos en la materia reconocerán que el tamaño de la perla (y el sitio de captura 55 sobre ella) determina cuantos cebadores cautivos pueden estar unidos (y por tanto, cuantos moldes amplificados pueden ser capturados sobre cada perla).

Diseño de cebadores de PCR

La selección de cebadores de ácido nucleico para amplificación, tal como amplificación por PCR, se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Estrategias para el diseño de cebadores pueden encontrarse

en la bibliografía científica, por ejemplo, en la publicación de Rubin, E. y A.A. Levy, *Nucleic Acids Res.* 24(18), páginas 3538-45, 1996; y de Buck, G.A. et al., en *Biotechniques*, 27(3); páginas 528-36, 1999. En una realización preferida los cebadores pueden limitarse a una longitud de 20 bases (5 tetrámeros) para síntesis eficaces de cebadores bipartitos de PCR/secuenciación. Cada cebador puede incluir una "grapa" de GC de dos bases sobre el extremo 5', y una grapa de GC, única, sobre el extremo 3', y todos los cebadores pueden compartir una T_m similar (+/- 2°C). En una realización preferida estructuras de forma de horquilla en el interior de los cebadores (vástagos internos de forma de horquilla $\Delta G > -1,9$ kcal/mol) son fuertemente desestimadas en cualquiera de los cebadores diseñados. En otra realización preferida se controla también la dimerización del cebador, para permitir un dímero aceptable de 3 bases como máximo. No obstante, se permite que ocurra solamente en las seis bases de 3' finales y que la ΔG máxima permisible para un dímero de 3' sea $-2,0$ kcal/mol. Preferiblemente, se aplica una penalización a los cebadores en los que los extremos 3' son demasiado similares a otros del grupo. Esto evita la hibridación cruzada entre un cebador y el complemento inverso de otro cebador.

Si los cebadores han sido diseñados según los criterios descritos, la posibilidad de regiones favorables que ocurran dentro del genoma de interés, no tiene mayor importancia, a pesar de la tolerancia indicada de la PCR a desigualdades en poblaciones de muestras complejas (Rubin, E. y A.A. Levy, *Nucleic Acids Res.* 24(18); p. 3548-45, 1996). Aun cuando la probabilidad de encontrar una igualdad perfecta para un cebador de 20 bases es extremadamente baja (4^{20}) (véase la Tabla 1), la probabilidad de encontrar igualdades no consecutivas más cortas aumenta significativamente con el tamaño del genoma de interés. Como resultado, la probabilidad de descubrir una igualdad perfecta para una secuencia de al menos 10 de 20 bases es 99,35% para un genoma de Adenovirus. La probabilidad de encontrar una igualdad perfecta para una secuencia de 16 bases es 97% para las secuencias de la base de datos de NCBI (aproximadamente 100 veces más información de secuencias que el genoma de Adenovirus). La probabilidad de descubrir una igualdad perfecta para una secuencia de 17 a 20 bases es 99% para el genoma humano (aproximadamente tres mil millones de bases)

Tabla 1: La probabilidad de igualaciones secuenciales perfectas para cebadores aumenta con la disminución de los requisitos de longitud de igualdad y el aumento de tamaño del genoma de interés

Longitud de igualdad	Probabilidad de igualdad perfecta ($1/(4^{\text{longitud}})$)	% de probabilidad de igualdad en Adeno ~35 Kbases	% de probabilidad de igualdad en la base de datos de bacterias de NCBI 488 M de bases	% de probabilidad de igualdad en el genoma humano 3 mil millones de bases
20	9,1E-13	0,00%	0,04%	0,27%
19	7,3E-12	0,00%	0,65%	4,32%
18	4,4E-11	0,00%	5,76%	34,37%
17	2,3E-10	0,00%	35,69%	99,17%
16	1,2E-09	0,02%	97,52%	>100%
15	5,6E-09	0,12%	>100%	>100%
14	2,6E-08	0,64%	>100%	>100%
13	1,2E-07	3,29%	>100%	>100%
12	5,4E-07	15,68%	>100%	>100%
11	2,4E-06	68,16%	>100%	>100%
10	1,0E-05	99,35%	>100%	>100%
9	4,6E-05	99,77%	>100%	>100%
8	2,0E-04	>100%	>100%	>100%
7	8,5E-04	>100%	>100%	>100%
6	3,7E-03	>100%	>100%	>100%
5	1,6E-02	>100%	>100%	>100%
4	6,4E-02	>100%	>100%	>100%
3	2,5E-01	>100%	>100%	>100%
2	7,1E-01	>100%	>100%	>100%
1	1,0E+00	>100%	>100%	>100%

Sin embargo, la hibridación cruzada de cebadores con diversas regiones del genoma es menos problemática de lo que podría esperarse debido a la digestión aleatoria de DNA utilizada para formar los moldes de ácido nucleico. Las regiones de hibridación cruzada (CHRs) son claramente benignas. En primer lugar, es improbable que una CHR pudiera ser capaz de competir con éxito con la igualación perfecta entre los cebadores de PCR en solución y el molde. Además, cualesquiera cebadores que incluyan desigualdades en sus extremos 3' estarán en una desventaja competitiva importante. Incluso si una CHR pudiera competir con el cebador de PCR pretendido, esto daría lugar a un producto de PCR truncado, sin un lugar situado aguas abajo para el cebador de secuenciación. Si el producto truncado pudiera conducirse hacia la perla de captura e inmovilizarse en ella, podrían resultar una de dos situaciones. Si la CHR compitiera con el cebador en fase de solución, el producto inmovilizado carecería de un sitio de unión del cebador de secuenciación, y podría dar por resultado un pocillo vacío de la placa de picotitulación (PTP). Si la CHR entrara en competencia con el cebador unido a la perla, el cebador de secuenciación estaría presente todavía, y el único efecto sería una inserción más corta. Ninguno de los dos resultados comprometería indebidamente la calidad de la secuencia. Dada la gran cantidad de material genómico que se usa en el procedimiento de preparación de las muestras (habitualmente 25 µg, que contienen $5,29 \times 10^{16}$ copias del genoma de Adenovirus de 35 Kb), puede usarse un muestreo específico para proporcionar fragmentos que carecen de la CHR completa y que permiten la amplificación estándar por PCR de la región en cuestión.

Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

Después de la amplificación del molde de ácido nucleico y de la unión de las copias de la amplificación a la perla, la emulsión se "rompe" (a lo que se denomina también en la técnica "desemulsificación"). Existen muchos métodos de rotura de una emulsión (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.989.892 y las referencias bibliográficas citadas en ella) y un experto en la técnica sería capaz de seleccionar un método apropiado. En la presente invención, un método preferido de rotura de la emulsión emplea aceite adicional para hacer que la emulsión se separe en dos fases. La fase oleosa se retira luego y se añade un disolvente orgánico adecuado (por ejemplo, hexanos). Después de mezclar, se separa la fase de aceite/disolvente orgánico. Esta etapa puede repetirse varias veces. Finalmente, se retiran las capas acuosas situadas por encima de las perlas. Luego se lavan las perlas con una mezcla de un disolvente orgánico y tampón de hibridación (en los ejemplos se describe un tampón de hibridación adecuado) y después se lava de nuevo con tampón de hibridación. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen alcoholes tales como metanol, etanol y semejantes.

Las perlas unidas con productos de amplificación pueden volver a suspenderse después en el seno de una solución acuosa para usarlas, por ejemplo, en una reacción de secuenciación según tecnologías conocidas. (Véanse las publicaciones de Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5463-5467 (1977); Maxam, A.M. y Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560-564 (1977); Ronaghi, M. et al., Science 281, 363, 365 (1998); Lysov, I. et al., Dokl. Akad. Nauk. SSSR 303, 1508-15511 (1988); Bains, W y Smith G.C. J. Theor. Biol. 135, 303-307 (1988); Dmanac, R. et al., Genomics 4, 114-128 (1989); Khrapko, K.R. et al., FEBS Lett. 256, 118-122 (1989); Pevzner P.A. J. Biomol. Struct. Dyn. 7, 63-73 (1989); Southern, E.M. et al., Genomics 13, 1008-1017 (1992)).

Si las perlas han de ser usadas en una reacción de secuenciación a base de pirofosfato (descrita, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891, entonces es necesario retirar la segunda cadena del producto de la PCR e hibridar un cebador de secuenciación con el molde monocatenario que está unido a la perla. La segunda cadena puede ser dispersada usando cualquiera de los diversos métodos conocidos comúnmente, tales como adición de NaOH, aplicación de compuestos de baja resistencia iónica (por ejemplo, sales), degradación enzimática o desplazamiento de la segunda cadena, o tratamiento por calor. Después de esta etapa de separación de la cadena, las perlas son sometidas a peletización y se desecha el sobrenadante. Las perlas se vuelven a suspender en tampón de hibridación y se añade un cebador de secuenciación u otro cebador de no amplificación. El cebador es hibridado con el producto de amplificación monocatenario. Esto puede realizarse usando un tampón de hibridación de los ácidos nucleicos apropiado y condiciones de temperatura adecuadas, por ejemplo, según procedimientos operatorios estándar en la técnica.

Purificación de las perlas

En este punto, el ácido nucleico amplificado situado sobre las perlas puede ser secuenciado o bien directamente sobre la perla o bien en un recipiente de reacción diferente. El ácido nucleico puede ser secuenciado directamente sobre las perlas haciendo pasar las perlas a un recipiente de reacción y sometiendo el ácido nucleico a una reacción de secuenciación (por ejemplo, secuenciación con pirofosfato o secuenciación de Sanger). Alternativamente, las perlas pueden ser aisladas y el ácido nucleico puede ser retirado de las perlas y secuenciado. En cualquiera de los dos casos, las etapas de secuenciación pueden ser llevadas a cabo sobre cada perla individual. Sin embargo, este método, aun cuando viable desde el punto de vista comercial y técnicamente posible, puede no ser el más eficaz debido a que muchas de las perlas pueden ser perlas "negativas" (es decir, perlas sin ácido nucleico amplificado unido). En tales casos, puede emplearse el procedimiento opcional descrito seguidamente, para separar las perlas negativas antes de la distribución en placas de gran número de pocillos (por ejemplo, de picotitulación)

Un alto porcentaje de las perlas pueden ser negativas si el objetivo es minimizar el número de perlas que están asociadas con dos o más especies diferentes de moldes de ácido nucleico. Para una secuenciación óptima con pirofosfatos, cada perla debe contener múltiples copias de una única especie de ácido nucleico. Esto puede

conseguirse maximizando el número total de perlas combinadas con un fragmento único de ácido nucleico antes de la amplificación. Por ejemplo, puede utilizarse el modelo matemático que figura a continuación

Para el caso general de un número N de DNAs distribuidos aleatoriamente, con un número M de perlas, la población relativa de perlas asociadas con cualquier número de DNAs, depende de la razón N/M. La fracción de perlas asociadas con N DNAs, R(N), puede calcularse utilizando la distribución de Poisson:

$$R(N) = \exp - (N/M) \times (N/M)^N / N! \quad (x \text{ es el símbolo de multiplicación})$$

La tabla 2 que figura a continuación muestra algunos valores calculados para diversas N/M (la razón media de fragmento de DNA a perla) y N (el número de fragmentos asociados con una perla).

Tabla 2

N/M	0,1	0,5	1	2
R(0)	0,9	0,61	0,37	0,13
R(1)	0,09	0,3	0,37	0,27
R(N>1)	0,005	0,09	0,26	0,59

En la tabla 2, la fila superior denota las diversas razones de N/M, R(0) denota la fracción de perlas sin DNA, R(1) denota la fracción de perlas con un DNA (antes de amplificar) y R(N>1) denota la fracción de DNA con más de un DNA (antes de amplificar).

La Tabla 2 indica que la fracción máxima de perlas asociadas con un solo fragmento de DNA es 0.37 (37%) y esto tiene lugar en una razón de fragmento a perla de uno a uno. En esta mezcla aproximadamente el 63% de las perlas no puede ser utilizada para la secuenciación debido a que o no están asociadas con DNA o están asociadas con más de una especie de DNA. Sin embargo, el control de la razón de fragmento a perla requiere cálculos complejos y la variabilidad puede producir lotes de perlas con una fracción significativamente menor de perlas utilizables.

Esta ineficacia puede ser mejorada de modo importante si las perlas que contienen amplicón (procedentes de la asociación con al menos un fragmento) son separadas de las que no contienen amplicón (procedentes de perlas sin fragmentos asociados). Un amplicón se define como cualesquiera moléculas de ácido nucleico producidas mediante una técnica de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*. Para aumentar la eficacia, la unión puede llevarse a cabo empleando razones bajas de fragmento a perla (N/M < 1). Esto minimiza el número de perlas asociadas con más de un DNA. Puede utilizarse una etapa de separación para retirar la mayor parte o la totalidad de las perlas sin DNA, quedando una población enriquecida de perlas con una o más especies de DNA amplificado. Esta población enriquecida puede analizarse por cualquier método de secuenciación tal como, por ejemplo, secuenciación con pirofosfato. Debido a que la fracción de perlas con un amplicón (N = 1) está enriquecida, puede utilizarse más eficazmente cualquier método de secuenciación.

Como ejemplo, con una razón media de fragmento a perla de 0,1, el 90% de las perlas no llevará amplicón, el 9% de las perlas llevará un amplicón, y el 0,55% de las perlas llevará más de un amplicón. El enriquecimiento descrito en esta memoria más adelante permite separar el 90% de las perlas con amplicón cero, quedando una población de perlas en la que la fracción disponible para la secuenciación (N = 1) es:

$$1 - (0,005/0,09) = 94\%$$

La dilución de la razón de fragmento a perla junto con la separación de perlas que contienen amplicón, puede proporcionar un enriquecimiento de 2,5 veces sobre el método sin enriquecer óptimo. Por ejemplo, 94%/37% (véase la Tabla 2 anterior. N/M = 1) = 2,5. Un beneficio adicional del procedimiento operatorio de enriquecimiento descrito en esta memoria más adelante, es que la fracción última de perlas útiles para la secuenciación es relativamente insensible a la variabilidad de N/M. Por tanto, o bien son innecesarios cálculos complejos para deducir la razón óptima de N/M, o bien pueden realizarse con niveles inferiores de precisión. Por consiguiente, los métodos de la invención pueden adaptarse fácilmente para utilizar por personal menos entrenado o para automatizar. Un beneficio adicional de estos métodos es que las perlas con amplicón cero pueden reciclarse y volver a utilizarlas. Aun cuando el reciclamiento no es necesario, puede disminuir el coste o la masa total de reactivos, haciendo que el método de la invención sea más adecuado para algunos fines tales como, por ejemplo, muestreo portátil, muestreo robótico por control remoto, y semejantes. Además, los beneficios colectivos de los métodos descritos (por ejemplo, la adaptación a personal menos entrenado, automatización y reciclamiento de reactivos) pueden reducir los costes de los métodos. El procedimiento operatorio de enriquecimiento se describe con detalle a continuación.

