

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 040**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

B01F 3/08 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2005 E 05712801 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1735458**

54 Título: **Amplificación de ácido nucleico con emulsión de flujo continuo**

30 Prioridad:

28.01.2004 US 540016 P

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

29.11.2013

73 Titular/es:

**454 LIFE SCIENCES CORPORATION (100.0%)
20 Commercial Street
Branford CT 06405, US**

72 Inventor/es:

**NOBILE, JOHN R.;
LEE, WILLIAM y
LEAMON, JOHN H.**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 432 040 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 ácido nucleico con emulsión de flujo continuo

5 CAMPO DE LA INVENCION

Realizaciones de la presente invención se refieren a métodos y a sistemas para PCR de flujo continuo usando emulsión y soporte sólido para inmovilizar ácidos nucleicos amplificados.

10 ANTECEDENTES

15 La capacidad para amplificar una pluralidad de secuencias de ácido nucleico, tales como una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc, es crítica dados los métodos actuales de secuenciación. Las tecnologías de secuenciación actuales requieren millones de copias de ácido nucleico por reacción de secuenciación, por tanto, se necesita la amplificación del ADN inicial antes de la secuenciación genómica. Además, la secuenciación de un genoma humano requeriría decenas de millones de reacciones de secuenciación diferentes.

20 Las técnicas y los sistemas actuales para la amplificación de genoma *in vitro* implican protocolos de clonación y cultivo laboriosos que han limitado la utilidad de la secuenciación genómica. Otras técnicas, tales como PCR, aunque son rápidas y fiables, no pueden amplificar una mezcla de fragmentos diferentes de ADN de un genoma, de una manera representativa y clonal.

25 Aunque la PCR con cebado al azar puede diseñarse fácilmente mediante ingeniería para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos en una reacción, este método no se prefiere porque el producto amplificado será una mezcla de diferentes fragmentos de ADN a partir de la biblioteca. Además, en un entorno de PCR al azar a partir de una pluralidad de fragmentos, algunas secuencias de ADN se amplifican de manera preferencial a expensas de otras secuencias de manera que el producto amplificado no representa el material de partida. Este problema con la PCR puede superarse si cada miembro individual de una biblioteca se amplifica en una reacción separada.

30 Sin embargo, este enfoque puede no ser práctico si se requieren muchos miles de tubos de reacción separados para el procedimiento de amplificación, ya que una biblioteca genómica o biblioteca de ADNc puede incluir más de 1.000.000 fragmentos. La amplificación individual de cada fragmento de estas bibliotecas en tubos de reacción convencionales separados no resulta práctica.

35 Chiou *et al.* ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 73, n.º 9, 1 de mayo de 2001 (01-05-2001), páginas 2018-2021, da a conocer una máquina de PCR mediante termociclado en ciclo cerrado.

40 Schneegass *et al.* Lab on a Chip, Royal Society of Chemistry vol. 1, n.º 1, septiembre de 2001 (09-2001) se refiere a PCR de flujo a través miniaturizada con diferentes tipos de molde en un termociclador en chip de silicio.

45 El documento WO 2004/083443 se refiere a la amplificación en sistemas de alto rendimiento con el fin de detectar moléculas poco frecuentes en muestras complejas de las que se obtienen alícuotas para dar mezclas de reacción con un número de copias bajo.

Dressman *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 22 JUL 2003, vol. 100, n.º 15, 22 de julio de 2003 (22-07-2003), páginas 8817-8822, se refiere a transformar moléculas de ADN individuales en partículas magnéticas fluorescentes para la detección y enumeración de variaciones genéticas.

50 Schneegas y Köhler, 2001, págs. 101-121 proporcionan una revisión de PCR de flujo a través en termocicladores en chip.

55 El documento US2002/0119459 da a conocer microcápsulas formadas mediante emulsificación de agua en aceite, en las que los microrreactores contienen los reactivos requeridos para la amplificación de ácido nucleico, y un medio de creación de una emulsión.

El documento US6310354 describe métodos de amplificación de ácido nucleico usando micropartículas en fase sólida para medir de manera cuantitativa reacciones de amplificación de ácido nucleico.

60 El documento US2002/0168279 da a conocer una bomba de jeringa que puede dispensar pequeños volúmenes de líquidos en la que se usan medios electrostáticos para desprender la gotita expulsada.

El documento US2002/0001675 describe un dispensador piezoeléctrico para formar gotitas que comprende un constrictor piezoeléctrico dispuesto alrededor de un tubo capilar que tiene una boquilla.

65

SUMARIO DE LA INVENCION

- La presente invención proporciona métodos y sistemas para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, cada secuencia de una biblioteca de ADN, transcriptoma o genoma) de una manera rápida y económica usando un medio para encapsular una pluralidad de muestras de ADN de manera eficaz individualmente en una microcápsula de una emulsión (es decir, un "microrreactor"), realizando la amplificación de la pluralidad de muestras de ácido nucleico encapsuladas simultáneamente, y liberando la pluralidad amplificada de ADN de las microcápsulas para reacciones posteriores.
- Por consiguiente, en una realización de la invención se proporciona un método para amplificar un material genético que comprende:
- (i) emulsionar un fluido acuoso que comprende una mezcla de reacción de PCR y una pluralidad de perlas suspendidas en un flujo continuo de aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos encapsulados en un flujo continuo de aceite,
- en el que una pluralidad de los microrreactores incluyen cada uno una o más especies de molde de ácido nucleico y una perla individual que puede capturar un molde de ácido nucleico y reactivos suficientes para amplificar el número de copias de una o más especies del molde de ácido nucleico,
- y en el que emulsionar comprende bombear un aceite de emulsión y el fluido que comprende la mezcla de reacción de PCR y las perlas suspendidas al interior de un emulsificador de flujo cruzado que comprende uno o más elementos en T de inyección (mezclado) y un dispositivo vibratorio antiobstrucción para evitar que las perlas obstruyan una boquilla del uno o más elementos en T de inyección; y
- (ii) procesar térmicamente la emulsión que comprende la pluralidad de microrreactores acuosos haciéndola fluir a través de zonas estacionarias de temperatura controlada para amplificar la una o más especies de molde de ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa, en el que la perla individual captura las copias amplificadas de la una o más especies de molde de ácido nucleico; y
- (iii) romper la emulsión para recuperar las perlas y los moldes de ácido nucleico amplificados capturados.
- En otra realización de la presente invención, se proporciona un aparato para amplificar material genético que comprende:
- al menos un dispositivo de suministro de fluido;
- al menos una zona de primera temperatura para someter a ciclado una pluralidad de microrreactores acuosos que incluyen cada uno una o más especies de moldes de ácido nucleico hasta una primera temperatura;
- al menos una zona de segunda temperatura para someter a ciclado la pluralidad de microrreactores acuosos hasta una segunda temperatura inferior a la primera temperatura;
- un primer conducto para hacer fluir al menos una corriente continua de aceite en el mismo desde un primer depósito;
- un segundo conducto para hacer fluir al menos una disolución de PCR a base de agua que incluye moldes de ácido nucleico, una pluralidad de perlas que pueden capturar un molde de ácido nucleico y reactivo de PCR desde un segundo depósito;
- un emulsificador de flujo cruzado que comprende un orificio para el suministro de la disolución de PCR a base de agua desde el segundo conducto al interior del primer conducto para crear una emulsión de agua en aceite en un flujo continuo, en el que el emulsificador de flujo cruzado comprende uno o más elementos en T de inyección (mezclado) y un dispositivo vibratorio antiobstrucción para evitar que las perlas obstruyan una boquilla del uno o más elementos en T de inyección, y en el que la emulsión de agua en aceite comprende una pluralidad de gotitas que comprenden los microrreactores para realizar reacciones en cadena de la polimerasa, y en el que una pluralidad de los microrreactores incluyen cada uno una o más especies de molde de ácido nucleico y una perla individual que puede capturar un molde de ácido nucleico.
- El aparato de emulsificación de flujo cruzado puede comprender una primera entrada para recibir un flujo de aceite desde el primer conducto, una salida para dirigir una emulsión de agua en aceite fuera del aparato, una segunda entrada para recibir una mezcla de reacción de amplificación por PCR a base de agua desde el segundo conducto y el orificio para suministrar la mezcla de reacción de PCR desde el segundo conducto al interior del primer conducto, para formar una pluralidad de gotitas de agua en aceite que comprenden microrreactores. Una pluralidad de los microrreactores incluyen cada uno uno o más moldes de ácido nucleico y mezcla de reacción de amplificación por PCR suficiente para producir una pluralidad de copias de molde de ácido nucleico.