El procedimiento operatorio de enriquecimiento puede ser empleado para tratar perlas que han sido amplificadas por el método de emulsión en perlas descrito. La amplificación está diseñada de modo que cada molécula de ácido nucleico amplificada contenga la misma secuencia en su extremo 3'. La secuencia de nucleótidos puede ser un 20-mero, pero puede ser cualquier secuencia desde 15 bases o más, tal como 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40

bases, o más largas. Aun cuando son funcionales extremos más largos de oligonucleótidos, no son necesarios. Esta secuencia de 3' puede ser introducida en el extremo de un ácido nucleico amplificado por un experto en la técnica. Por ejemplo, si se usa PCR para amplificar un molde de DNA, la secuencia puede ser incluida como parte de un miembro del par de cebadores de la PCR,

- 5 Una representación esquemática del procedimiento de enriquecimiento se indica en la Figura 3. En este procedimiento, la perla con amplicón unido se mezcla con cuatro perlas vacías creando una mezcla de fragmento y perla de amplificación diluida. En la etapa 1 un cebador biotinilado complementario del extremo 3' del amplicón es sometido a hibridación de extremos complementarios con el amplicón. En la etapa 2, DNA polimerasa y los cuatro desoxinucleótido trifosfatos naturales (dNTPs) se añaden a la mezcla de perlas y se extiende el cebador biotinilado.
- 10 Esta extensión es para intensificar la unión entre el cebador biotinilado y el DNA unido a la perla. Esta etapa puede omitirse si la unión de cebador biotinilado y DNA es fuerte (por ejemplo, en un medio ambiente de alta fuerza iónica). En la etapa 3, perlas revestidas con estreptavidina capaces de ser atraídas por un campo magnético (a cuyas perlas se alude en esta memoria como "perlas magnéticas con estreptavidina") se introducen en las mezclas de perlas. Perlas magnéticas pueden obtenerse en el comercio, por ejemplo, de Dynal (M290). Los restos de captura de
- 15 estreptavidina ligan los grupos de biotina hibridados a los amplicones, uniendo las perlas con amplicón unido con las perlas magnéticas con estreptavidina.

En la etapa 5, un campo magnético (representado por un imán) es situado cerca de la mezcla de reacción, lo que hace que los complejos de perlas magnéticas con estreptavidina/ perlas con amplicón unido, se sitúen a lo largo de un lado del tubo más cercano al campo magnético. También es de esperar que las perlas magnéticas sin perlas con amplicón unido fijadas, se sitúen a lo largo del mismo lado. Las perlas sin amplicones permanecen en solución. La mezcla de perlas se lava y las perlas sin fijar por el imán (es, decir, las perlas vacías) son separadas y desechadas.

20 En la etapa 6, la cadena de cebador biotinilado extendida se separa de la cadena de amplicón por "fusión". Esta etapa puede llevarse a cabo, por ejemplo, por calor o mediante un cambio de pH. El calor puede ser el correspondiente a 60°C en condiciones de baja concentración salina (por ejemplo, en un medio ambiente de baja fuerza iónica tal como SSC 0,1X). El cambio de pH puede conseguirse mediante la adición de NaOH.

25 Seguidamente, se lava la mezcla y se recoge el sobrenadante que contiene las perlas con amplicón unido, mientras que las perlas magnéticas son retenidas por el campo magnético. Las perlas enriquecidas que resultan pueden ser utilizadas para la secuenciación de DNA. Ha de apreciarse que el cebador sobre la perla de captura de DNA puede ser el mismo que el cebador de la etapa 2 anterior. En este caso, la hibridación del amplicón con cadenas complementarias del cebador (con o sin extensión) es el origen de la afinidad de captura-diana.

30

El par biotina-estreptavidina podría reemplazarse por una diversidad de pares de captura-diana. Por ejemplo, los pares de captura-diana pueden emplear ligamientos reversibles (por ejemplo, desdoblables) o ligamientos irreversibles. Como ejemplos no limitativos de ligamientos reversibles se incluyen los ligamientos tiol-tiol, digoxigenina/antidigoxigenina, y los ligamientos que emplean VECTREX®Avidin DLA (Vector Laboratories,

35 Burlingame, CA), CaptAvidin™, NeutrAvidin™ y D-destiobiotina (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Según se ha descrito antes, la etapa 2 del procedimiento de enriquecimiento es opcional. Si se omite la etapa 2, puede no ser necesario separar las perlas magnéticas de las perlas con amplicón unido. Las perlas con amplicón unido, con las perlas magnéticas fijadas pueden usarse directamente para la secuenciación. Por ejemplo, no es necesaria la separación si la secuenciación ha de ser llevada cabo en una placa de microtitulación o de picotitulación, y el complejo de perla con amplicón unido y perla magnética puede ajustarse dentro del pocillo de la placa.

40

Aun cuando el uso de perlas de captura magnéticas es conveniente, los restos de captura pueden abarcar otras superficies de unión. Por ejemplo, puede unirse químicamente estreptavidina a una superficie tal como la superficie interior de un tubo. En este caso, la mezcla de perlas amplificadas puede hacerse circular a través del tubo. Las perlas con amplicón unido tenderán a ser retenidas hasta la "fusión" mientras que las perlas vacías fluirán a su

45 través. Esta disposición puede ser particularmente ventajosa para automatizar el procedimiento de preparación de las perlas.

Aun cuando las realizaciones descritas anteriormente son especialmente útiles, pueden imaginarse otros métodos de separación de las perlas. Por ejemplo, las perlas de captura podrían ser marcadas con un resto fluorescente que pudiera hacer fluorescente el complejo de perla de captura-diana. El complejo de perla de captura-diana puede ser separado mediante citometría de flujo o distribución de células por fluorescencia. Utilizando perlas de captura grandes podría efectuarse la separación por filtración u otras técnicas de separación de partículas por tamaño. Dado que tanto las perlas de captura como las dianas son capaces de formar complejos con muchas otras perlas, es posible aglutinar una masa reticulada de perlas de captura-diana. El tamaño grande de la masa aglutinada haría

50 posible la separación simplemente arrastrando por lavado las perlas vacías sin aglutinar. Estos métodos han sido descritos con mayor detalle, por ejemplo, por Bauer, J. en J. Chromatography B. 722 (1999) 55-69 y Brody et al., en Applied Physics Lett. 74. 144-146, (1999).

55

En esta memoria se describe un método para amplificar uno o más ácidos nucleicos que comprende las etapas de:

60 a) formar una emulsión de agua en aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos en la que al menos uno de los microrreactores comprende un solo molde de ácido nucleico, una única perla capaz de unirse al ácido

nucleico y solución de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos; b) amplificar los ácidos nucleicos de los microrreactores para formar copias amplificadas de los ácidos nucleicos; y c) unir las copias amplificadas a las perlas de los microrreactores.

5 La solución de reacción de amplificación empleada en este método, puede ser una solución para realizar una reacción en cadena de la polimerasa, que comprende nucleótido trifosfatos, una polimerasa termoestable, y cebadores de ácidos nucleicos suspendidos en una solución tampón compatible con las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa puede ser una reacción en cadena de la polimerasa, asimétrica o una reacción en cadena de la polimerasa, simétrica. Como ejemplo, la amplificación puede llevarse a cabo por amplificación basada en la transcripción, amplificación rápida de extremos de DNA, amplificación de flujo continuo, o amplificación en círculo rodante..

10 Para usar en este método, la mayoría de los microrreactores pueden incluir un único ácido nucleico. El método puede ser llevado a cabo con al menos 10.000 ácidos nucleicos o al menos 50.000 ácidos nucleicos. Cada perla utilizada en el método puede usarse para capturar más de 10.000 copias de amplificación de un molde de ácido nucleico. En varias realizaciones, la emulsión contiene adicionalmente estabilizantes de emulsiones. Los estabilizantes de emulsiones pueden ser Atlox 4912, Span 80 o sus combinaciones o sus mezclas. La emulsión puede ser termoestable, por ejemplo hasta 95°C, y puede formarse mediante la adición gota a gota a un aceite de los moldes de ácido nucleico, las perlas y la solución de reacción de amplificación. Los microrreactores pueden tener un tamaño medio de 50 a 250 µm de diámetro.

15 También se describe en esta memoria un banco de DNA que comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, en la que cada molécula de ácido nucleico ha sido inmovilizada por separado en una perla diferente, y en la que cada perla comprende más de 1.000.000 de copias de amplificación clonal de cada molécula de ácido nucleico, en la que el banco está contenido en un solo recipiente. Como ejemplos, la molécula de ácido nucleico puede ser DNA genómico, cDNA, DNA episomal, BAC DNA o YAC DNA. El DNA genómico puede ser DNA genómico de origen animal, vegetal, viral, bacteriano o fúngico. Preferiblemente, el DNA genómico es DNA genómico humano o DNA humano. En ciertos aspectos, la perla, por ejemplo, una perla de Sepharose, tiene un diámetro de 2 micrómetros a 100 micrómetros.

20 La descripción incluye también un método para amplificar un ácido nucleico que comprende las etapas de: a) proporcionar un molde de ácido nucleico que ha de ser amplificado; b) proporcionar una material sólido de soporte que comprende una perla generalmente esférica, que tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 µm, en el que la perla es capaz de unirse al molde de ácido nucleico; c) mezclar el molde de ácido nucleico y la perla en una solución de reacción de amplificación que contiene reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en una emulsión de agua en aceite; d) amplificar el molde de ácido nucleico para formar copias amplificadas del molde de ácido nucleico; y e) unir las copias amplificadas a la perla.

25 Como una opción, el método puede incluir una etapa de enriquecimiento para aislar las perlas con copias amplificadas del ácido nucleico unidas, de las perlas sin ácido nucleico unido. Esta etapa de enriquecimiento puede llevarse a cabo por electroforesis, distribución de células, o purificación por afinidad (por ejemplo, con perlas magnéticas que fijan ácidos nucleicos). Preferiblemente, al menos 100.000 copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla, al menos 1.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla, o al menos 1 a 20.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla. En varios aspectos, las perlas son perlas de Sepharose y las copias amplificadas están unidas a las perlas por un par de unión tal como antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, polihistidina/níquel o avidina/biotina. El método puede incluir también las etapas de: f) separar las perlas que llevan molde y las perlas magnéticas; y g) retirar las perlas magnéticas con un campo magnético. Esta separación puede conseguirse por incubación a una temperatura mayor que 45°C o incubando las perlas que llevan molde y las perlas magnéticas en una solución de un pH básico.

30 La descripción incluye, además, un kit para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos, de un molde de ácido nucleico, que comprende: a) perlas de captura de un ácido nucleico; b) un aceite de emulsión; c) uno o más estabilizantes de emulsiones; y d) instrucciones para emplear el kit.

35 Adicionalmente, la descripción incluye un método para producir una población clonal de ácidos nucleicos, que comprende: a) proporcionar una pluralidad de moldes de ácido nucleico de una longitud de 50-800 bp y perlas capaces de unirse con los moldes de ácido nucleico; b) mezclar los moldes de ácido nucleico y las perlas en el seno de una solución biológica de reacción que contiene reactivos necesarios para amplificar los moldes de ácido nucleico; y c) formar una emulsión para crear una pluralidad de microrreactores que comprenden los moldes de ácido nucleico, perlas y solución biológica de reacción, en el que al menos uno de los microrreactores comprende un único molde de ácido nucleico y una sola perla encapsulados en la solución biológica de reacción, en el que los microrreactores están contenidos en el mismo recipiente.

40 Según este método, los ácidos nucleicos pueden ser transcritos y traducidos para generar al menos 10.000 copias de un producto de expresión. El producto de expresión puede unirse a las perlas mediante un par de unión seleccionado entre el grupo que consiste en pares de unión de antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, his6X/níquel-

ácido nitrilotriacético, y marca FLAG/anticuerpo FLAG. En ciertos aspectos, el método produce una población clonal de proteínas, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y anticuerpos construidos por ingeniería genética. La emulsión puede comprender una pluralidad de microrreactores termoestables, en cuya emulsión los microrreactores tienen un diámetro de 50 a 200 μm y comprenden una solución biológica de reacción. La solución biológica de reacción puede comprender reactivos para llevar a cabo reacciones de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa o reacciones copuladas de transcripción y traducción. Preferiblemente, una pluralidad de microrreactores comprenden un molde de ácido nucleico, por ejemplo, uno o pocos moldes de ácido nucleico y una o pocas perlas que unen a los moldes de ácido nucleico.

Ejemplos

10 PCR en emulsión en perlas

Los procedimientos operatorios que siguen, que incluyen captura del DNA de molde, amplificación del DNA, y recuperación de las perlas unidas al molde amplificado, pueden llevarse a cabo en un solo tubo. La forma de la emulsión asegura la separación física de las perlas en "microrreactores" de 100-200 μm dentro de este único tubo, lo que permite la amplificación clonal de diversos moldes. La inmovilización del producto de amplificación se consigue mediante extensión del molde a lo largo de los oligonucleótidos unido a las perlas de captura de DNA. Típicamente, el número de copias del molde inmovilizado varía desde 10 a 30 millones de copias por perla. Las perlas de captura de DNA con múltiples copias de una sola especie de molde de ácido nucleico, están listas para distribuir en placas de picotitulación (PTPs).