5 El aparato para amplificar material genético puede incluir una emulsión de agua en aceite en un flujo continuo en el que la emulsión comprende una pluralidad de gotitas de agua que comprenden microrreactores. Una pluralidad de los microrreactores pueden incluir una perla individual que puede capturar uno o más moldes de ácido nucleico, y reactivos suficientes para amplificar el número de copias del uno o más moldes de ácido nucleico. Las zonas de primera y segunda temperatura del aparato proporcionan medios para procesar térmicamente la emulsión para amplificar moldes de ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa.

10 También se describe en el presente documento un generador de emulsión que incluye un suministro de aceite de emulsión, al menos una jeringa que incluye un cuerpo y un émbolo para dispensar una mezcla para emulsionar al interior del aceite de emulsión, un dispositivo de emulsificación de flujo cruzado para emulsionar la mezcla, incluyendo el dispositivo una entrada fijada a la salida de la jeringa, una bomba de jeringa que incluye un accionador que puede hacer oscilar el émbolo de la al menos una jeringa distancias micrométricas a una frecuencia predeterminada a lo largo de una longitud de recorrido del émbolo dentro del cuerpo de jeringa de la al menos una jeringa.

20 También se describe en el presente documento un método para reducir sustancialmente la obstrucción de una boquilla en una bomba de jeringa, que incluye proporcionar una bomba de jeringa que tiene al menos una jeringa que incluye un cuerpo, un émbolo que tiene un eje de émbolo y una boquilla de salida, el cuerpo para dispensar una mezcla de partículas de un micrómetro o menos de tamaño suspendidas en un medio, y hacer oscilar el émbolo de la jeringa a lo largo del eje del émbolo distancias micrométricas a una frecuencia predeterminada a lo largo de una longitud de recorrido del émbolo dentro del cuerpo de jeringa.

25 También se describe en el presente documento un generador de emulsión que incluye un suministro de aceite de emulsión, al menos una jeringa que incluye un cuerpo y un émbolo para dispensar una mezcla para emulsionar al interior del aceite de emulsión, un elemento de mezclado magnéticamente atrayente dispuesto en el cuerpo de la jeringa, un dispositivo de emulsificación de flujo cruzado para emulsionar la mezcla, incluyendo el dispositivo una entrada fijada a la salida de la jeringa y un dispositivo que puede mover una fuerza magnética externa axialmente a lo largo del cuerpo de la jeringa mientras está en estrecha proximidad al cuerpo de jeringa.

30 También se describe en el presente documento un generador de emulsión que incluye un suministro de aceite de emulsión, al menos una jeringa que incluye un cuerpo y un émbolo para dispensar una mezcla para emulsionar al interior del aceite de emulsión, un elemento de mezclado magnéticamente atrayente dispuesto en el cuerpo de la jeringa, un dispositivo de emulsificación de flujo cruzado para emulsionar la mezcla, incluyendo el dispositivo una entrada fijada a la salida de la jeringa y un tambor giratorio que tiene un imán enrollado helicoidalmente a lo largo de la superficie del tambor. La superficie del tambor está situada adyacente al cuerpo de la jeringa.

40 También se describe en el presente documento una bomba de jeringa que incluye un área para recibir al menos una jeringa, en la que la jeringa incluye un cuerpo y un émbolo que tiene un eje de émbolo. La jeringa puede usarse para dispensar una mezcla para emulsificación al interior de un aceite de emulsión. La bomba de jeringa también puede incluir un accionador que puede hacer oscilar el émbolo de la al menos una jeringa a lo largo del eje de émbolo distancias micrométricas a una frecuencia predeterminada a lo largo de una longitud de recorrido del émbolo dentro del cuerpo de la al menos una jeringa. Alternativamente, la bomba de jeringa también puede incluir un elemento de mezclado magnéticamente atrayente dispuesto en el cuerpo de la jeringa y un tambor giratorio que tiene un imán enrollado helicoidalmente a lo largo de la superficie del tambor, en la que la superficie del tambor está situada adyacente al cuerpo de la jeringa.

50 Otros objetivos, ventajas, características y beneficios de la invención y la descripción resultarán más fácilmente evidentes mediante referencia a los dibujos adjuntos y a la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La figura 1 es un diagrama de bloques de sistema de un sistema para un sistema de amplificación por PCR según una de las realizaciones de la presente invención.

La figura 2 es un esquema de un sistema de emulsificación lineal según una realización de la presente invención para crear un flujo de emulsión.

60 La figura 3 ilustra una representación de perlas (véanse las flechas) suspendidas en microrreactores individuales según algunas realizaciones de la invención.

La figura 4 es un esquema de un aparato emulsificador lineal según una realización de la presente invención.

65 La figura 5A es una vista frontal de un elemento en T de mezclado para un aparato de emulsificación lineal según una realización de la presente invención.

La figura 5B es una vista lateral del elemento en T de mezclado de la figura 5A.

La figura 5C es una vista en sección transversal del elemento en T de mezclado de la figura 5A.

La figura 5D es una sección transversal ampliada del detalle del área de boquilla del elemento en T de mezclado de la figura 5A.

La figura 5E es una vista en perspectiva aumentada del área de mezclado del elemento en T de mezclado de la figura 5A.

La figura 5F es una vista en perspectiva aumentada de un diseño alternativo del área de mezclado del elemento en T de la figura 5A.

La figura 6A es una primera vista en perspectiva lateral de un conjunto de bomba de jeringa según una realización de la presente invención.

La figura 6B es una vista en perspectiva desde abajo del conjunto de bomba de jeringa de la figura 6A.

La figura 6C es una vista en perspectiva desde atrás del conjunto de bomba de jeringa de la figura 6A.

La figura 6D es una segunda vista en perspectiva lateral del conjunto de bomba de jeringa de la figura 6A.

La figura 6E es una tercera vista en perspectiva lateral del conjunto de bomba de jeringa de la figura 6A.

La figura 8A es un esquema de otro ejemplo de un sistema de ciclado/procesamiento térmico de flujo continuo según otra realización de la invención.

La figura 8B es una vista en perspectiva en despiece ordenado del sistema de procesamiento térmico de la figura 7A.

La figura 8C es una vista en perspectiva ensamblada del sistema de procesamiento térmico de la figura 7B.

La figura 7A es un esquema de un sistema de procesamiento térmico circular.

La figura 7B es una vista en perspectiva del sistema de procesamiento térmico circular de la figura 8A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Breve resumen de la amplificación en emulsión de perlas

La amplificación en emulsión de perlas puede realizarse fijando un molde (por ejemplo, molde de ADN) que va a amplificarse a un soporte sólido, preferiblemente en forma de una perla generalmente esférica. La perla se une a un gran número de una especie de cebador individual que es complementaria a una región del ADN molde y las copias de amplificación de este molde. Alternativamente, la perla se une a grupos químicos (por ejemplo, biotina) que pueden unirse a grupos químicos (por ejemplo, estreptavidina) incluidos en el ADN molde y copias de amplificación de este molde. Véase el documento WO2004069849.

Las perlas se suspenden en mezcla de reacción acuosa y después se encapsulan en una emulsión de agua en aceite. El ADN molde puede unirse a la perla antes de la emulsificación, o el ADN molde se incluye en disolución en la mezcla de reacción de amplificación.

La emulsión puede estar compuesta por microgotitas en fase acuosa diferenciadas (es decir, microrreactores, véase anteriormente), por ejemplo, que tienen un promedio de aproximadamente 60 a 200 μm de diámetro, encerradas por una fase de aceite termoestable. Cada microrreactor contiene, preferiblemente, suficiente disolución de reacción de amplificación por PCR (es decir, los reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico).

Es decir, una mezcla de reacción de PCR (polimerasa, sales, dNTP, que también puede incluir preferiblemente un par de cebadores de PCR (cebador A y cebador B).