Los 300.00 pocillos de 75 picolitros grabados en la superficie de la PTP proporcionan una disposición única para la secuenciación de moldes de DNA cortos, de un modo masivamente paralelo, eficiente y de coste eficaz. Sin embargo, esto requiere cantidades bastante grandes (millones de copias) de moldes clonales en cada pocillo de reacción. Los métodos descritos en esta memoria permiten al usuario amplificar clonalmente especies de moldes de DNA genómico monocatenario mediante procesos de PCR realizados en tubos estándar o en placas de microtitulación estándar. Copias únicas de la especie de molde pueden mezclarse con perlas de captura, resuspenderse en solución completa de amplificación por PCR, y emulsionarse en microrreactores (de 100 a 200 μm de diámetro), después de lo cual la amplificación por PCR genera una amplificación de 10^7 veces de la especie inicial de molde. Este procedimiento operatorio es mucho más sencillo y más eficaz respecto al coste que los métodos anteriores,

Ejemplo 1: Unión de moldes de ácidos nucleicos a perlas de captura

Este ejemplo describe la preparación de una población de perlas que poseen, preferiblemente, solamente un único molde de ácido nucleico unido a ellas. La amplificación clonal con éxito depende de la distribución a cada perla de un número regulado de especies de molde (0,5 a 1). La distribución de especies en exceso puede dar por resultado la amplificación por PCR de una población mixta de moldes, que evita la generación de resultados secuenciales significativos, al tiempo que puede resultar una deficiencia de especies en algunos pocillos que contienen molde para secuenciar. Este hecho puede reducir la extensión de cobertura genómica proporcionada por la fase de secuenciación. Como resultado, se prefiere que la concentración del molde sea determinada con exactitud mediante cuantificación replicada, y que el protocolo de unión sea seguido como se describe a continuación

Control de calidad del molde

El éxito del proceso de PCR en emulsión, está relacionado con la calidad de las especies de molde. Con independencia del cuidado y del detalle prestados a la fase de amplificación, los moldes de mala calidad pueden impedir una amplificación con éxito así como la generación de datos secuenciales de importancia. Para evitar pérdidas innecesarias de tiempo y de dinero, es importante comprobar la calidad del material de molde antes de iniciar la fase de PCR en emulsión del procedimiento. Preferiblemente, el banco de DNA debe pasar por dos etapas de control de la calidad antes de usarle en el proceso de PCR en emulsión. Su concentración y la distribución de productos que contiene, deben ser determinadas. Idealmente, el banco debe aparecer como una población heterogénea de fragmentos con pocos dímeros adaptadores visibles, o sin ellos (por ejemplo, ~ 90 bases). Asimismo, la amplificación con cebadores de PCR debe dar por resultado un producto que varía, por ejemplo, desde 300 a 500 bp. La ausencia de producto de amplificación puede reflejar fallo en ligar apropiadamente los adaptadores al molde, al tiempo que la presencia de una sola banda de cualquier tamaño puede reflejar contaminación del molde

50 Preparación de la solución de PCR

La consideración principal para esta fase es la de evitar la contaminación de la mezcla para la PCR con amplicones extraños. La contaminación de las PCR con un amplicón residual es una de las consecuencias críticas que pueden ocasionar fallo de una operación de secuenciación. Para reducir la posibilidad de contaminación, deben seguirse técnicas de laboratorio apropiadas, y la preparación de la mezcla de reacción debe llevarse a cabo en una sala limpia en una cabina de flujo laminar tratada con radiación UV.

Mezcla de reacción de la PCR

Para una mezcla de reacción de 200 μ l para el proceso de PCR (suficiente para amplificar 600.000 perlas), los siguientes reactivos fueron mezclados en un tubo de PCR de 0,2 ml.

Tabla 3

	Aprovisionamiento (stock)	Final	Microlitros
Solución tampón HIFI	10X	1X	20
Nucleótidos tratados	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	10%	0,1%	2
Tween 80	1%	0,01%	2
Ppsa	2 U	0,003 U	0,333333
Cebador MMP1a	100 μ M	0,625 μ M	1,25
Cebador MMP1b	10 μ M	0,078 μ M	1,56
Taq polimerasa	5 U	0,2 U	8
Agua			136,6
Total			200

5 El tubo se sometió a agitación con formación de vórtice y se mantuvo sobre hielo hasta que las perlas se hibridaron con el molde.

Perlas de captura de DNA

1. 600.000 perlas de captura de DNA fueron hechas pasar desde el tubo de aprovisionamiento hasta un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. La cantidad exacta utilizada depende de la concentración de perlas del reactivo formalizado.
- 10 2. Las perlas fueron sometidas a peletización en una minicentrífuga de sobremesa y se separó el sobrenadante.
3. Las etapas 4-11 fueron realizadas en una sala limpia para PCR.
4. Las perlas fueron lavadas con 1 ml de Tampón de Hibridación 1X.
- 15 5. Las perlas de captura fueron sometidas a peletización en la microcentrifuga. El tubo se hizo girar 180° y se sometió a centrifugación de nuevo.
6. Casi 10 μ l, aproximadamente, del sobrenadante fue retirado del tubo que contenía las perlas. Las perlas no fueron alteradas.
7. Se añadió 1 ml de Tampón de Hibridación 1X y esta mezcla se incubó durante 1 minuto. Las perlas fueron sometidas a peletización luego como en la etapa 5.
- 20 8. Se separó casi 100 μ l, aproximadamente, del material del tubo.
9. Las perlas y la solución restantes fueron pasadas a un tubo de PCR.
10. El tubo de 1,5 ml se lavó con 150 μ l de Tampón de Hibridación 1X con pipeta, aspirando y expulsando varias veces el líquido. Éste se añadió al tubo de PCR que contenía las perlas.
- 25 11. Las perlas fueron sometidas a peletización como en la etapa 5 y casi 10 μ l, aproximadamente, del sobrenadante fueron retirados, teniendo cuidado de no alterar el pelet de perlas.
12. Se separó una parte alícuota de DNA monocatenario (sstDNA) de molde (sstDNA) cuantificado. La concentración final era 200.000 moléculas de sstDNA/ μ l.
13. Se añadió 3 μ l del sstDNA diluido al tubo de PCR que contenía las perlas. Esto fue equivalente a 600.000 copias de sstDNA.
- 30 14- El tubo se agitó suavemente con formación de vórtice para mezclar el contenido.

15. El sstDNA fue hibridado con las perlas de captura en un aparato de termociclación de PCR con el programa 80Anneal almacenado en la carpeta EPCR del aparato de termociclación MU, empleando el siguiente protocolo.

- 5 minutos a 65°C
- 5 • Disminución de 0,1°C/segundo hasta 60°C
- Mantenimiento en 60°C durante 1 minuto
- Disminución de 0,1°C/segundo hasta 50°C
- Mantenimiento en 50°C durante 1 minuto
- Disminución de 0,1°C/segundo hasta 40°C
- 10 • Mantenimiento en 40°C durante 1 minuto
- Disminución de 0,1°C/segundo hasta 20°C, y
- Mantenimiento en 10°C hasta estar listos para la etapa siguiente.

15 En la mayor parte de los casos las perlas se usaron para la amplificación inmediatamente después de la unión del molde. Si las perlas no se utilizaron inmediatamente después se mantuvieron en la solución de molde a 4°C hasta que se necesitaron. Después de esto las perlas fueron tratadas del modo siguiente:

- 16. Como en la etapa 6, las perlas fueron retiradas del aparato de termociclación, centrifugadas y se retiró el tampón de hibridación sin alterar las perlas.
- 17. Las perlas fueron mantenidas en un cubito de hielo hasta la emulsificación (Ejemplo 2).
- 18. Las perlas de captura incluían, por término medio, 0,5 a 1 copia de sstDNA unido a cada perla, y estaban listas para la emulsificación.

Ejemplo 2. Emulsificación

Este ejemplo describe cómo crear una emulsión termoestable de agua en aceite que contiene, aproximadamente, 3.000 microrreactores de PCR por microlitro. Se describe a continuación un protocolo para preparar la emulsión

- 1. Se añadió 200 µl de solución de PCR a las 600.000 perlas (ambos componentes procedente del Ejemplo 1).
- 25 2. La solución se aspiró con pipeta y se expulsó varias veces para volver a suspender las perlas.
- 3. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos la mezcla de perlas y solución de PCR para equilibrar las perlas con la solución de PCR.
- 4. Se añadió 400 µl a Aceite de Emulsión a un tubo de microcentrífuga de 2 ml irradiado con radiación UV.
- 30 5. Se añadió al tubo con el Aceite de emulsión una barra magnética de agitación de 6,35 mm "sin amplicón" para someter a agitación magnética.

La barra de agitación "sin amplicón" se preparó del modo siguiente: Se usó una barra de agitación grande para sostener una barra de agitación de 6,35 mm. La barra de agitación fue, después:

- Lavada por goteo o pulverización sin DNA
- Enjuagada con agua picopura
- 35 • Secada con una arista Kimwipe, e
- Irradiada con radiación UV durante 5 minutos.
- 6. Se retiró la inserción magnética de un soporte de tubos MPC-S de Dynal. El tubo de Aceite de Emulsión se colocó en el soporte tubos. Se fijó el tubo en el centro de una placa de agitación fijada en 600 rpm.
- 7. El tubo fue sometido extensamente a agitación con formación de vórtice para volver a suspender las perlas. Esto aseguró que hubiera un agrupamiento mínimo de las perlas.
- 40 8. Usando una pipeta P-200 la mezcla de PCR y perlas se añadió gota a gota al aceite en rotación a una velocidad de aproximadamente una gota cada 2 segundos, dejando que cada gota bajara hasta el nivel de la

barra magnética de agitación y quedara emulsionada antes de añadir la gota siguiente. La solución se transformó en un líquido blanco lechoso, homogéneo, con una viscosidad similar a la de la mayonesa.

9. Una vez añadida la totalidad de la mezcla de PCR y perlas, el tubo de microcentrifugación se golpeó con suavidad algunas veces para mezclar el aceite que hubiera en la superficie de la emulsión lechosa.

5 10. Se continuó agitando durante otros 5 minutos.

11. Se repitieron las etapas 9 y 10.

12. Se retiró del material emulsionado la barra de agitación sacándola fuera del tubo con una barra de agitación de mayor tamaño.

10 13. Se separó 10 µl de la emulsión y se colocó en un porta de microscopio. La emulsión se tapó con un cubre y se inspeccionó con un aumento 50X (lentes de 10X del ocular y 5X del objetivo). Era de esperar una "buena" emulsión que incluyera principalmente aisladas en el seno de gotitas aisladas (microrreactores) de la solución de PCR en aceite.

14.- Se preparó una mezcla oleosa de emulsión adecuada con estabilizantes de emulsiones, del modo que sigue. Los componentes de la mezcla de emulsión se indican en la Tabla 4.

15 Tabla 4

Ingrediente	Cantidad requerida	Origen	Número de referencia
Aceite Mineral Ligero "Sigma"	94,5 g	Sigma	M-5904
Atlox 4912	1 g	Uniqema	NA
Span 80	4,5 g	Uniqema	NA

20 La mezcla oleosa de emulsión se obtuvo calentando previamente el Atlox 4912 a 60°C en un baño de agua. Después, se añadió 4,5 g de Span 80 a 94,5 g gramos de aceite mineral para formar una mezcla. Luego se añadió a la mezcla un gramo del Atlox 4912 precalentado. Las soluciones se colocaron en un recipiente cerrado y se mezclaron por sacudimiento e inversión. Cualquier indicio de que el Atlox hubiera sedimentado o solidificado se remedió calentando la mezcla a 50°C, seguido de sacudimiento adicional.

Ejemplo 3: Amplificación

25 Este ejemplo describe la amplificación del DNA de molde en la mezcla de perlas y emulsión. Según este protocolo de la invención, la fase de amplificación de DNA del procedimiento tarda 3 a 4 horas. Una vez completada la amplificación puede dejarse la emulsión en el aparato de termociclación durante hasta 12 horas antes de comenzar el procedimiento de aislamiento de las perlas. La termociclación por PCR se llevó a cabo colocando 50 a 100 µl de la mezcla de reacción emulsionada en cámaras individuales de reacción PCR (es decir, tubos de PCR). La PCR se llevó a cabo del modo siguiente:

30 1. Se hizo pasar la emulsión en cantidades de 50-100 µl a, aproximadamente, 10 tubos de PCR separados o a una placa de 96 pocillos, utilizando la punta de una sola pipeta. En esta etapa la emulsión de agua en aceite era muy viscosa.

2. Se hermetizó la placa o se cerraron los bordes de los tubos, y los recipientes fueron colocados en un aparato de termociclación MJ con o sin adaptador de placas de 96 pocillos.

3. El aparato de termociclación de PCR se programó para que ejecutara el programa siguiente:

- 1 ciclo (4 minutos a 94°C) Iniciación de fase caliente
- 35 • 40 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 90 segundos a 68°C)
- 25 ciclos (30 segundos a 94°C, 6 minutos a 58°C), y
- Almacenamiento a 14°C.

4. Una vez completada la PCR se separó el material amplificado para proceder a la rotura de la emulsión y la recuperación de las perlas.

40 Ejemplo 4: Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

Este ejemplo describe cómo romper la emulsión y recuperar las perlas con molde amplificado en ellas. Preferiblemente, la emulsión después del proceso de PCR debe permanecer intacta. La fase inferior de la emulsión

debe permanecer, por inspección visual, como una suspensión blanca, lechosa. Si la solución es clara, la emulsión puede haberse separado parcialmente en sus fases acuosa y oleosa, y es probable que muchas de las perlas tengan una mezcla de moldes. Si la emulsión se ha roto en uno o más de los tubos, estas muestras no deben mezclarse con las otras. Si la emulsión se ha roto en todos los tubos no debe continuarse el procedimiento operatorio.