El ADN molde se incluye en la mezcla de reacción. Un subconjunto de la población de microrreactores incluye preferiblemente microrreactores que tienen una perla de ADN individual preferiblemente con un molde de ácido nucleico fijado. Este subconjunto de microrreactores es la base para la amplificación.

Los microrreactores restantes que no contienen ADN molde no participarán en la amplificación.

Los cebadores de PCR y amplificación por PCR pueden estar presentes en una razón asimétrica tal como de 8:1 ó 16:1 (es decir, 8 ó 16 de un cebador con respecto a 1 del segundo cebador) para realizar una PCR asimétrica. La especie de cebador que puede usarse al nivel de concentración inferior es la misma especie de cebador que puede inmovilizarse sobre la perla. Esto aumentará la probabilidad de que una copia amplificada del ADN molde se aparee a la perla. La razón de cebadores de PCR también puede ser sustancialmente igual para una PCR normal. La reacción de amplificación por PCR puede realizarse usando cualquier método adecuado.

Tras la PCR, pueden recuperarse las perlas que contienen el ADN amplificado inmovilizado. La emulsión puede romperse para recuperar las perlas. El producto inmovilizado puede convertirse en monocatenario mediante desnaturalización (mediante calor, pH, etc.) que elimina la cadena A complementaria. Los cebadores A se aparean a la región A' de la cadena inmovilizada, y las perlas que contienen las cadenas inmovilizadas se cargan con enzimas de secuenciación, y cualquier proteína auxiliar necesaria. Entonces se secuencian las perlas usando técnicas de pirofosfato reconocidas (descritas, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

Diseño del molde

En una realización preferida, el molde de ácido nucleico que va a amplificarse mediante amplificación en emulsión de perlas es una población de ADN tal como, por ejemplo, una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADNc. Se prefiere que cada miembro de la población de ADN tenga una secuencia de ácido nucleico común en el primer extremo y una secuencia de ácido nucleico común en un segundo extremo. Esto puede lograrse, por ejemplo, ligando una primera secuencia de ADN adaptador a un extremo y una segunda secuencia de ADN adaptador a un segundo extremo de cada miembro de la población de ADN. El molde de ácido nucleico puede ser de cualquier tamaño que puede someterse a amplificación *in vitro* (incluyendo las técnicas de amplificación preferidas de PCR y PCR asimétrica). En una realización preferida, el molde tiene aproximadamente de 150 a 750 pb de tamaño, tal como, por ejemplo aproximadamente 250 pb de tamaño.

Unión de molde de ácido nucleico a perlas de captura

Puede fijarse un molde de ácido nucleico monocatenario que va a amplificarse a una perla de captura. También pueden fijarse las copias de amplificación del molde de ácido nucleico a una perla de captura. Como ejemplos no limitativos, estas fijaciones pueden estar mediadas por grupos químicos u oligonucleótidos que están unidos a la superficie de la perla. El ácido nucleico (por ejemplo, el molde de ácido nucleico, copias de amplificación u oligonucleótidos) puede fijarse al soporte sólido (por ejemplo, una perla de captura) de cualquier manera conocida en la técnica.

La fijación química covalente de un ácido nucleico a la perla puede lograrse usando agentes de acoplamiento convencionales. Por ejemplo, puede usarse carbodiimida soluble en agua para unir el 5'-fosfato de una secuencia de ADN a perlas de captura recubiertas con amina mediante un enlace fosfoamidato. Alternativamente, pueden acoplarse oligonucleótidos específicos a la perla usando química similar, y después puede usarse ADN ligasa para ligar el molde de ADN al oligonucleótido sobre la perla. Otras químicas de enlace para unir el oligonucleótido a las perlas incluyen el uso de N-hidroxisuccinamida (NHS) y sus derivados, por ejemplo.

En un método a modo de ejemplo, un extremo de un ligador 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 ligador contiene un segundo grupo reactivo que puede unirse al oligonucleótido que va a inmovilizarse. El oligonucleótido puede unirse a la perla de captura de ADN mediante enlace covalente. Sin embargo, también pueden usarse enlaces no covalentes, tales como complejos antígeno-anticuerpo o de quelación, para unir el oligonucleótido a la perla.

Como ejemplos no limitativos, pueden emplearse oligonucleótidos que se hibridan específicamente con secuencias únicas en el extremo del fragmento de ADN, tales como el extremo solapante de un sitio de enzima de restricción o los "extremos cohesivos" de vectores de clonación, pero también pueden usarse ligadores de extremos romos. Estos métodos se describen en detalle en el documento US 5.674.743. Se prefiere que las perlas sigan estando unidas al oligonucleótido inmovilizado a lo largo de las etapas en los métodos de la invención.

Cada perla de captura se diseña preferiblemente para tener una pluralidad de oligonucleótidos que reconocen (es decir, son complementarios a) una parte del molde nucleico, y las copias de amplificación de este molde. Se prefiere que cualquier perla de captura contenga sólo una única especie de ácido nucleico.

Las perlas usadas en el presente documento pueden tener cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de varios materiales conocidos. Los ejemplos de tales materiales incluyen: materiales inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los ejemplos específicos de estos materiales incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similares (tal como se describe, por ejemplo, en Merrifield, *Biochemistry* 1964, 3, 1385-1390), poliácridamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicio, plásticos, nitrocelulosa,

esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poro de control, metales, dextranos reticulados (por ejemplo, Sephadex™), gel 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 aproximadamente 2 a 100 µm de diámetro, o de 10 a 80 µm en diámetro, lo más preferiblemente de 20 a 40 µm de diámetro. En una realización preferida, las perlas de captura son perlas de Sepharose.

Emulsificación

Pueden suspenderse perlas de captura con o sin molde de ácido nucleico fijado en una emulsión de agua en aceite estable al calor. Además, puede ajustarse el tamaño de los microrreactores haciendo variar la velocidad y el caudal de los componentes. Adicionalmente, también puede variarse el tamaño de gotita cambiando la viscosidad del aceite de emulsión, y también usando diferentes tamaños de orificio en la parte de generación de emulsión de flujo cruzado.

Se hace referencia a diversas emulsiones que son adecuadas para reacciones biológicas en Griffiths y Tawfik, EMBO, 22, págs. 24-35 (2003); Ghadessy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, págs. 4552-4557 (2001); la patente estadounidense n.º 6.489.103 y el documento WO 02/22869.

Se observa que Griffiths *et al.* (patente estadounidense n.º 6.489.103 y documento WO 99/02671) se refieren a un método para clasificar *in vitro* uno o más elementos genéticos que codifican para productos génicos que tienen una actividad deseada. Este método implica compartimentalizar un gen, expresar el gen y clasificar el gen compartimentalizado basándose en el producto expresado. Al contrario que la presente invención, el método de clasificación microencapsulado de Griffith no es adecuado para el análisis paralelo de múltiples microcápsulas/microrreactores porque su producto de ácido nucleico no está anclado y no puede anclarse. Dado que los ácidos nucleicos de Griffiths no están anclados, se mezclarán entre sí durante la demulsificación.

La emulsión se genera preferiblemente añadiendo perlas a una disolución de amplificación. Tal como se usa en el presente documento, el término "disolución de amplificación" significa la mezcla suficiente de reactivos que es necesaria para realizar la amplificación de ADN molde. En los siguientes ejemplos se proporciona un ejemplo de una disolución de amplificación, una disolución de amplificación por PCR. Se apreciará que pueden realizarse diversas modificaciones a la disolución de amplificación basándose en el tipo de amplificación que está realizándose y en si el ADN molde está fijado a las perlas o se proporciona en disolución. El aceite usado puede complementarse con uno o más estabilizantes de emulsión biocompatibles incluyendo Agrimer AL22 y otros estabilizantes adecuados reconocidos y disponibles comercialmente.

En aspectos preferidos, la emulsión es estable al calor para permitir el ciclado/procesamiento térmico, por ejemplo, hasta al menos 94°C, al menos 95°C o al menos 96°C. Preferiblemente, el tamaño de las gotitas formadas oscila entre aproximadamente 5 micrómetros y 500 micrómetros, más preferiblemente, entre aproximadamente 50 y 300 micrómetros y lo más preferiblemente entre aproximadamente 100 y 150 micrómetros. Ventajosamente, la generación de emulsión de flujo cruzado permite controlar la formación de gotitas y la uniformidad del tamaño de gotita.