- 5 1. Todas las mezclas de las reacciones de PCR procedentes de la muestra primitiva de 600 µl fueron combinadas en un único tubo de microcentrifuga de 1,5 ml utilizando la punta de una sola pipeta. Como se ha indicado antes, la emulsión era bastante viscosa. En algunos casos se repitió el pipeteo varias veces para cada tubo. Se hizo pasar al tubo de 1,5 ml tanto material como fue posible.
- 10 2- El material emulsionado restante se recuperó desde cada tubo de PCR añadiendo 50 µl de Aceite Mineral "Sigma" a cada una de las muestras. Usando la punta de una sola pipeta, cada tubo fue sometido a pipeteo aspirando y expulsando algunas veces para volver a suspender el material restante.
3. Este material se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía el grueso del material emulsionado.
4. La muestra se agitó con formación de vórtice durante 30 segundos.
- 15 5. La muestra se centrifugó durante 20 minutos en el tubo de microcentrifuga de sobremesa a 13,2K rpm, en la microcentrifuga Eppendorf
- 20 6. La emulsión se separó en dos fases con una interfase blanca grande. Se separó tanto como fue posible de la fase superior oleosa, transparente, . El material turbio se dejó en el tubo. Frecuentemente una capa blanca separaba las capas de aceite y de agua. Se observaron con frecuencia perlas aglomeradas en el fondo del tubo.
7. La capa acuosa por encima de las perlas fue retirada y guardada para su análisis (análisis en gel, Agilent 2100, y Taqman). Si persistía una interfase de material blanco por encima de la capa acuosa se separó 20 microlitros de la capa acuosa subyacente. Esto se llevó a cabo penetrando el material de la interfase con la punta de una pipeta y retirando la solución desde abajo.
- 25 8. En la Cabina de Humos del Laboratorio Químico de Fabricación and Superficie de la PTP, se añadió 1 ml al resto de la emulsión
9. la muestra se agitó con formación de vórtice y se centrifugó a total velocidad durante 1 minuto.
10. En la Cabina de Humos del Laboratorio Químico de Fabricación y Superficie de la PTP, se retiró la fase superior de aceite/hexano y se depositó en el contenedor de residuos orgánicos.
- 30 11. Se añadió 1 ml de Tampón de Hibridación 1X en el seno de etanol de 80%, a la fase acuosa, interfase y perlas restante.
12. La muestra se agitó con formación de vórtice durante 1 minuto o hasta que se disolvió la sustancia blanca.
13. Se centrifugó la muestra durante 1 minutos a alta velocidad. Se hizo girar 180° el tubo y se centrifugó de nuevo durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante sin alterar el pelet de perlas.
- 35 14. Se lavaron las perlas con 1 ml de Tampón de Hibridación 1X que contenía Tween 20 a 0,1%, y se repitió esta etapa.

Ejemplo 5: Separación de una cadena e hibridación del cebador

Si las perlas han de ser utilizadas en una reacción de secuenciación basada en pirofosfato, es necesario separar la segunda cadena del producto de la PCR e hibridar un cebador de secuenciación con el molde monocatenario que está unido a la perla. Este ejemplo describe un protocolo de realización de este procedimiento.

- 40 1. Se lavaron las perlas con 1 ml de agua y se centrifugó dos veces durante 1 minuto. Se hizo girar el tubo 180° entre cada centrifugación. Después de centrifugar se retiró la fase acuosa.
2. Se lavaron las perlas con 1 ml de EDTA 1 mM Se centrifugó el tubo como en la etapa 1 y se retiró la fase acuosa.
- 45 3. Se añadió 1 ml de NaOH 0,125 M y se incubó la muestra durante 8 minutos.
4. La muestra se agitó brevemente con formación de vórtice y se colocó en una microcentrifuga
5. Al cabo de 6 minutos las perlas fueron sometidas a peletización como en la etapa 1 y se retiró tanta solución como fue posible.

6. Una vez completada la incubación de 8 minutos con NaOH, se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X
7. La muestra se agitó brevemente con formación de vórtice y las perlas fueron sometidas a peletización como en la etapa 1. Se separó tanto sobrenadante como fue posible y se añadió otro 1 ml de tampón de hibridación 1X.
- 5 8. La muestra se agitó brevemente con formación de vórtice, se sometieron a peletización las perlas como en la etapa 1, y se retiró 800 µl del tampón de hibridación 1X.
9. Se hicieron pasar las perlas a un tubo de PCR de 0,2 ml.
10. Las perlas fueron hechas pasar y se retiró tanto tampón de hibridación como fue posible sin alterar las perlas.
- 10 11. Se añadió 100 µl de tampón de hibridación 1X.
12. Se añadió 4 µl de cebador de secuenciación 100 µM- La muestra se agitó con formación de vórtice justamente antes de hibridación.
13. Se realizó la hibridación en un aparato de termociclación MJ utilizando el programa "80Anneal".
- 15 14. Se lavaron las perlas tres veces con 200 µl de tampón de hibridación 1X y se volvió a suspenderlas en 100 µl de tampón de hibridación 1X.
15. Las perlas fueron sometidas a recuento en un hemacitómetro Hausser. Se recuperaron, típicamente, 300.000 a 500.000 perlas (3.000-5.000 perlas/µl).
16. Las perlas fueron almacenadas de 4°C y pudieron usarse para la secuenciación durante 1 semana.

Ejemplo 6: Etapa opcional de enriquecimiento

- 20 Las perlas pueden ser enriquecidas en perlas que contienen amplicón utilizando los procedimientos operatorios que siguen. El enriquecimiento no es necesario pero podría utilizarse para hacer más eficaces técnicas de biología molecular subsiguientes, tales como secuenciación de DNA.
- 25 Cincuenta microlitros de cebador de secuenciación con biotina, 10 µM (500 pmoles en total) se añadió a las perlas de Sepharose que contenían amplicones, procedentes del Ejemplo 5. Las perlas fueron colocadas en un aparato de termociclación. El cebador fue hibridado con el DNA sobre las perlas mediante el programa de hibridación del aparato de termociclación del ejemplo 2.
- 30 Después de hibridar, las perlas de Sepharose fueron lavadas tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. Las perlas, que contenían ahora fragmentos de ssDNA hibridados con los cebadores de secuenciación con biotina, fueron concentradas por centrifugación y resuspendidas en 200 µl de tampón de unión de BST. Se añadió a las perlas resuspendidas diez microlitros de BST-polimerasa de 50.000 unidades/ml y el recipiente que contenía las perlas se colocó en un aparato rotativo durante cinco minutos. Se añadió dos microlitros de mezcla 10 mM de dNTP (es decir, 2,5 µl de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 10 mM) y la mezcla se incubó durante un período adicional de 10 minutos a temperatura ambiente. Las perlas fueron lavadas tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación
- 35 Cincuenta microlitros de perlas de estreptavidina Dynal (perlas de Dynal Biotech. Inc., Lake Success, NY; M270 ó MyOne™, a 10 mg/ml) se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. Después, la mezcla de perlas Dynal se añadió a las perlas de Sepharose resuspendidas. La mezcla se agitó con formación de vórtice y se colocó en un aparato rotativo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 40 Las perlas fueron recogidas en el fondo del tubo de ensayo por centrifugación a 2300 G (500 rpm de la centrifuga Eppendorf 5415D). Las perlas fueron resuspendidas en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. La mezcla, en un tubo de ensayo, se colocó en un separador magnético (Dynal). Se lavaron tres veces las perlas con tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original del mismo tampón. Las perlas sin amplicones fueron retiradas mediante etapas de lavado, como se ha descrito antes. Solamente quedaron retenidas las perlas de Sepharose que contenían los fragmentos de DNA apropiados.
- 45 Las perlas magnéticas fueron separadas de las perlas de Sepharose por adición de 500 µl de NaOH 0,125 M. La mezcla se agitó con formación de vórtice y las perlas magnéticas fueron separadas mediante separación magnética. Las perlas de Sepharose que permanecían en solución fueron transferidas a otro tubo y lavadas con 400 µl de Tris Acetato 50 mM hasta que el pH se estabilizó en 7,6.
- 50

Ejemplo 7: Secuenciación de ácidos nucleicos usando PCR en emulsión en perlas

Se llevó a cabo el experimento que sigue para ensayar la eficacia de la PCR en emulsión en perlas. Para este protocolo, 600.000 perlas de Sepharose con un diámetro medio de 25-35 µm (tal como fueron suministradas por el fabricante) fueron enlazadas covalentemente con cebadores de captura en una proporción de 30-50 millones de copias por perla. Las perlas con cebadores de captura enlazados covalentemente, fueron mezcladas con 1,2 millones de copias de un banco de Adenovirus monocatenario. Las construcciones del banco incluían una secuencia que era complementaria del cebador de captura sobre las perlas.

El banco de adenovirus se hibridó con las perlas usando el procedimiento operatorio descrito en el Ejemplo 1. Después, las perlas fueron resuspendidas en solución de PCR completa. La solución de PCR y las perlas fueron emulsionadas en 2 volúmenes de aceite de emulsificación en rotación utilizando el mismo procedimiento operatorio descrito en el Ejemplo 2. Las perlas emulsionadas (encapsuladas) fueron sometidas a amplificación por PCR como se ha descrito en el Ejemplo 3. La emulsión se rompió como se ha descrito en el Ejemplo 4. El DNA de las perlas fue hecho monocatenario, y el cebador de secuenciación se hibridó utilizando el procedimiento operatorio del Ejemplo 5.

Seguidamente, 70.000 perlas fueron secuenciadas simultáneamente por secuenciación con pirofosfato, utilizando un secuenciador de pirofosfato de 454 Life Sciences (New Haven, CT) (véase la solicitud de Patente en tramitación junto con la presente, de Lohman et al., presentada al mismo tiempo que la titulada Métodos de Amplificación y Secuenciación de Ácidos Nucleicos” documento USSN 60/476.592, presentada el 6 de Junio de 2003). Fueron secuenciados varios lotes de 70.000 perlas y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 5 que figura a continuación

Tabla 5

Tolerancia del error de alineación	Alineaciones				Cobertura	Error de lectura inferido
	Ninguna	Una sola	Múltiple	Única		
0%	47916	1560		1110	54,98%	0,00%
5%	46026	3450		2357	83,16%	1,88%
10%	43474	6001	1	3742	95,64%	4,36%

La Tabla 5 expone los resultados obtenidos del análisis BLAST que compara las secuencias obtenidas desde el secuenciador de pirofosfato con la secuencia de Adenovirus. La primera columna muestra la tolerancia del error utilizado en el programa BLAST. La última columna muestra el error real determinado por comparación directa con la secuencia conocida.

PCR en emulsión en perlas para la secuenciación de dos extremos

Ejemplo 8: Control de calidad de los moldes

Según se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que el éxito de la reacción PCR en emulsión estaba relacionado con la calidad de la especie del molde monocatenario. Por consiguiente, se determinó la calidad del material de molde con dos controles de calidad separados, antes de iniciar el protocolo de PCR en emulsión. En primer lugar, una parte alícuota del molde monocatenario se ensayó en el 2100 BioAnalyzer (Agilent). Un Pico Chip de RNA se usó para verificar que la muestra incluía una población heterogénea de fragmentos que variaban de tamaño desde aproximadamente 200 a 500 bases. En segundo lugar, el banco fue cuantificado utilizando el ensayo de fluorescencia RiboGreen en un fluorómetro de placa Bio-Tek FL600. Las muestras que se determinó que tenían concentraciones de DNA menores que 5 ng/µl se consideraron demasiado diluidas para usar.

Ejemplo 9: Síntesis de perlas de captura de DNA

Perlas empaquetadas procedentes de una columna de afinidad de HP de Sepharose activada con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) de 1 ml (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) fueron separadas desde la columna. Las perlas de tamaño 30-25 µm fueron seleccionadas por paso seriado a través de secciones de malla filtrante de 30 y 25 µm de tamaño de poro (Sefar America, Depew, NY. EE.UU.) Las perlas que atravesaron el primer filtro pero que eran retenidas por el segundo, fueron recogidas y activadas según se describe en el prospecto del producto (Amersham Pharmacia Protocol no. 71700600AP). Se obtuvieron dos cebadores de captura largos de HEG (hexaetilenglicol) marcados con amina, que correspondían al extremo 5' de la cadena sentido y antisentido del molde que había que amplificar (5'-Amina-3 espaciadores HEG gcttacctgaccgacctctgcctatcccctgttgctgtgc-3'; SEQ ID NO:1; y 5'-Amina-3 espaciadores HEG ccattccccagctcgtcttgccatctgttccctccctgtc-3'; SEQ ID NO:2) (IDT Technologies, Coralville, IA, EE.UU.) Los cebadores estaban diseñados para la captura de ambas cadenas de los productos de amplificación y permitir la secuenciación de los dos extremos, es decir, la secuenciación de la primera y la segunda cadenas de los productos de amplificación. Los cebadores de captura se disolvieron en tampón de fosfato 20 mM, pH 8,0 para obtener una concentración final 1 mM. Tres microlitros de cada cebador se unieron a las perlas

tamizadas de 30 – 25 μm . Después las perlas fueron mantenidas en una solución tampón de almacenamiento (Tris 50 mM, Tween al 0,02% y azida de sodio al 0,02%, pH 8). Las perlas fueron cuantificadas con un hemacitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA, EE.UU.) y mantenidas a 4°C hasta que fueron necesarias.

Ejemplo 10: Preparación y formulación de mezclas de reacción PCR

- 5 Como con cualquier técnica de amplificación molecular, la contaminación de los reactivos con amplicones extraños o residuales procedentes de otros experimentos, podría interferir con una operación de secuenciación. Para reducir la posibilidad de contaminación, la mezcla de reacción PCR se preparó en una cabina de flujo laminar tratada con radiación UV, situada en una sala limpia para la PCR. Para cada reacción PCR en emulsión en 600.000 perlas se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo de 1,5 ml: 225 μl de mezcla de reacción (Tampón Platinum HiFi 1X (Invitrogen)), dNTPs 1 mM, MgSO_4 2,5 mM (Invitrogen), BSA al 0,1%, Tween al 0,01%, 0,003 U/ μl de PPI-asa termoestable (NEB), cebador directo (5'-gcttacctgaccgacctctg-3'; SEQ ID NO:3) 0,125 μM , y cebador inverso (5'-ccattccccagctcgtcttg-3'; SEQ ID NO:4) 0,125 μM , (IDT Technologies, Coralville, IA, EE.UU.) y 0,2 U/ μl de Taq polimerasa de Platinum Hi-Fi (Invitrogen). Se separó veinticinco microlitros de la mezcla de reacción y se mantuvo en un tubo de PCR individual de 200 μl para usar como testigo negativo. Tanto la mezcla de reacción como los testigos negativos fueron mantenidos sobre hielo hasta que se necesitaron.

Ejemplo 11: Unión de especies de moldes con perlas de captura de DNA

- La amplificación de DNA clonal realizada con éxito para secuenciación se refiere a la distribución de un número regulado de especie de molde a cada perla. Para los experimentos descritos en esta memoria que siguen, se determinó que la concentración típica del molde diana era 0,5 copias del molde por perla de captura. En esta concentración la distribución de Poisson dicta que el 61% de las perlas no tienen molde asociado, que el 30% tiene un especie de molde y que el 9% tiene dos o más especies de molde. La distribución de especies en exceso puede dar por resultado la unión y amplificación subsiguiente de una población mixta (2 ó más especies) sobre una sola perla, lo que evita la generación de resultados secuenciales significativos. Sin embargo, la distribución de demasiado pocas especies puede dar por resultado menos pocillos que contengan molde (un especie por perla), reduciendo la extensión de cobertura de la secuenciación. Por consiguiente, se consideró que era importante la concentración de moldes del banco monocatenario.