Los microrreactores deben ser lo suficientemente grandes como para abarcar reactivos de amplificación suficientes para el grado de amplificación requerido. Sin embargo, los microrreactores deben ser lo suficientemente pequeños como para que pueda suministrarse un número suficiente de microrreactores, de hasta aproximadamente 20.000.000 o más, que contienen cada uno de manera eficaz un único miembro de una biblioteca de ADN, desde un número pequeño de jeringas disponibles convencionalmente que pueden ajustarse entre sí en una bomba de jeringa. Notablemente, el uso de microrreactores permite la amplificación de mezclas complejas de moldes (por ejemplo, muestras de ADN genómico o ARN celular completo) sin mezclado de secuencias entre sí, o dominio por uno o más moldes (por ejemplo, sesgo de selección de PCR; véase, Wagner *et al.*, 1994, Suzuki y Giovannoni, 1996; Chandler *et al.*, 1997, Polz y Cavanaugh, 1998).

Con las limitaciones descritas anteriormente, el tamaño óptimo de un microrreactor puede ser en promedio de 100 a 200 micrómetros de diámetro. Los microrreactores de este tamaño permitirán la amplificación de una biblioteca de ADN que comprende aproximadamente 18.000.000 miembros suministrada al generador de emulsión en un volumen de 9 ml contenido en tres jeringas de 3 ml.

Amplificación

Tras la encapsulación de la perla y la disolución de PCR y ADN molde en el microrreactor, el ácido nucleico molde puede amplificarse, mientras está fijado (preferiblemente) o no fijado a las perlas.

La amplificación de ADN se realiza mediante PCR. La PCR según la presente invención puede realizarse encapsulando el ácido nucleico diana con una disolución de PCR que comprende todos los reactivos necesarios para la PCR. Entonces, puede lograrse la PCR exponiendo la emulsión a cualquier régimen de procesamiento

térmico adecuado conocido en la técnica. En una realización preferida, se realizan de 30 a 60 ciclos, y de manera preferible aproximadamente 60 ciclos, de amplificación. Puede ser deseable, pero no es necesario, que tras el procedimiento de amplificación pueda haber uno o más ciclos de hibridación y extensión, que comprenden un tiempo de fusión similar pero un tiempo de extensión más largo, tras los ciclos de amplificación. De manera rutinaria, el ADN molde se amplifica hasta que se inmovilizan en cada perla normalmente al menos de dos millones a cincuenta millones de copias, preferiblemente de aproximadamente diez millones a treinta millones de copias del ADN molde.

El método de la invención emplea PCR de flujo continuo para amplificar el molde de ácido nucleico. Se han notificado diversos métodos de PCR de flujo continuo, por ejemplo, en Park *et al.*, 2003, Anal. Chem. 75:6029-6033; Curcio y Roeraade, 2003, Anal. Chem. 75:1-7; Chiou *et al.*, 2001, Anal. Chem. 73:2018-2021; patente estadounidense n.º 6.207.031; publicación de solicitud estadounidense 2001/0020588; Lagally *et al.*, 2001, Anal. Chem. 73:565-570; patentes estadounidenses n.ºs 6.361.671, 6.284.525, 6.132.580, 6.261.431, 6.045.676, 6.143.152, 5.939.312; publicación de solicitud estadounidense 2002/0068357; Schneegas *et al.*, 2001, Lab on a Chip 1:42-49; Kopp *et al.*, 1998, Science 280:1046-1049; Nakano *et al.*, 1994, Biosci. Biotech. Biochem. 58:349-352; y Larzul en la patente estadounidense n.º 5.176.203, todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia. Ventajosamente, la PCR de flujo continuo reduce enormemente los tiempos de manipulación de muestras y de reacción, mientras que aumenta la especificidad de amplificación. Sin embargo, sistemas de flujo anteriores usaron tapones en serie, es decir, tapones de reactivo que rellenan completamente el diámetro del tubo de flujo, que están separados por tapones completos similares de aire y aceite. En cambio, las realizaciones de la presente invención se refieren a la creación de una emulsión de agua en aceite usada junto con una PCR de flujo continuo. La emulsión de agua en aceite comprende microrreactores, lo que permite la amplificación clonal de una gran población de ácidos nucleicos. Los microrreactores son aproximadamente de 10 a 50 veces más pequeños que el diámetro del tubo de flujo de modo que un número muy grande de los mismos están presentes en la corriente de flujo. Por ejemplo, un tubo de flujo de 2 mm de diámetro puede llevar 2.000 microrreactores por cm de longitud.

Los métodos de PCR de flujo continuo de la invención pueden usarse para amplificar las secuencias de un transcriptoma o genoma completo en un único instrumento en menos de la mitad del tiempo requerido para el procesamiento térmico tradicional. El flujo continuo de la emulsión a través de un elemento de transferencia de calor en estado sólido permite un ciclo de reacción eficaz y rápido (por ejemplo, de 60 segundos). Una amplificación de 60 ciclos, por ejemplo, tardará 1 hora. En diversas realizaciones, puede diluirse el molde de ácido nucleico para obtener eficazmente una copia de molde suministrado por microrreactor, y un rendimiento final de 1.000.000 a 10.000.000 de copias de molde por perla.

Los métodos de flujo continuo de la invención pueden usarse con reacciones de amplificación térmica (por ejemplo, PCR).

Sistemas de amplificación

El método de la invención se realiza usando un sistema para la amplificación por PCR de flujo continuo. Este sistema incluye un medio para realizar una emulsión de una mezcla de reacción de amplificación en un aceite biocompatible estabilizado.

La figura 1 ilustra un diagrama de bloques general de un sistema de emulsificación 200, así como un procesador térmico 112 y un dispositivo de filtrado de perlas 114, según una realización de la presente invención. Tal como se muestra, se bombea un aceite de emulsión 102 mediante una bomba 104 al interior de un emulsificador de flujo cruzado 106. El emulsificador emulsiona una mezcla de reacción de PCR (que tiene una pluralidad de perlas) 108, que se suministra al emulsificador mediante una bomba 110, creando una pluralidad de microrreactores en el flujo de aceite de emulsión. Cada microrreactor incluye preferiblemente en promedio una perla individual y una especie individual eficaz de molde de ácido nucleico.

Entonces puede procesarse térmicamente la pluralidad de microrreactores mediante un procesador térmico 112 para amplificar el molde de ADN. Tras la amplificación, pueden separarse las perlas (que contienen cada una el ácido nucleico amplificado) mediante filtración del flujo de emulsión mediante un filtro de perlas 314, y a continuación procesarse para su posterior secuenciación.

La figura 2 ilustra un diagrama esquemático de un sistema de emulsificación 200 a modo de ejemplo. Tal como se muestra, se bombea un aceite de emulsión 202 desde un suministro de aceite de emulsión 204, a través de un filtro 206, mediante una bomba 208 a un emulsificador de flujo cruzado 210. El sistema puede controlarse mediante un controlador basado en microprocesador (no mostrado), que puede ser un ordenador personal (PC) u otro controlador o dispositivo controlador (por ejemplo, analógico). Por consiguiente, el controlador puede monitorizar la presión del flujo de aceite de emulsión mediante un sensor de presión 212, de modo que puede regularse el caudal del aceite y determinarse el estado general del sistema (por ejemplo, fallos de bomba, fugas). Preferiblemente, la bomba se controla con precisión (por ejemplo, electrónicamente) para mantener una velocidad exacta y constante (por ejemplo, de desde 1-10 ml/min., y preferiblemente de aproximadamente 3 ml/min.). Puede usarse un tubo de reducción de la presión 214 para atenuar las fluctuaciones de presión en el aceite provocadas por la bomba, antes

del primer emulsificador de flujo cruzado.