- Moléculas de ácido nucleico de molde fueron hibridadas con cebadores complementarios sobre las perlas de captura de DNA por el método que sigue, realizado en una cabina de flujo laminar tratada con radiación UV. Seiscientos mil perlas de captura de DNA suspendidas en solución tampón de almacenamiento de perlas (véase el Ejemplo 9 anterior) fueron transferidas a un tubo de PCR de 200 μl . Se sometió a centrifugación el tubo en una minicentrífuga de sobremesa durante 10 segundos, se hizo rotar 180° y se centrifugó durante 10 segundos más para asegurar la formación uniforme de pelets.. Se separó el sobrenadante y las perlas se lavaron con 200 μl de tampón de hibridación (Tris 20 mM, pH 7,5 y acetato magnésico 5 mM). Se agito el tubo con formación de vórtice durante 5 segundos para resuspender las perlas y las perlas se sometieron a peletización como antes. Casi 10 μl , aproximadamente, del sobrenadante por encima de las perlas fue separado y se añadió una porción adicional de 200 μl de tampón de hibridación. Las perlas fueron sometidas de nuevo a agitación con formación de vórtice durante 5 segundos, dejadas en reposo 1 minuto y después sometidas a peletización como antes. Se desechó casi 10 μl , aproximadamente, de sobrenadante.

- Seguidamente, se añadió a las perlas 1,5 μl de un banco de moldes de 300.000 moléculas/ μl . Se agitó el tubo con formación de vórtice durante 5 segundos para mezclar el contenido y los moldes fueron hibridados con las perlas según un programa controlado de desnaturalización/hibridación efectuado en un aparato de termociclación MJ. El programa permitía la incubación durante 5 minutos a 80°C, seguido de una disminución de 0,1°C/segundo a 70°C, incubación durante 1 minuto a 70°C, disminución de 0,1°C/segundo a 60°C, mantenimiento en 60°C durante 1 minuto, disminución de 0,1°C/segundo hasta 50°C, mantenimiento en 50°C durante 1 minuto, disminución de 0,1°C/segundo hasta 20°C, y mantenimiento en 20°C. Una vez completado el procedimiento de hibridación, las perlas fueron retiradas del aparato de termociclación y sometidas a centrifugación como antes, y se decantó cuidadosamente el tampón de hibridación. Las perlas de captura incluían, por término medio, 0,5 copia de DNA monocatenario de molde unido a cada perla, y se mantuvieron sobre hielo hasta que fueron necesarias.

Ejemplo 12: Emulsificación

- 50 El procedimiento de emulsificación crea una emulsión de agua en aceite termoestable que contiene 10.000 microrreactores de PCR discretos, por microlitro. Ésta emulsión sirve de matriz de amplificación clonal, de una sola molécula, de las moléculas individuales del banco de DNA diana. La mezcla de reacción y las perlas de captura de DNA para una sola reacción fueron emulsionadas del modo que sigue. En una cabina de flujo laminar tratada con radiación UV se añadió 200 μl de solución de PCR (procedente del Ejemplo 10) al tubo que contenía las 600.000 perlas de captura de DNA (procedentes del Ejemplo 11). Las perlas fueron resuspendidas mediante pipeteado repetido. Después de esto, la mezcla de solución de PCR y perlas se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos por lo menos, dejando que las perlas se equilibraran con la solución de PCR. Al mismo tiempo, 450 μl de Aceite de Emulsión (Span 80 al 4,5% (p/p), Atlox 4912 al 1% (p/p) (Uniqema, Delaware) en el seno de aceite mineral

ligero (Sigma) se distribuyó en partes alícuotas en un tubo de centrífuga de 2 ml de parte superior plana (Dot Scientific) que contenía una barra de agitación magnética de 6,35 mm, estéril, (Fischer). Este tubo se colocó después en un soporte de plástico para tubos hecho a medida, que luego se centró sobre una placa calefactora con agitación de temperatura uniforme, digital, de Fisher Scientific, fijada en 450 rpm.

- 5 La solución de PCR y perlas se agitó con formación de vórtice durante 15 segundos para resuspender las perlas. La solución fue extraída luego con una jeringuilla desechable de plástico de 1 ml (Benton-Dickinson) con una aguja de jeringuilla de seguridad de plástico fijada (Henry Schein). La jeringuilla se colocó en una bomba de jeringuillas (Cole-Palmer) modificada con una unida de base de aluminio que orientaba la bomba verticalmente en lugar de horizontalmente (por ejemplo, Figuras 4-6). El tubo con el aceite de emulsión se alineó sobre la placa de agitación de modo que estuviera centrado por debajo de la aguja de jeringuilla de plástico y la barra de agitación magnética pudiera girar apropiadamente. La bomba de jeringuillas se fijó para dispensar 0,6 ml a 5,5 ml/hora. La solución de PCR y perlas se añadió al aceite de emulsión gota a gota. Se tuvo cuidado para asegurar que las gotitas no se ponían en contacto con los lados del tubo a medida que caían en el aceite que estaba girando.

- 15 Una vez formada la emulsión, se tuvo gran cuidado para reducir al mínimo la agitación de la emulsión tanto durante el procedimiento de emulsificación como en las etapas siguientes de distribución de partes alícuotas después de la emulsificación. Se encontró que la agitación con formación de vórtice, un pipeteado rápido o un proceso de mezclado excesivo, podía hacer que la emulsión se rompiera, destruyendo los microrreactores discretos. Al formar la emulsión, las dos soluciones se transformaron en una mezcla blanca, lechosa, homogénea, con la viscosidad de una mayonesa. Los contenidos de la jeringuilla fueron vaciados en el aceite en rotación. Después, se retiró el tubo de emulsión de la pieza de soporte, y suavemente se le golpeó con el dedo hasta que desapareció la capa de aceite residual de la parte superior de la emulsión. El tubo se volvió a colocar en la pieza de soporte y se agitó con la barra magnética durante un período adicional de un minuto. Se retiró la barra de agitación de la emulsión haciendo pasar un útil magnético de retirada a lo largo del exterior del tubo, y se desechó la barra de agitación.

- 20 Se tomaron veinte microlitros de la emulsión desde la parte media del tubo usando una pipeta P-100 y se colocó sobre un porta de microscopio. Las puntas de pipeta mayores se utilizaron para minimizar las fuerzas de cizalla. La emulsión se inspeccionó a 50 aumentos para asegurar que comprendía, predominantemente, perlas aisladas en microrreactores de 30 a 150 micrómetros de diámetro, de solución de PCR en aceite (Figura 7). Después del examen visual, las emulsiones fueron amplificadas inmediatamente.

Ejemplo 13: Amplificación

- 30 La emulsión se distribuyó en partes alícuotas en 7-8 tubos de PCR separados. Cada tubo incluía, aproximadamente, 75 μ l de la emulsión. Los tubos fueron cerrados herméticamente y colocados en un aparato de termociclación MJ junto con el testigo negativo de 25 μ l anteriormente descrito. Se emplearon los tiempos de ciclo siguientes: 1 ciclo de incubación durante 4 minutos a 94°C (Iniciación de comienzo en caliente), 30 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C y 150 segundos a 68°C (Amplificación), y 40 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C y 360 segundos a 68°C (Hibridación y Extensión). Una vez completado el programa de PCR, los tubos fueron separados y las emulsiones se rompieron inmediatamente o las mezclas de reacción fueron mantenidas a 10°C durante hasta 16 horas antes de iniciar el procedimiento de rotura.

Ejemplo 14: Rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

- 40 Después de la amplificación, las emulsiones fueron examinadas para determinar la rotura (separación de las fases oleosa y acuosa). Las emulsiones sin romper fueron combinadas en un tubo de microcentrifuga único de 1,5 ml, al tiempo que la emulsión ocasional rota se desechó. Dado que las muestras de emulsión eran bastante viscosas permanecían en cada tubo de PCR cantidades importantes. La emulsión que quedaba en los tubos se recuperó añadiendo 75 μ l de aceite mineral a cada tubo de PCR y pipeteando la mezcla. Esta mezcla se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía el grueso del material emulsionado. El tubo de 1,5 ml se agitó con formación de vórtice durante 30 segundos. Después de esto, el tubo se sometió a centrifugación durante 20 minutos en la microcentrifuga de sobremesa a 13,2K rpm (velocidad total).

- 50 Después de centrifugar, la emulsión se separó en dos fases con una interfase blanca grande. Se desechó la fase superior oleosa, clara, mientras que el material de la interfase, turbio, se dejó en el tubo. En una cabina de humos, se añadió 1 ml de hexanos a la fase inferior y la capa de interfase. La mezcla se agitó con formación de vórtice durante 1 minuto y se centrifugó a total velocidad durante 1 minuto en una microcentrifuga de sobremesa. Se separó la fase superior de aceite/hexano y se desechó. Después de esto, se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X/etanol de 80%, a la fase acuosa, interfase y perlas, restantes. Esta mezcla se agitó con formación de vórtice durante 1 minuto o hasta que el material blanco de la interfase se había disuelto. Entonces se centrifugó la muestra durante 1 minuto en una microcentrifuga de sobremesa a total velocidad. El tubo se hizo rotar 180 grados y se centrifugó de nuevo durante un minuto más. Luego se separó cuidadosamente el sobrenadante sin alterar el pelet de perlas.

El pelet de perlas blanco se lavó dos veces con 1 ml de tampón de hibridación que contenía Tween 20 al 0,1%. Se desechó la solución de lavado y las perlas fueron sometidas a peletización después de cada lavado según se ha

descrito anteriormente. El pelet se lavó con un 1 ml de agua Picopura. Las perlas fueron sometidas a peletización con el método de centrifuga-rotación-centrifuga utilizado anteriormente. la fase acuosa se separó cuidadosamente. Las perlas fueron lavadas luego con 1 ml de EDTA 1 mM como antes, excepto que las perlas se agitaron con formación de vórtice brevemente a media velocidad durante 2 segundos antes de formar los pelets y de la retirada del sobrenadante.

El DNA amplificado, inmovilizado sobre las perlas de captura, fue tratado para obtener DNA monocatenario. La segunda cadena fue separada por incubación en una solución Melt básica. Un ml de solución Melt (NaOH 0,125 M, NaCl 0,2 M) se añadió seguidamente a las perlas. El pelet se volvió a suspender por agitación con formación de vórtice a velocidad media durante 2 segundos y el tubo se colocó en un rodador de tubos Thermolyne LabQuake durante 3 minutos. Después, las perlas fueron sometidas a peletización como antes, y el sobrenadante se separó cuidadosamente y se desechó. La solución Melt residual se neutralizó mediante la adición de 1 ml de tampón de hibridación. Después de esto, las perlas fueron agitadas con formación de vórtice, a velocidad media, durante 2 segundos. Las perlas fueron sometidas a peletización y el sobrenadante se separó como antes. Se repitió el lavado con tampón de hibridación, excepto que solamente se separó después de centrifugar 800 μ l del tampón de hibridación. Las perlas y el resto del tampón de hibridación se hicieron pasar a un tubo de PCR de 0,2 ml. Las perlas fueron usadas inmediatamente o mantenidas a 4°C durante hasta 48 horas antes de continuar con el procedimiento de enriquecimiento.

Ejemplo 15: Enriquecimiento de las perlas

La masa de perlas incluía perlas con cadenas de DNA amplificadas, inmovilizadas, y perlas vacías o nulas. Según se ha mencionado anteriormente, se calculó que el 61% de las perlas carecía de DNA de molde durante el procedimiento de amplificación. Se usó enriquecimiento para aislar selectivamente las perlas con DNA de molde, haciendo máximo con ello la eficacia de la secuenciación. El procedimiento de enriquecimiento se describe con detalle seguidamente.

Las perlas con una sola cadena procedente del Ejemplo 14 fueron sometidas a peletización con el método de centrifuga-rotación-centrifuga y se separó tanto sobrenadante como fue posible sin alterar las perlas. Se añadió a las perlas quince microlitros de tampón de hibridación, seguido por 2 μ l de cebador de enriquecimiento de 40 bases, biotinilado, 100 μ M (5'-biotina-tetra espaciadores de etilenglicol ccatccccagctgctgttgccatctgtccctccctgtctcag-3'; SEQ ID NO:5). El cebador era complementario de los sitios de amplificación y secuenciación combinados (cada uno de una longitud de 20 bases) sobre el extremo 3' del molde inmovilizado en la perla. La solución se mezcló por agitación con formación de vórtice a velocidad media durante 2 segundos y los cebadores de enriquecimiento fueron hibridados con las cadenas de DNA inmovilizadas usando un programa regulado de desnaturalización/hibridación en un aparato de termociclación MJ. El programa consistía en los siguientes ciclos de tiempo y temperatura: incubación durante 30 segundos a 65°C, disminución de 0,1°C/segundo hasta 58°C, incubación durante 90 segundos a 58°C y mantenimiento a 10°C.

Mientras los cebadores se estaban hibridando, perlas de estreptavidina MyOne™ de Dynal fueron resuspendidas agitando suavemente por rotación. A continuación, 20 μ l de las perlas MyOne™ fueron añadidos a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenía 1 ml de fluido de intensificación (NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La mezcla de perlas MyOne se agitó durante 5 segundos con formación de vórtice y se colocó el tubo en un imán MPC-S de Dynal. Las perlas paramagnéticas se agruparon formando pelets en el lado del tubo de microcentrifuga. Se separó cuidadosamente el sobrenadante y se desechó sin alterar las perlas MyOne™. Se separó el tubo del imán y se añadió 100 μ l de fluido de intensificación. Se agitó el tubo durante 5 segundos con formación de vórtice para volver a suspender las perlas, y se mantuvo sobre hielo hasta que se necesitó.

Una vez completado el programa de hibridación se añadió 100 μ l de tampón de hibridación al tubo de PCR que contenía las perlas de captura de DNA y el cebador de enriquecimiento. Se agitó el tubo durante 5 segundos con formación de vórtice y el contenido se hizo pasar un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml de nueva aportación. El tubo de PCR en el que el cebador de enriquecimiento había sido hibridado con las perlas de captura se lavó una vez con 200 μ l de tampón de hibridación y la solución de lavado se añadió al tubo de 1,5 ml. Las perlas fueron lavadas tres veces con 1 ml de tampón de hibridación, agitadas durante 2 segundos con formación de vórtice y sometidas a peletización como anteriormente. El sobrenadante se separó cuidadosamente. Después del tercer lavado, las perlas fueron lavadas dos veces con 1 ml de fluido de intensificación enfriado con hielo. Las perlas fueron agitadas con formación de vórtice, agrupadas en pelets, y el sobrenadante se separó como antes. Las perlas fueron resuspendidas en 150 μ l de fluido de intensificación enfriado con hielo y la solución de perlas se añadió a las perlas MyOne™ lavadas.