El aceite de emulsión se suministra al emulsificador de flujo cruzado 210 (véase también 106, figura 1). En esta realización particular, se hace fluir el aceite de emulsión a través de múltiples (en este caso, tres) elementos en T de inyección/mezclado 216 (aunque también puede usarse un único elemento en T de inyección o cualquier otro número). Cada elemento en T recibe una mezcla de PCR/perla desde una jeringa correspondiente 218. Puede usarse una bomba de jeringa 220 para impulsar el émbolo de cada jeringa a una tasa controlada para forzar la mezcla de PCR desde la jeringa al interior del elemento en T respectivo. Un elemento en T permite que una jeringa respectiva cree una pluralidad de microrreactores (que contienen preferiblemente cada uno una perla individual en promedio y un único molde de ácido nucleico eficaz) en el aceite de emulsión. A continuación, se envía el flujo de emulsión (con microrreactores) a un procesador térmico de modo que el molde de ácido nucleico suministrado en cada microrreactor puede amplificarse para la amplificación de ácido nucleico. La figura 3 ilustra un ejemplo de perlas (véanse las flechas) suspendidas en microrreactores individuales.

La figura 4 ilustra un esquema general de un emulsificador de elemento en T de inyección 400 de la presente invención, que permite, por ejemplo, tasas de generación de gotitas del orden de 500 a 1000 por segundo o más, y las figuras 5A-5F ilustran diversas vistas de emulsificadores de elemento en T de inyección particulares según algunas realizaciones de la invención.

Tal como se muestra en la figura 4, el emulsificador puede incluir una primera entrada 402 de un primer conducto 404 para recibir un aceite de emulsión, un área de diámetro estrechada 406 proporcionada a lo largo del primer conducto y una salida 408 del primer conducto. Preferiblemente, el primer conducto se proporciona en una posición horizontal estableciendo así un flujo cruzado de aceite de emulsión a través del área estrechada. Además, el diámetro del área estrechada es preferiblemente de entre 100 μm y 600 μm , más preferiblemente de entre 200 μm y 400 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 300 μm .

El emulsificador 400 también incluye una segunda entrada 410 de un segundo conducto 412 para dirigir la mezcla de reacción de amplificación/perla al interior del aparato. Se proporciona un orificio tubular 414 en un extremo terminal del segundo conducto, y se abre al área estrechada 406 del primer conducto. El orificio incluye preferiblemente un diámetro de entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 200 μm , y más preferiblemente de entre 75 μm y 150 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 120 μm . Preferiblemente, la segunda entrada, el conducto y el orificio se proporcionan en una disposición vertical con respecto a la disposición horizontal preferida del primer conducto (es decir, el primer conducto y el segundo conducto/orificio pueden ser ortogonales entre sí), aunque cualquier orientación puede funcionar. El orificio permite que se cree una pluralidad de gotitas de mezcla de reacción de amplificación (es decir, microrreactores) a medida que la mezcla de reacción entra en el flujo de aceite. Una pluralidad de tales microrreactores incluyen cada uno preferiblemente en promedio una perla individual y un único molde de ácido nucleico eficaz.

Con referencia a la figura 5D, un elemento en T de inyección particular incluye un área de salida de jeringa 502d, un área de entrada de fase acuosa (disolución de PCR) 504d, un área de sección decreciente de agujero de inyección 506d, un área recta de agujero de inyección 508d, una salida de emulsión 510d, una entrada de aceite de emulsión 512d, un área de aceleración de aceite de sección decreciente 514d (es decir, boquilla), un área (estrechada) de velocidad constante, de alta velocidad 516d, un área de difusión parcial 518d y un escalón de difusor 520d.

Por consiguiente, cuando el aceite de emulsión entra en un elemento en T de inyección respectivo, entra en una región progresivamente más estrecha, y por tanto se acelera hasta una velocidad superior (por ejemplo, de 30 veces su velocidad inicial). Entonces se inyecta la disolución de PCR/perla (es decir, un material en fase acuosa) preferiblemente a una tasa constante y controlada, preferiblemente de entre aproximadamente 5 μl -100 μl por minuto, y preferiblemente de aproximadamente 20 μl /minuto. Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse otros caudales relativos para las dos fuentes de fluido de componentes, por ejemplo, de acuerdo con las especificaciones de un dispositivo de procesamiento térmico para amplificación por PCR.

La fuerza de cizallamiento del aceite a alta velocidad rompe la corriente de PCR/perlas en gotitas individuales a medida que se inyecta, incluyendo preferiblemente cada una una perla individual. A medida que las gotitas recién formadas se mueven aguas abajo, la velocidad del flujo puede reducirse gradualmente en un área de difusor (véase el área de difusor parcial 522, figura 5D). Tras el difusor parcial, el flujo encuentra un escalón abrupto (520, figura 5D), que provoca que las gotitas se separen de la pared y entren en el área central de la corriente de flujo. Entonces el flujo sale del elemento en T de inyección con las gotitas uniformemente distribuidas a lo largo del flujo.

Los ejemplos de elementos en T de inyección ilustrados en las figuras 5A-5D pueden fabricarse para equiparse en una jeringa desechable, y pueden fabricarse mediante moldeo por inyección de plástico. En algunas realizaciones de la invención, la selección de un material de plástico apropiado es crítica para conferir la función deseada del elemento en T de mezclado. Específicamente, la superficie del material debe humedecerse preferiblemente con aceite en vez de con agua. Si no es así, la corriente entrante de material acuoso fluirá a lo largo de la pared interior del área de alta velocidad del elemento en T en una corriente continua, en vez de experimentar cizalladura para

formar las gotitas de tamaño deseado. El polipropileno, por ejemplo, es un material de plástico que cumple con estos requisitos. Un requisito adicional para el elemento en T es que la geometría interna debe provocar que las gotitas de emulsión recién formadas abandonen la pared del conducto de aceite (en el que se forman) y migren al área central de la corriente de flujo. Si esto no es así, las gotitas estarán demasiado juntas unas a otras y el riesgo de colisiones y coalescencia será alto. Para ello, los presentes ejemplos de los elementos en T de inyección incluyen características de geometría interna que inducen que las gotitas de emulsión se separen de las paredes y fluyan al interior del área central del conducto.

La mezcla de PCR/perla se proporciona al elemento en T de inyección usando una bomba de jeringa, un ejemplo de la cual se ilustra en las figuras 6A-6E. Tal como se ilustra de manera general en las figuras 6A-6C, la bomba de jeringa 600 incluye generalmente una o más jeringas 602, un bloque de soporte de jeringa 604, vástagos de guía 606, un tornillo de accionamiento 608, un motor 610, una base 612, un conjunto de deslizamiento 614 y un conjunto de compuerta pivotante (que puede estar cargada con resorte) 616. El conjunto de deslizamiento se acciona mediante el tornillo de accionamiento, que a su vez acciona simultáneamente cada émbolo de cada jeringa al interior del cuerpo de jeringa para expulsar el contenido de la jeringa. El motor, que puede ser un motor paso a paso, hace girar una polea de accionamiento 618, que acciona una polea de accionamiento principal 620 mediante una correa 622, que hace girar el tornillo de accionamiento para mover el conjunto de deslizamiento (para mover los émbolos de jeringa).

Para garantizar que las perlas se distribuyen uniformemente a lo largo de la disolución dentro de cada jeringa también puede incluirse un mecanismo de mezclado con la bomba de jeringa. Tal como se muestra en la figura 6D, puede incluirse un elemento giratorio 624 (tambor) (en este caso, situado en el conjunto de compuerta pivotante) que incluye una línea helicoidal de imanes 626 a lo largo de una parte de la superficie del tambor situada adyacente a cada cuerpo de jeringa. En una posición de funcionamiento, el elemento giratorio gira de modo que la línea helicoidal de imanes se coloca en estrecha proximidad a los cuerpos de las jeringas a medida que pasan por ahí. Puede usarse un motor eléctrico (no mostrado) con una unidad de reducción de engranaje para alimentar el elemento giratorio y puede montarse dentro del elemento giratorio (que está fijado al marco de compuerta). La pluralidad de imanes también puede representarse por una única tira magnética enrollada helicoidalmente (u otro imán formado, que está dispuesto helicoidalmente alrededor del elemento giratorio), pero se prefiere una pluralidad de imanes individuales.