La mezcla de perlas se agitó durante 3 segundos con formación de vórtice y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos en un rodador de tubos LabQuake. Las perlas MyOne™ revestidas con estreptavidina se unieron con los cebadores de enriquecimiento biotinilados hibridados con moldes inmovilizados situados sobre las perlas de captura de DNA. Después las perlas fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 3 minutos, al cabo de cuyo tiempo las perlas fueron agitadas con formación de vórtice con impulsos de 2 segundos hasta que quedaron suspendidas de nuevo. Las perlas resuspendidas se colocaron sobre hielo durante 5 minutos. Después de esto se añadió a las

perlas 500 µl de fluido de intensificación frío y el tubo se insertó en un imán MPC-S de Dynal. Las perlas fueron dejadas sin alterar durante 60 segundos para permitir la peletización contra el imán. Después de esto, el sobrenadante con MyOne™ en exceso y perlas de captura sin DNA, se separó cuidadosamente y se desechó.

5 Se retiró el tubo del imán MPC-S y se añadió a las perlas 1 ml de fluido de intensificación frío. Se volvió a suspender las perlas golpeando suavemente el tubo con el dedo. Fue importante no formar vórtice con las perlas en este momento ya que la mezcla con fuerza podía romper el enlace entre las perlas MyOne™ y las perlas de captura. Las perlas fueron devueltas al imán y se retiró el sobrenadante. Se repitió el lavado tres veces más para asegurar la separación de todas las perlas de captura nulas. Para separar los cebadores de enriquecimiento hibridados y las perlas MyOne™, las perlas de captura de DNA fueron resuspendidas en 400 µl de solución de fusión, agitadas con
10 formación de vórtice durante 5 segundos y agrupadas formando pelets con el imán. El sobrenadante con las perlas enriquecidas fue hecho pasar a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, separado. Para la máxima recuperación de las perlas enriquecidas, se añadió una segunda parte alícuota de 400 µl de solución de fusión, al tubo que contenía las perlas MyOne™. Las perlas fueron agitadas con formación de vórtice y agrupadas formando pelets como antes. El sobrenadante procedente del segundo lavado se separó y se combinó con el primer bolo de perlas enriquecidas. Se
15 desechó el tubo de perlas MyOne™ agotado,

El tubo de microcentrífuga con perlas de captura de DNA enriquecidas, se colocó sobre el imán MPC-S de Dynal para formar pelets con las perlas MyOne™ residuales. Las perlas enriquecidas existentes en el sobrenadante fueron transferidas a un segundo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y centrifugadas. Se separó el sobrenadante y las perlas fueron lavadas tres veces con 1 ml de tampón de hibridación para neutralizar la solución de fusión residual.
20 Después del tercer lavado 800 µl del sobrenadante fueron separados y las perlas y la solución restantes fueron hechas pasar a un tubo de PCR de 0,2 ml. Las perlas enriquecidas fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 3 minutos y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 20 µl de tampón de hibridación y 3 µl de dos diferentes cebadores de secuenciación 100 µM (5'-ccatctgttccctcctgtc-3'; SEQ ID NO:6; y 5'-cctatcccctgttgctgtc-3' fosfato; SEQ ID NO:7) fueron añadidos. El tubo se agitó 5 segundos con formación de vórtice y se colocó en un
25 aparato de termociclación MJ para realizar el siguiente programa de hibridación de 4 etapas: incubación durante 5 minutos a 65°C, disminución de 0,1°C/segundo hasta 50°C, incubación durante 1 minuto a 50°C, disminución de 0,1°C/segundo hasta 40°C, mantenimiento a 40°C durante 1 minuto, disminución de 0,1°C/segundo hasta 15°C y mantenimiento en 15°C.

Una vez completado el programa de hibridación, las perlas fueron retiradas del aparato de termociclación y sometidas a peletización por centrifugación durante 10 segundos. El tubo se hizo rotar 180° y se centrifugó durante
30 10 segundos más. Se decantó el sobrenadante y se desechó, y se añadió al tubo 200 µl de tampón de hibridación. Las perlas fueron resuspendidas con una segunda agitación de 5 segundos con formación de vórtice, y agrupadas formando pelets como antes. Se separó el sobrenadante y se volvió a suspender las perlas en 100 µl de tampón de hibridación. En este punto, las perlas fueron cuantificadas con un contador Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter).
35 Las perlas se mantuvieron a 4°C y fueron estables durante 1 semana por lo menos.

Realizaciones de la descripción

1. Un método para amplificar uno o más ácidos nucleicos, que comprende las etapas de
 - (a) formar una emulsión de agua en aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos en los que al menos uno de los microrreactores comprende un molde único de ácido nucleico, una sola perla capaz de unión con ácido nucleico, y solución de reacción de amplificación que contiene reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos.
40
 - (b) amplificar los ácidos nucleicos de los microrreactores para formar copias amplificadas de dichos ácidos nucleicos; y
 - (c) unir las copias amplificadas con las perlas de los microrreactores.
- 45 2. El método de la realización 1, en el que la mayoría de los microrreactores incluyen un único ácido nucleico
3. El método de la realización 1, en el que dicha solución de reacción de amplificación es una solución de reacción en cadena de la polimerasa que comprende nucleótido trifosfatos, una polimerasa termoestable y cebadores de ácidos nucleicos suspendidos en un tampón compatible con las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.
- 50 4. El método de la realización 3, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa, asimétrica.
5. El método de la realización 3, en el que dicha reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa, simétrica.
6. El método de la realización 1, en el que dicha emulsión contiene, adicionalmente, estabilizantes de emulsiones.

7. El método de la realización 6, en el que dichos estabilizantes de emulsiones están seleccionados entre el grupo que consiste en Atlox 4912, Span 80 y sus combinaciones y sus mezclas.
8. El método de la realización 1, en el que dicha emulsión es termoestable.
9. El método de la realización 8, en el que dicha emulsión es termoestable a 95°C.
- 5 10. El método de la realización 1, en el que la amplificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en amplificación basada en la transcripción, amplificación rápida de extremos de cDNA, amplificación de flujo continuo, y amplificación en círculo rodante
11. El método de la realización 1, en el que la emulsión se forma mediante la adición gota a gota a un aceite, de los moldes de ácidos nucleicos, perlas, y solución de reacción de amplificación.
- 10 12. El método de la realización 1, realizado con al menos 10.000 ácidos nucleicos.
13. El método de la realización 1, realizado con al menos 50.000 ácidos nucleicos.
14. El método de la reivindicación 1, en el que los microrreactores tienen un tamaño medio de 50 a 250 μm de diámetro.
- 15 15. El método de la realización 1, en el que después de la etapa (c) cada perla captura más que 10.000 copias de amplificación de un molde de ácido nucleico.
16. Un banco de DNA que comprende una pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos, en el que cada molécula de ácido nucleico es inmovilizada por separado en una perla diferente, y en la que cada perla comprende más de 1.000.000 de copias de amplificación clonal de cada molécula de ácido nucleico, en el que el banco está contenido en un único recipiente.
- 20 17. El banco de la realización 16, en el que las moléculas de ácidos nucleicos están seleccionadas entre el grupo que consiste en DNA genómico, cDNA, DNA episomal, BAC DNA y YAC DNA.
18. El banco de la realización 17, en el que el DNA genómico está seleccionado entre el grupo que consiste en DNA genómico animal, vegetal, viral, bacteriano y fúngico.
19. El banco de la realización 18, en el que el DNA genómico es DNA genómico humano o cDNA humano.
- 25 20. El banco de la realización 16, en la que la perla tiene un diámetro de 2 micrómetros a 100 micrómetros.
21. El banco de la reivindicación 16, en la que la perla es una perla de Sepharose.
22. Un método para amplificar un ácido nucleico, que comprende las etapas de
- (a) proporcionar un molde de ácido nucleico que ha de ser amplificado:
- (b) proporcionar un material sólido de soporte que comprende una perla generalmente esférica que tiene un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 μm , en el que la perla es capaz de unión con el molde de ácido nucleico;
- 30 (c) mezclar el molde de ácido nucleico y la perla en el seno de una solución de reacción de amplificación que contiene reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en una emulsión de agua en aceite;
- (d) amplificar el molde de ácido nucleico para formar copias amplificadas de dicho molde de ácido nucleico; y
- 35 (e) unir las copias amplificadas con la perla..
23. Un kit para realizar la amplificación de ácidos nucleicos, de un molde de ácido nucleico, que comprende :
- (a) perlas de captura de ácidos nucleicos:
- (b) un aceite de emulsión;
- 40 (c) uno o más estabilizantes de emulsiones;
- (d) instrucciones para llevar a cabo el método de la realización 1 ó de la realización 22.
24. El método de la realización 1 ó de la realización 22, que comprende, además, la etapa de enriquecimiento de las perlas que unen copias amplificadas del ácido nucleico, fuera de las perlas con las que no está unido ácido nucleico, cuya etapa de enriquecimiento está seleccionada entre el grupo que consiste en purificación por afinidad, electroforesis y distribución celular.
- 45

25. El método de la realización 24, en el que la etapa de enriquecimiento se lleva a cabo por purificación por afinidad con perlas magnéticas que fijan ácido nucleico;
26. El método de la realización 1 ó 22, en el que al menos 100.000 copias cada molécula de ácido nucleico diana se unen con cada perla;
- 5 27. El método de la realización 1 ó 22, en el que al menos 1.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen con cada perla
28. El método de la realización 1 ó 22, en el que entre al menos 1a 20.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen con cada perla.
29. El de la realización 1 ó 22, en el que las perlas son perlas de Sepharose;
- 10 30. El método de la realización 1 ó 22, en el que las copias amplificadas se unen con la perlas mediante un par de unión seleccionado entre el grupo que consiste en antígeno/anticuerpo, ligando/receptor y polihistidina/níquel
31. El método de la realización 30, en el que el par de unión es avidina/biotina;
32. El método de la realización 25, que comprende además las etapas de;
- 15 separar las perlas que llevan molde y las perlas magnéticas; y
- retirar las perlas magnéticas con un campo magnético.
33. El método de la realización 32, en el que la separación se consigue por incubación a una temperatura mayor que 45°C o por incubación de las perlas que llevan molde y las perlas magnéticas en una solución con un pH básico.
34. Un método para producir una población clonal de ácidos nucleicos, que comprende:
- 20 (a) proporcionar una pluralidad de moldes de ácido nucleico desde 50 a 800 bp de longitud, y perlas capaces de unirse con los moldes de ácido nucleico;
- (b) mezclas los moldes de ácido nucleico y las perlas en una solución biológica de reacción que contiene reactivos necesarios para amplificar los moldes de ácido nucleico:
- 25 (c) formar una emulsión para crear una pluralidad de microrreactores que comprenden los moldes de ácido nucleico, perlas y solución biológica de reacción, en el que al menos uno de los microrreactores comprende un molde único de ácido nucleico y una sola perla encapsulados en la solución biológica de reacción, en el que los microrreactores están contenidos en el mismo recipiente.
35. El método de la realización 34, que comprende, además, transcribir y traducir los ácidos nucleicos para generar al menos 10.000 copias de un producto de expresión.
- 30 36. El método de la realización 35, en el que dicho producto de expresión está unido a dichas perlas por un par de unión seleccionado entre el grupo que consiste en pares de unión de antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, his6X/níquel-ácido nitrilotriacético, y FLAG tag/FLAG anticuerpo
37. El método de la realización 35 en el que el método produce una población clonal de proteínas
38. El método de la realización 37, en el que las proteínas están seleccionadas entre el grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos obtenidos por ingeniería.
- 35 39. Una emulsión que comprende una pluralidad de microrreactores termoestables, en la que los microrreactores tienen 50 a 200 µm de diámetro y comprenden una solución biológica de reacción
40. La emulsión de la realización 39, en la que la solución biológica de reacción comprende reactivos para llevar a cabo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.
- 40 41. La emulsión de la realización 39, en la que la solución de reacción biológica comprende reactivos para llevar a cabo reacciones copuladas de transcripción y traducción.
42. La emulsión de la realización 40 ó la realización 41, en la que la pluralidad de microrreactores comprenden un molde de ácido nucleico.
43. La emulsión de la realización 42, en la que la pluralidad de microrreactores comprenden uno o menos moldes de ácido nucleico.
- 45 44. La emulsión de la realización 43, en la que la pluralidad de microrreactores comprende una o menos perlas que se unen con los moldes de ácido nucleico.

Listado de secuencias

- <110> Berka, Jan
 Chen, Yi-Ju
 Leamon, John H.
 5 Lefkowitz, Steve
 Lohman, Kenton
 Makhijani, Vinod
 Sarkis, Gary J.
 Rothberg, Jonathan
 10 Rothberg, Jonathan
 Weiner, Michael
 Srinivasan, Maithreyan
- <120> Amplificación de ácidos nucleicos en emulsión en perlas
- <130> 21465-508 UTIL
- 15 <150> US 60/443.471
 <151> 2003-01-29
- <150> US 60/465.071
 <151> 2003-04-23
- 20 <150> US 60/476.592
 <151> 2003-06-06
- <150> US 60/476.504
 <151> 2003-06-06
- <150> US 60/476.592
 <151> 2003-06-06
- 25 <150> US 60/476.602
 <151> 2003-06-06
- <150> US 60/497.985
 <151> 2003-08-25
- <160> 7
- 30 <170> PatentIn, versión 3,2
- <210> 1
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
- 35 <220>
 <223> oligonucleótido
- <400> 1
 gcttacctga cgcacctcg cctatcccct gttgcgtgtc 40
- 40 <210> 2
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
- <220>
 <223> oligonucleótido
- 45 <400> 2
 ccattcccca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgtc 40
- <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 3
 gcttacctga cgcacctctg 20

 5 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> oligonucleótido

 <400> 4
 ccattcccca gctcgtcttg 20

 <210> 5
 <211> 44
 15 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 5
 20 ccattcccca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgtc tcag 44

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 6
 ccatctgttc cctccctgtc 20

 <210> 7
 30 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 7
 35 cctatcccct gttgcgtgtc 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para enriquecer un amplicón, que comprende:

- 5 (a) distribuir una solución que comprende una pluralidad de perlas y una pluralidad de especies de moléculas de ácido nucleico de molde, en una pluralidad de gotitas de emulsión acuosa en una fase oleosa termoestable; en el que un primer subconjunto de las gotitas comprenden una o más de las perlas y una o más de las especies de ácido nucleico de molde encapsuladas en ellas, y un segundo subconjunto de las gotitas comprenden una o más de las perlas sin ninguna de las especies de moléculas de ácido nucleico de molde encapsuladas en ellas;
- 10 (b) amplificar las especies de moléculas de ácido nucleico de molde del primer subconjunto de gotitas, en el que una o más perlas del primer subconjunto de gotitas acuosas tienen un amplicón inmovilizado en ellas;
- (c) romper las gotitas de emulsión acuosa para liberar las perlas del primer y el segundo subconjuntos;
- (d) hibridar con el amplicón inmovilizado en las perlas un cebador que es complementario del extremo 3' del amplicón; y o bien:
- 15 (e)(i) formar un complejo de perla con amplicón inmovilizado y perla de enriquecimiento, en el que la perla de enriquecimiento y el cebador hibridado forman un par de captura-diana, y en el que las perlas de enriquecimiento pueden ser aisladas bajo una condición selectiva; y
- (f)(i) aplicar la condición selectiva para aislar el complejo de perla con amplicón inmovilizado y perla de enriquecimiento, desde las perlas que no tienen amplicón unido; o bien
- 20 (e)(ii) exponer las perlas con amplicón inmovilizado a una o más superficies de unión que comprenden restos de captura, cuyos restos de captura forman pares de captura-diana con el cebador hibridado de las perlas con amplicón inmovilizado, y separar las perlas con amplicón inmovilizado desde las perlas que no tienen amplicón unido.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la solución comprende una razón del número de las moléculas de ácido nucleico de molde al número de las perlas, menor que 1
- 25 3. El método según la reivindicación 1, en el que la solución comprende, además, una mezcla suficiente de reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de las especies de moléculas de ácido nucleico de molde.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificación emplea un procedimiento de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa.
- 30 5. El método según la reivindicación 1, en el que el cebador complementario del extremo 3' del amplicón de la etapa (d) tiene, al menos, 15 bases.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende las etapas (e)(i) y (f)(i) y en el que la condición selectiva comprende un campo magnético que permite aislar una o más de las perlas de enriquecimiento desde las perlas del segundo subconjunto.
- 35 7. El método según la reivindicación 1, que comprende, además, determinar una composición de ácido nucleico para la una o más especies de moléculas de ácido nucleico de molde.
8. El método según la reivindicación 1, que comprende, además, reciclar y reutilizar las perlas del segundo subconjunto.
9. El método según la reivindicación 1, en el que el cebador complementario del extremo 3' del amplicón de la etapa (d), es un cebador biotinilado que en la etapa (e)(i) o en la etapa (e)(ii) está inmovilizado por un resto de estreptavidina formando un par de biotina-estreptavidina, de captura-diana.
- 40 10. El método según la reivindicación 1, que comprende, además, extender el cebador hibridado con el extremo 3' del amplicón de la etapa (d) por adición de DNA polimerasa y de los cuatro desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) naturales a la mezcla de perlas, en el que la extensión intensifica la unión entre el cebador y el amplicón inmovilizado en la perla.
- 45 11. El método según la reivindicación 1, en el que la reivindicación 1 comprende la etapa (c)(ii) y en el que el método comprende, además: verter las perlas del primer y segundo subconjuntos que existen en una solución, sobre la una o más superficies de unión, en el que las perlas del segundo subconjunto permanecen en la solución

12. El método según la reivindicación 1, en el que la reivindicación 1 comprende las etapas (e)(i) y (f)(i) y en el que el método comprende, además: separar el cebador desde el amplicón inmovilizado en la perla para separar las perlas de enriquecimiento desde las perlas con amplicón inmovilizado.