Los imanes 626 en el elemento giratorio están preferiblemente orientados de modo que los campos están dirigidos radialmente hacia fuera desde el elemento giratorio. Preferiblemente, la mayoría (y lo más preferiblemente la totalidad) de los imanes tienen la misma orientación de la polaridad.

A medida que la línea montada helicoidalmente de imanes 626 pasa por el cuerpo de cada jeringa, una esfera magnética 632a, 632b, 632c, incluida dentro de cada cuerpo de jeringa, se mueve desde su posición más baja adyacente al émbolo 634 hacia una posición superior, que puede ser adyacente al área de boquilla 636, sucesivamente, cada vez más alta por cada imán. La esfera se libera una vez que el imán más alto en la serie helicoidal se aleja del cuerpo de jeringa y después cae hasta el fondo (es decir, adyacente al émbolo) de la jeringa. Este movimiento de la esfera de mezclado se producirá independientemente de dónde esté ubicado el émbolo de jeringa. La frecuencia y velocidad de la esfera de mezclado pueden controlarse mediante la velocidad de rotación del elemento giratorio. Preferiblemente, a medida que se vacía la jeringa, la esfera se mueve más rápidamente para lograr el mismo efecto de mezclado. Puede usarse más de un patrón helicoidal de imanes para permitir diferentes tasas de mezclado y desplazamientos a medida que el émbolo se mueve a través de diferentes áreas de la jeringa. Por ejemplo, es deseable que la acción de mezclado no altere al elemento en T de inyección, de modo que una serie de imanes puede comenzar en el punto más bajo del émbolo y sólo subir parcialmente por el cuerpo de jeringa, mientras que una segunda línea de imanes puede comenzar en el centro y continuar hasta la parte superior. Los imanes inferiores funcionarán cuando el émbolo esté bajo, y la parte superior de los imanes sólo funcionará cuando el émbolo esté en el intervalo superior de su movimiento. Otra variación es que la hélice de imanes vaya tanto hacia arriba como hacia abajo, controlando así el movimiento en su totalidad y permitiendo que el mecanismo funcione en cualquier orientación.

Para garantizar que las perlas no obstruyen la boquilla en el elemento en T de mezclado, la presente invención usa un dispositivo antiobstrucción. Más particularmente, algunas realizaciones incluyen un mecanismo antiobstrucción sónico (vibratorio) (figura 6E) para alimentar de manera fiable partículas sólidas a altas concentraciones a través de la boquilla del elemento en T de mezclado. Tal como se muestra en la figura 6E, cada émbolo 632a, 632b, 632c puede equiparse con un accionador piezoeléctrico 638 (es decir, accionador sónico), que se proporciona en el conjunto de deslizamiento de la bomba de jeringa. El/los accionador(es) piezoeléctrico(s) se acciona(n) electrónicamente a una frecuencia (entre aproximadamente 50 Hz y 1000 Hz, y de manera preferible aproximadamente 300 Hz) y desplazamiento (entre aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ - $100\ \mu\text{m}$, y de manera preferible aproximadamente $15\ \mu\text{m}$) deseados para mantener eficazmente las partículas en la boquilla en movimiento constante para evitar la aglomeración y la obstrucción de las perlas en el área de boquilla. También pueden usarse accionadores electromagnéticos para crear y conferir la energía a las jeringas.

Sin el uso de los accionadores sónicos según la presente invención, se requerirían grandes cantidades de potenciadores de la viscosidad y tensioactivos para evitar que las partículas obstruyan las boquillas, y un sistema de ese tipo todavía sería tan sólo ligeramente fiable. Otra función importante de la excitación mecánica vibratoria de los émbolos de jeringa es que evita que los émbolos de jeringa de caucho se adhieran al cuerpo interno de la jeringa. Si esto sucede, se producirá un movimiento intermitente de deslizamiento-adhesión del émbolo de jeringa, provocando que la disolución de PCR/perla se alimente a una tasa variable, provocando que sea imposible controlar el tamaño de gotita.

El flujo que sale del emulsificador, a través de un conducto (por ejemplo), puede discurrir entonces a través de un dispositivo de procesamiento térmico, que expone el flujo continuo a zonas alternas de una temperatura superior y una temperatura inferior (por ejemplo, una zona de calentamiento y una zona de enfriamiento) para la amplificación por PCR. Se ilustran ejemplos de tales dispositivos de procesamiento térmico en las figuras 7A-7B y las figuras 8A-8C. Algunas realizaciones de los procesadores térmicos según la presente invención permiten una amplificación por PCR rápida, simultánea y separada de millones de fragmentos de ADN, dando como resultado productos en fase sólida clonales. En un lote pueden amplificarse de manera separada más de 12 millones (por ejemplo) de fragmentos de ADN separados.

Por ejemplo, un conducto de acero inoxidable, que incluye una entrada 702 y una salida 704, que contiene el flujo emulsionado (por ejemplo, 400 tal como se muestra en la figura 4) puede enrollarse helicoidalmente alrededor de un dispositivo de procesamiento térmico de tipo mandril 700 (figura 7A-7B). Un lado o una parte del mandril comprende una zona de primera temperatura 706 que puede incluir un calentador o elemento de transferencia de calor 708, rodeado por un material de aislamiento 709 (por ejemplo) y un segundo lado o parte del mandril comprende una zona de segunda temperatura 710 que incluye una temperatura inferior a la temperatura de la zona de primera temperatura. La zona de segunda temperatura puede incluir un elemento de enfriamiento (por ejemplo, camisa de agua, ventilador de circulación de aire, y similares) para enfriar el flujo continuo, pero también puede incluir un calentador por resistencias 711 (por ejemplo) para mantener una cierta temperatura predeterminada. También puede incluirse una zona de precalentamiento 712, antes de que el flujo alcance la zona de primera temperatura.

Alternativamente, la zona de segunda temperatura también puede incluir un elemento de calentamiento, ya que la zona, para la amplificación por PCR, mantiene normalmente una temperatura de entre aproximadamente 60-70°C, lo que es considerablemente superior a la temperatura ambiente de 23°C. Un ejemplo de este tipo se muestra en el procesador térmico ilustrado en las figuras 8A-8C. Si se usa un elemento de transferencia de calor, tal como un dispositivo termoeléctrico, para proporcionar calor a la zona de primera temperatura, el calor procederá de la segunda zona, la cual debe tener un elemento de calentamiento para mantener la temperatura. Esto es el enfoque deseable ya que genera la menor cantidad posible de calor residual y por tanto tiene el menor consumo de energía y el menor requisito de enfriamiento.

En este ejemplo, el dispositivo de procesamiento térmico 800 permite situar secciones alternas de un conducto 802 adyacentes y opuestas (por ejemplo) a zonas lineales de primera temperatura 804 y de segunda temperatura 806. Uno o más elementos de transferencia de calor termoeléctricos 808 del dispositivo de procesamiento térmico pueden proporcionar calor al flujo continuo a lo largo de partes del conducto. Pueden situarse calentadores por resistencias 810 adyacentes a la zona de segunda temperatura 806, de modo que las secciones de conducto situadas adyacentes a la zona de segunda temperatura se mantienen, por ejemplo, a una temperatura de entre, por ejemplo, 60-70°C. La segunda temperatura puede mantenerse tanto añadiendo calor desde los elementos de calentamiento cuando se requiera como también extrayendo calor en la segunda zona, usando (por ejemplo) un ventilador para mover aire a través de la segunda zona. Otra característica que puede incluirse es un área expuesta de conducto entre la zona de primera y de segunda temperatura, lo que permite enfriar el conducto directamente mediante el ventilador, en vez de a través del bloque de zona de segunda temperatura.

En este ejemplo, los calentadores por resistencias también pueden proporcionar energía térmica para la zona de primera temperatura. Pueden usarse bloques 812 como conductores térmicos para conducir calor hacia y desde las diversas zonas y hacia y desde el conducto, y pueden fabricarse de cualquier material útil para el calentamiento, por ejemplo, metal tal como aluminio, cobre, y similares. Los bloques pueden diseñarse para ajustarse de manera precisa alrededor del conducto de modo que pueda transferirse eficazmente energía térmica entre los bloques y el conducto. Puede añadirse una grasa térmica entre estos dos elementos para mejorar adicionalmente la conductividad térmica de la superficie de contacto. También puede usarse aislamiento 814 para ayudar a mantener la temperatura de la zona de temperatura alta, o cualquier otra área del dispositivo de procesamiento térmico. En un ejemplo, el conducto puede extenderse 46 cm para cada ciclo de amplificación, para un total de 35 ciclos. En otro ejemplo, el conducto es de 67 cm para cada ciclo, y se usa un total de 60 ciclos. El conducto se fabrica en grupos de cinco ciclos, de modo que pueden usarse suficientes elementos de sujeción para garantizar que los bloques están sujetos estrechamente con abrazaderas alrededor del conducto. Para permitir una etapa de precalentamiento, puede añadirse un tramo adicional de conducto al comienzo que está expuesto únicamente a la zona de temperatura alta. Esto puede incluirse con el fin de activar una enzima requerida para la amplificación por PCR. Todavía adicionalmente, puede adaptarse un extremo distal del conducto para permitir la recogida de muestras, por ejemplo, en un dispositivo de filtrado de perlas o un recipiente de recogida.

Para la PCR, la temperatura en la zona de primera temperatura de entre 90 y 100°C puede usarse para fundir ácido nucleico en dúplex (por ejemplo, 94°C), mientras que la temperatura de 60-70°C de la zona de segunda temperatura se elige para el apareamiento y la extensión de cebadores (por ejemplo, 65°C), por ejemplo.

Mientras que el suministro de los componentes de emulsión puede lograrse mediante cualquier medio de suministro manual o automático, preferiblemente se usa un sistema de bomba. Como ejemplos ilustrativos, puede obtenerse el suministro mediante diversas bombas, incluyendo bombas de jeringa y bombas mecánicas, por ejemplo, bombas de HPLC (véase, por ejemplo, Gilson, Inc., Middleton, WI; ESA, Inc., Chelmsford, MA; Jasco Inc, Easton, MD). Los medios preferidos son una bomba de engranaje anular giratorio.

Los dispositivos de calentamiento a modo de ejemplo para el aparato incluyen, pero no se limitan a, calentadores de cartucho (véase, por ejemplo, Omega Engineering, Inc., Stamford, CT; Delta-t Max, Greenland NH), calentadores resistivos (véase, por ejemplo, Minco Products, Inc., Minneapolis, MN) y calentadores termoeléctricos, incluyendo dispositivos Peltier (véase, por ejemplo, Ferrotec, Nashua NH). En diversos aspectos, los dispositivos de calentamiento para el aparato pueden incrustarse en los bloques de calentamiento o montarse sobre la superficie de los bloques. También pueden usarse monitores de temperatura con el aparato, incluyendo controladores de temperatura proporcionales en tiempo real, controladores digitales PID (proporcional, integral y derivativo), en combinación con elementos de detección de la temperatura tales como termopares, termistores o cualquier otro dispositivo adecuado (véase, por ejemplo, Watlow Electric Mfg. Co., St. Louis, MO).

El material de conducto puede fabricarse de cualquier material de tubos compatible para la amplificación (en particular, amplificación térmica), tal como acero inoxidable, politetrafluoroetileno (PTFE; por ejemplo, Teflon) y sílice fundida. Preferiblemente, se usan tubos de acero inoxidable por su conductividad térmica y resistencia a la corrosión.

Se entenderá que también son posibles otros medios para controlar la amplificación para el aparato. Por ejemplo, pueden hacerse circular fluidos desde depósitos a temperatura constante, en particular, baños de aceite caliente (véase, por ejemplo, Nakano *et al.*, 1994, Biosci. Biotech. Biochem. 58: 349-352) y baños de agua caliente (véase, por ejemplo, Curcio y Roaeraade, 2003, Anal. Chem. 75:1-7). Además, es posible realizar una amplificación de flujo continuo sobre la superficie de un chip (véase, por ejemplo, Kopp *et al.*, 1998, Science 280:1046-1049; Schneegas *et al.*, 2001, Lab on a Chip 1:42-49). Por ejemplo, puede modificarse un chip de silicio o vidrio para incluir transductores de película fina para calentar diferentes secciones del chip hasta diferentes temperaturas. Alternativamente, puede colocarse un chip a través de una fila de bloques de calentamiento, en los que cada bloque se calienta hasta una temperatura diferente. Las secciones calentadas de los chips pueden permitir etapas de desnaturalización (por ejemplo, 95°C), apareamiento de cebadores (por ejemplo, 58°C o 60°C) y extensión de cebadores (por ejemplo, 72°C o 77°C) en la reacción de amplificación. Además, pueden añadirse canales de fluido al chip (por ejemplo, mediante grabado, moldeo, impresión o adhesivos) para permitir la entrada de tampón y de muestra, el ciclado de la temperatura y la salida del producto. Los tampones y muestras pueden suministrarse, por ejemplo, mediante bombas de jeringa de precisión, y los productos de amplificación pueden recogerse en tubos Microfuge, micropocillos u otros depósitos. Sin embargo, estos métodos no proporcionan la amplificación separada de grandes números (miles o millones) de diferentes moldes de fragmentos de ADN, lo que es una ventaja crítica de esta invención.

Recuperación de perlas

Tras la amplificación del molde de ácido nucleico y la fijación de copias de amplificación a la perla, deben recuperarse las perlas. Si hay un elemento de filtro a la salida del primer conducto, puede retirarse el filtro del sistema, y pueden extraerse las perlas del filtro mediante retrolavado usando flujo inverso. Alternativamente las perlas pueden lavarse y procesarse mientras todavía están en el filtro, fijando el filtro a una jeringa con el lado de perlas expuesto a la cámara de jeringa, y extrayendo y empujando diversos reactivos de lavado a través del filtro hacia dentro y hacia fuera de la jeringa.

Alternativamente, puede recogerse la emulsión que sale del sistema de flujo en un recipiente y posteriormente centrifugarse en una centrífuga, lo que dejará las perlas en el fondo siempre que sean más densas que el aceite. Entonces puede retirarse el aceite de encima de las perlas, y pueden recuperarse las perlas del fondo del recipiente. Este procedimiento también puede usarse sin la centrífuga, si se deja suficiente tiempo para que las perlas se sedimenten por gravedad.

Purificación de las perlas

Tras la amplificación por PCR, las perlas pueden aislarse de los microrreactores y usarse para la secuenciación. Las etapas de secuenciación se realizan preferiblemente con cada perla individual. Sin embargo, este método, aunque es comercialmente viable y técnicamente factible, puede no ser el más eficaz porque una parte de las perlas serán perlas "negativas" (es decir, perlas sin ácido nucleico amplificado fijado). Esto es así porque el material de molde de

ADN se suministra a la disolución de PCR o a las perlas mediante dilución, y es inevitable que al menos algunas de las perlas no consigan una copia de partida para la amplificación. En tales casos, puede usarse un procedimiento opcional expuesto a continuación para eliminar las perlas negativas antes de la distribución sobre placas de múltiples pocillos (por ejemplo, Picotiter).

5

EJEMPLOS

Unión de molde de ácido nucleico a perlas de captura

Este ejemplo describe la preparación de una población de perlas que sólo tienen preferiblemente un único molde de ácido nucleico fijado a las mismas. La amplificación clonal satisfactoria depende del suministro de un número controlado de especies de molde a cada perla. El suministro de un exceso de especies puede dar como resultado la amplificación por PCR de una población de moldes mixtos, evitando la generación de datos de secuencia significativos, mientras que una deficiencia de especies dará como resultado menos pocillos que contengan molde para la secuenciación. Esto puede reducir el grado de cobertura del genoma proporcionado por la fase de secuenciación. Como resultado, se prefiere que la concentración de molde se determine con precisión mediante cuantificación replicada.