FIG. 1

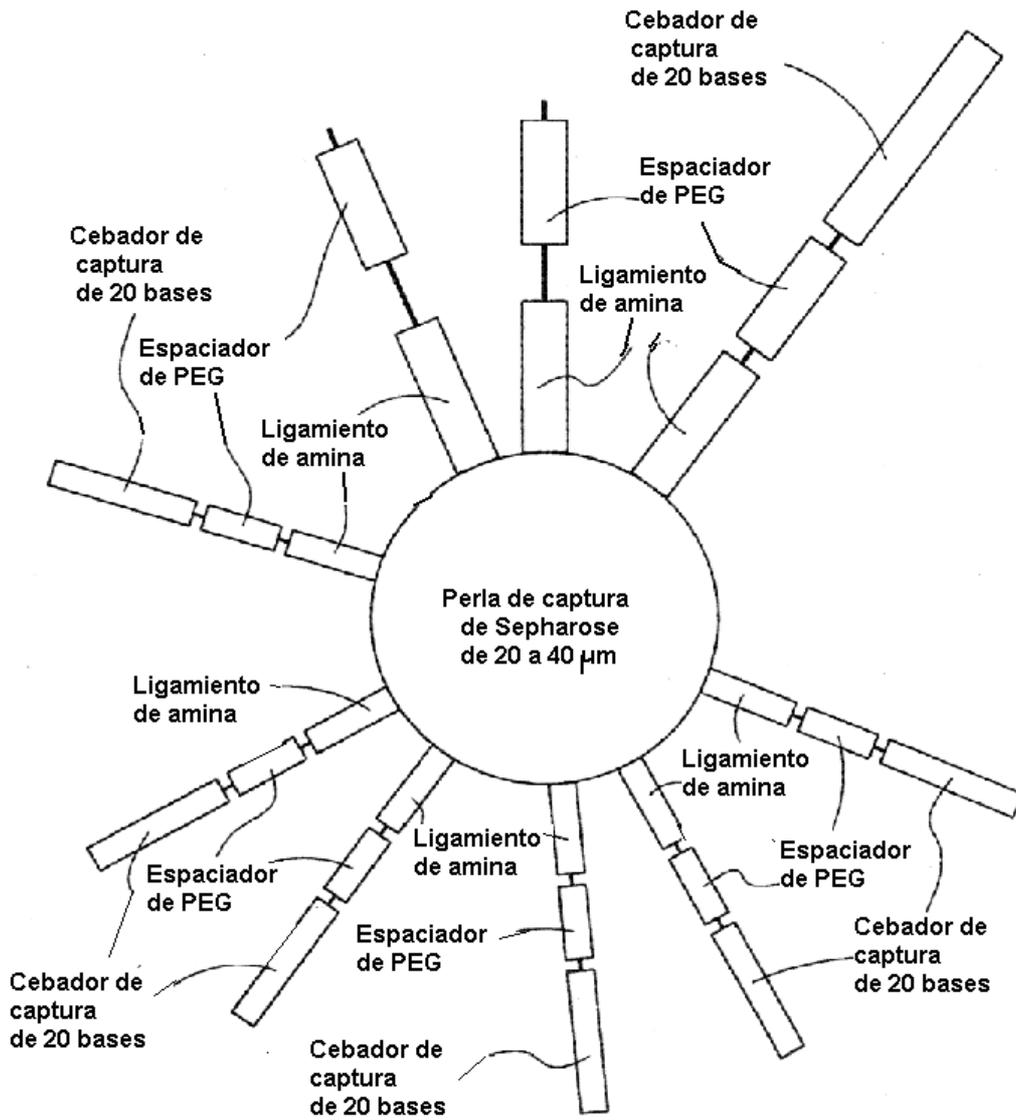


FIG. 2A

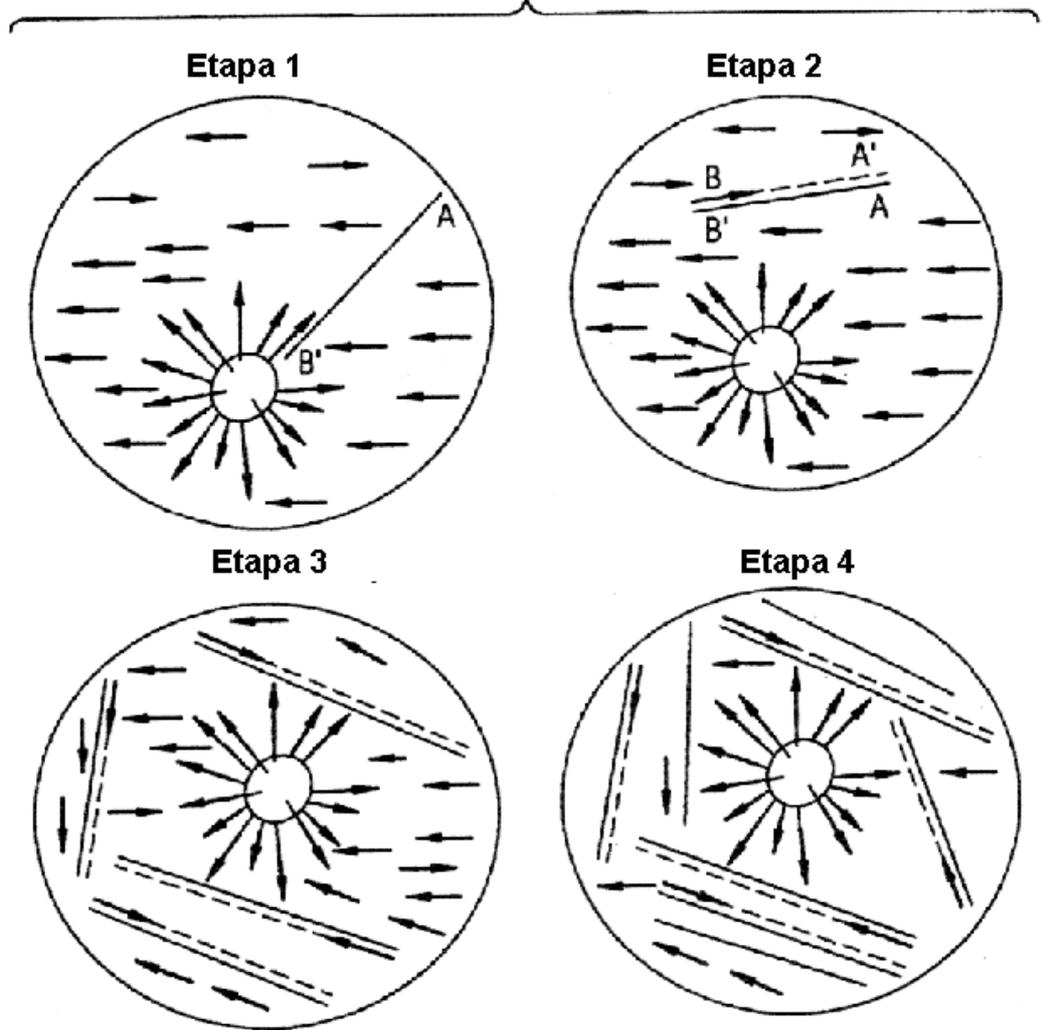


FIG. 2B

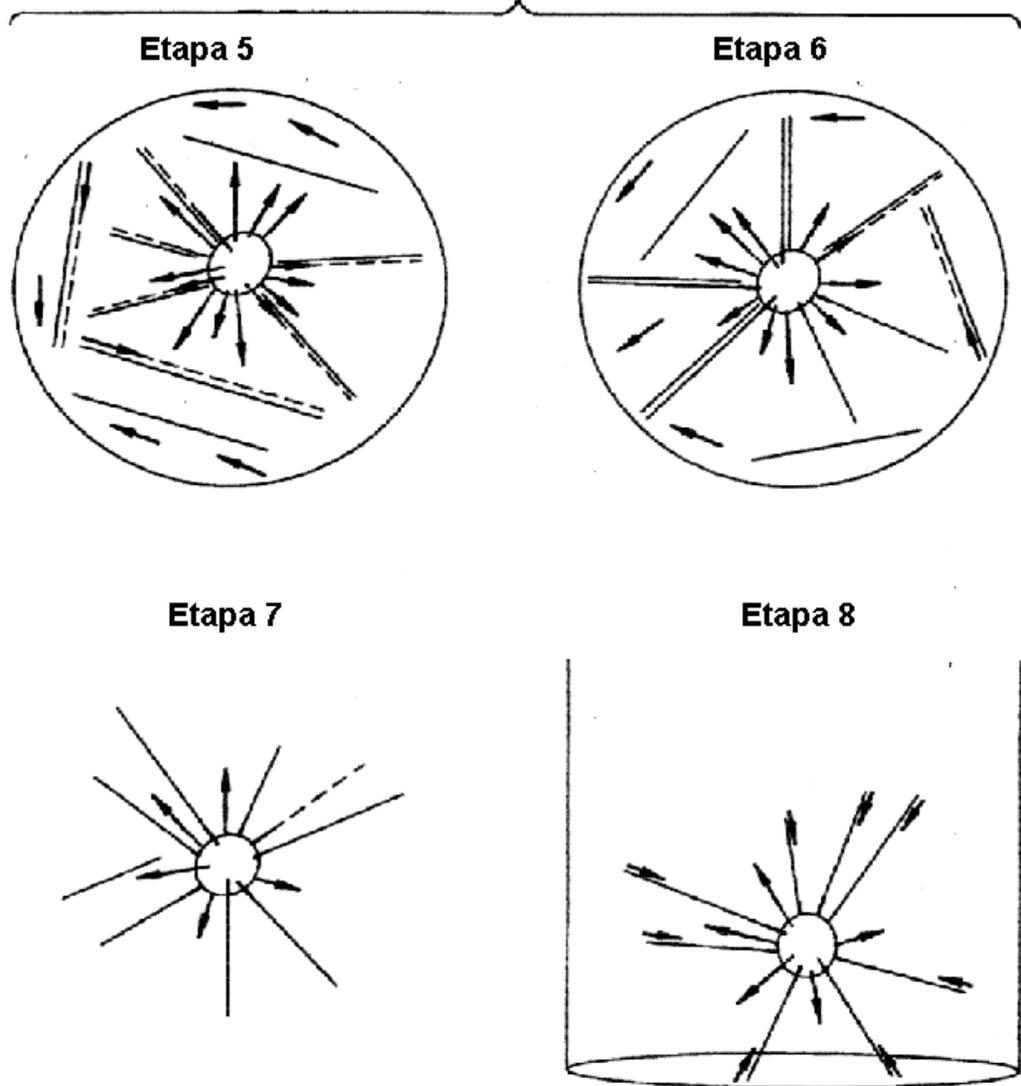


FIG. 3

Diagrama de flujo del procedimiento de separación de perlas

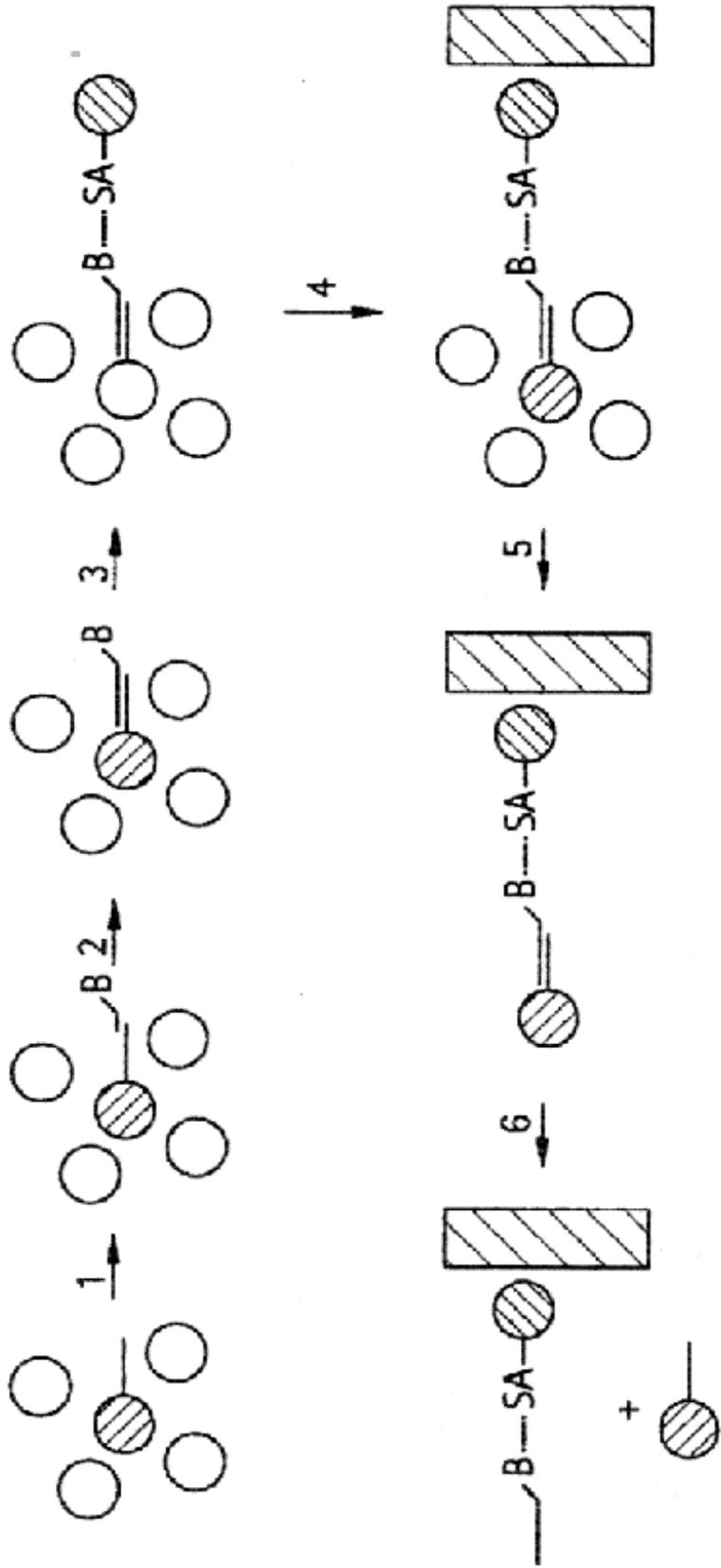


FIG. 4

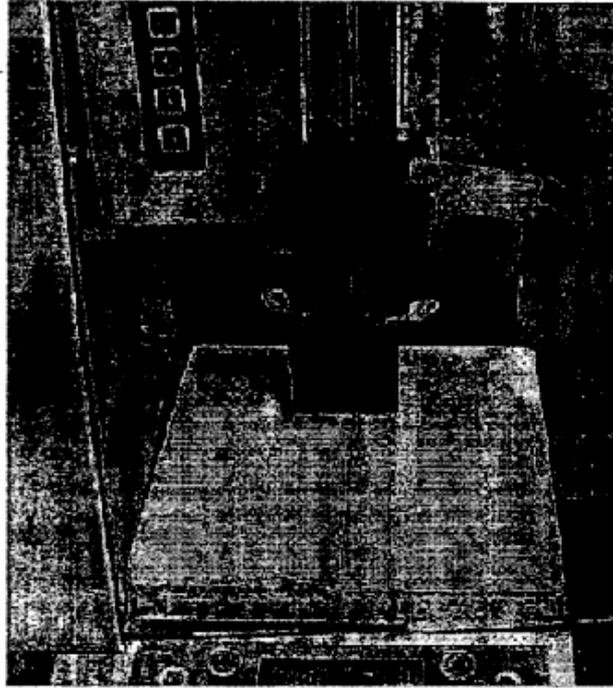


FIG. 5



FIG. 6



FIG. 7



FIG. 8A



FIG. 8B

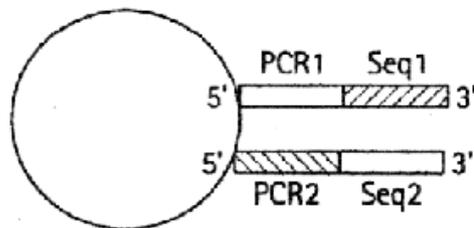


FIG. 8C

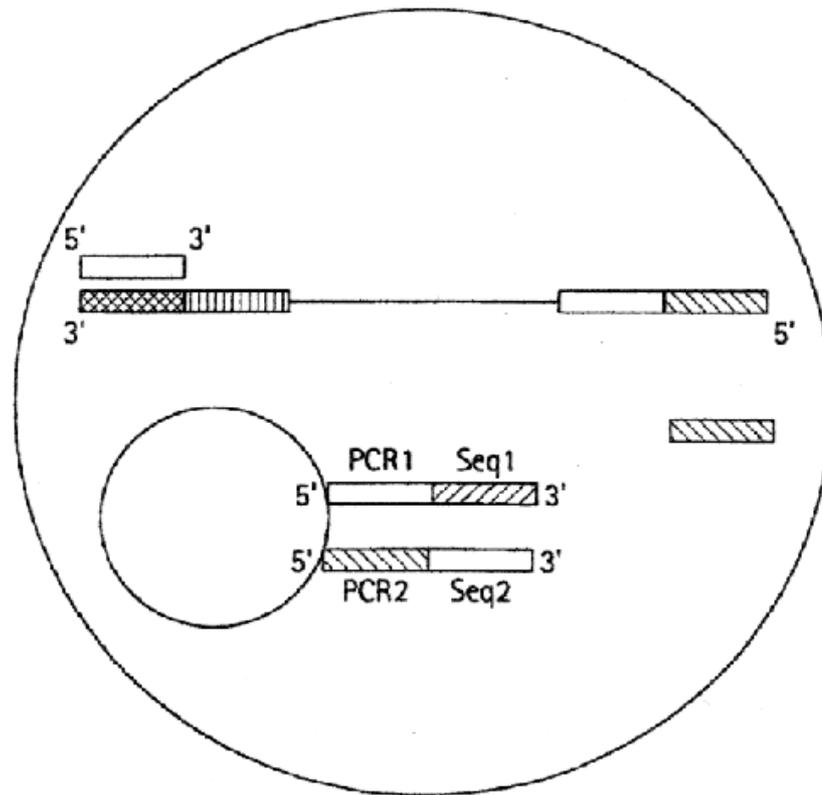


FIG. 9

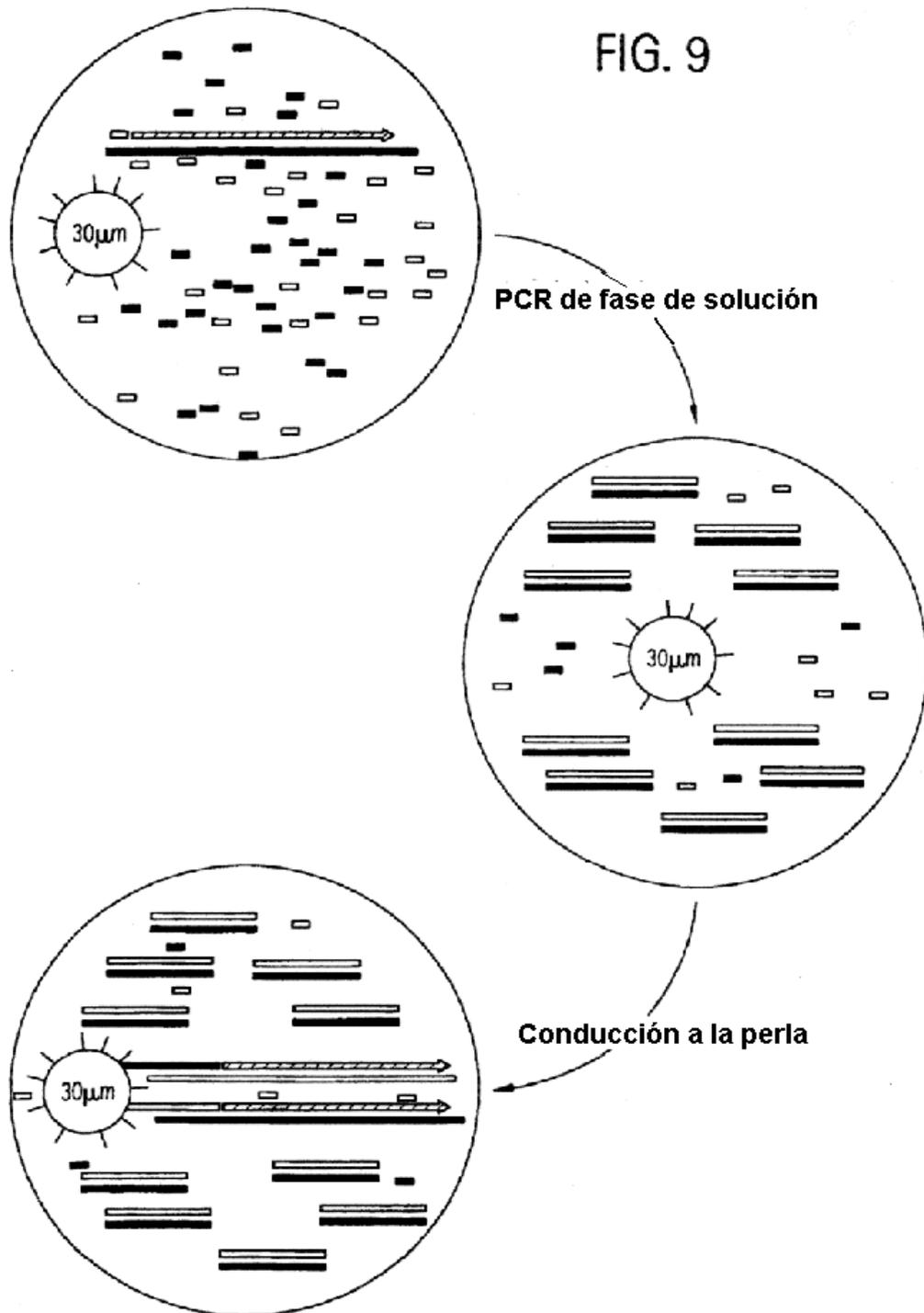
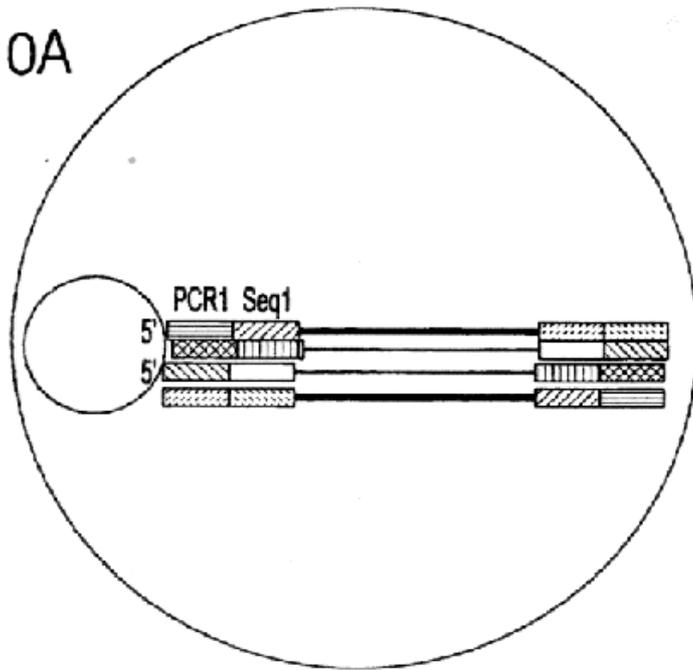
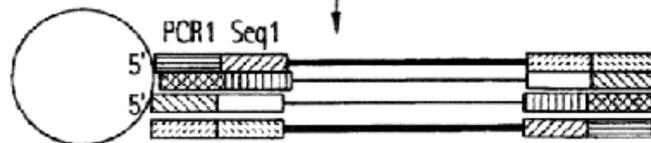


FIG. 10A



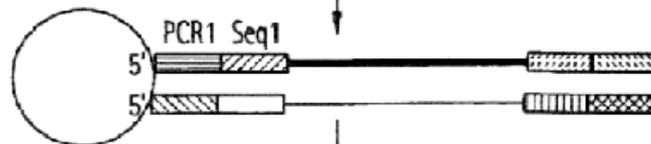
Rotura de la emulsión

FIG. 10B



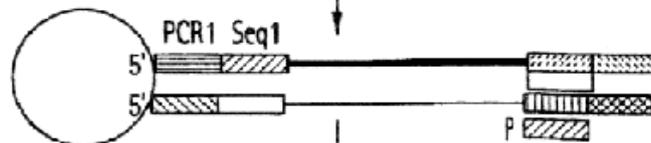
Separación de la 2ª cadena
y enriquecimiento

FIG. 10C



Hibridación de cebadores de secuenciación

FIG. 10D



Secuenciación del primer segmento

FIG. 10E