15

Control de calidad del molde

20

El éxito de la reacción de PCR en emulsión está relacionado con la calidad de la especie del molde. Independientemente del cuidado y el detalle que se preste a la fase de amplificación, los moldes de mala calidad impedirán una amplificación satisfactoria y la generación de datos de secuencia significativos. Para evitar una pérdida de tiempo y dinero innecesaria, es importante comprobar la calidad del material de molde antes de iniciar la fase de PCR del procedimiento. Preferiblemente, la biblioteca de molde debe pasar por dos etapas de control de calidad antes de usarse en la PCR en emulsión. Deben determinarse su concentración y la distribución de productos que contiene. De manera ideal, la biblioteca debe parecer una población heterogénea de fragmentos con pocos o ningún dímero de adaptador visible (por ejemplo, ~90 bases). Además, la amplificación con cebadores de PCR no debe dar como resultado una mancha de producto que oscile, por ejemplo, entre 300 y 500 pb. La ausencia de producto de amplificación puede reflejar que no se logra ligar apropiadamente los adaptadores al molde, mientras que la presencia de una única banda de cualquier tamaño puede reflejar la contaminación del molde.

25

30

Amplificación por PCR de flujo continuo

Un emulsificador lineal incluyó un diámetro interno de 300 μm para un paso de aceite y un diámetro interno de 120 μm para la salida de disolución de PCR/perla (véase la figura 4). Se fijó el caudal de aceite de emulsión a 2 ml/min., mientras que se fijó el caudal de disolución de PCR a 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. El intervalo de tamaño de gotita (microrreactor) fue de 80 μm a 120 μm (de 270 pl a 900 pl). Se generaron gotitas a una tasa de 55/s a 180/s. El tamaño de perla fue de 25 μm a 30 μm , mientras que la densidad de perlas fue de 1 perla/nl. El diámetro interno del tubo de flujo fue de 2,4 mm. La longitud de tubo para un ciclo fue de 46 cm. Se cronometró que cada ciclo de PCR fue de 64 s, lo que incluyó 35 ciclos más una etapa de precalentamiento que tardó 2 min. El tiempo total para la reacción de PCR fue de 39 minutos.

35

40

Mezcla de reacción en fase de disolución:

45

1X tampón Hi-Fi

dNTP 1 mM

50

MgSO₄ 2,5 mM

cebador directo 1 μM (MMP 1a)

cebador inverso 1 μM (MMP 1b)

55

el 0,01% de Tween-80

el 0,1% de BSA

60

Taq Hi-Fi 0,15 U/ μl

Se añadieron 3 y 30 copias de TF7 por nl de mezcla de PCR.

Para las perlas el experimento usó la misma mezcla de reacción sólo que se le añadió el 0,333% de PEO con un peso de 4 M y se añadieron 3.600 copias/nl de TF7 en la disolución. Se añadieron perlas a 1 perla/nl.

65

ES 2 432 040 T3

Copia por nl	Factor de amplificación
3	53 M
30	7,6 M
3600 (+perlas)	9.600

La pirosecuenciación de perlas a partir de la reacción mostró una clara secuencia de TF7.

- 5 La amplificación total obtenida fue de 50.000.000X, lo que corresponde a una amplificación de 1,66X por ciclo de PCR.

Otro ejemplo de PCR de flujo de emulsión

- 10 La mezcla de amplificación por PCR usada contenía 1x tampón de alta fidelidad (Tris-SO₄ 60 mM pH 8,9, sulfato de amonio 18 mM, (Invitrogen)), dNTP 1 mM (Pierce), cebador directo 0,625 mM, cebador inverso 0,078 mM (IDT), el 0,25% de Agrimer AL10-LC (ISP Technologies), el 5% de PEG-8000 (Acros), el 0,02% de BSA (Sigma), pirofosfato inorgánico 0,003 U/ul (NEB), Taq de alta fidelidad de platino 0,15 U/ul (Invitrogen).

- 15 Se añadió la biblioteca de interés, *E. coli*, en tres repeticiones a 1,8 millones de perlas de captura en un volumen mínimo y se resuspendieron mediante agitación con formación de vórtice. Entonces se añadió esta mezcla a 900 µl de la mezcla de PCR. Entonces se cargó esta disolución al interior de una jeringa de 1 ml que contenía una esfera de mezclado magnética recubierta con plástico de 4,1 mm. Entonces se cargaron tres jeringas idénticas en serie sobre la "unidad de PCR de flujo".

- 20 El sistema de PCR de flujo de emulsión incluyó un diámetro interno de 300 µm para un paso de aceite y un diámetro interno de 120 µm para la salida de disolución de PCR/perla (véase la figura 4). Se fijó el caudal de aceite de emulsión a 2,4 ml/min., mientras que se fijó el caudal de disolución de PCR a 15 µl/min. por jeringa. Se usaron tres jeringas. El intervalo de tamaño de gotita (microrreactor) fue de 80 µm a 120 µm (de 270 p1 a 900 p1). Se generaron gotitas a una tasa de 280/s a 920/s por jeringa. El tamaño de perla fue de 25 µm a 30 µm, mientras que la densidad de perlas fue de 2 perlas/nl. El diámetro interno del tubo de flujo fue de 2,4 mm. La longitud del tubo para un ciclo fue de 67 cm. Se cronometró que cada ciclo de PCR fue de 60 s, y hubo 60 ciclos más una etapa de precalentamiento que tardó 2 min. El tiempo total para la reacción de PCR fue de 62 minutos. Se usó un filtro de 15 µm de malla, 25 mm de diámetro, para capturar las perlas a medida que salían del procesador térmico.

- 30 Se recuperaron 2,42 millones de perlas del filtro y después se enriquecieron.

Resumen del protocolo de enriquecimiento:

- 35 Se aparea un cebador de enriquecimiento (que contiene las regiones de cebador tanto de amplificación como de secuenciación) a las perlas. Entonces se lavan las perlas en tampón que contiene NaCl 2 M y Tris pH 7,5 y después se mezclan con perlas Seramag biotiniladas de 1 micrómetro. Se incuba esta mezcla a TA durante tres minutos sobre un dispositivo giratorio y después se sedimentan a 2.000 rpm en una microcentrífuga. Se resuspenden las perlas agitando manualmente con formación de vórtice y después se incuban sobre hielo durante 5 minutos. Se lava la mezcla con un imán Dynal-MPC para eliminar el material no apareado y después se añade NaOH para eliminar el oligómero apareado. Entonces se recuperan perlas "enriquecidas" lavando en 1X tampón de apareamiento. Se recuperaron 2,07 millones de perlas a partir del procedimiento de enriquecimiento.

- 45 Entonces se secuenciaron 700.000 de las perlas enriquecidas. 414.557 de esas perlas tenían secuencias de ADN reconocibles en las mismas, y 206.000 de esas perlas tenían una secuencia que tenía un promedio de 90,5 pares de bases de longitud y se mapearon en una ubicación del genoma de *E. coli*.

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificar material genético que comprende:
 - 5 (i) emulsionar un fluido acuoso que comprende una mezcla de reacción de PCR y una pluralidad de perlas suspendidas en un flujo continuo de aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos encapsulados en un flujo continuo de aceite,

10 en el que una pluralidad de los microrreactores incluyen cada uno una o más especies de molde de ácido nucleico y una perla individual que puede capturar un molde de ácido nucleico y reactivos suficientes para amplificar el número de copias de una o más especies del molde de ácido nucleico,

15 y en el que emulsionar comprende bombear un aceite de emulsión y el fluido que comprende la mezcla de reacción de PCR y las perlas suspendidas en un emulsificador de flujo cruzado que comprende uno o más elementos en T de inyección (mezclado) y un dispositivo vibratorio antiobstrucción para evitar que las perlas obstruyan una boquilla del uno o más elementos en T de inyección; y

20 (ii) procesar térmicamente la emulsión que comprende la pluralidad de microrreactores acuosos haciéndola fluir a través de zonas estacionarias de temperatura controlada para amplificar la una o más especies de molde de ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa, en el que la perla individual captura las copias amplificadas de la una o más especies de molde de ácido nucleico; y

(iii) romper la emulsión para recuperar las perlas y los moldes de ácido nucleico amplificados capturados.
 - 25 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además filtrar la emulsión de agua en aceite para recoger uno o más de los moldes de ácido nucleico amplificados.
 3. Método según la reivindicación 1, en el que la perla tiene un diámetro de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 100 micrómetros.
 - 30 4. Método según la reivindicación 1, en el que las especies de molde de ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en ADN genómico, ADNc, ADN episomal, ADN de BAC y ADN de YAC.
 5. Método según la reivindicación 1, en el que las perlas se seleccionan del grupo que consiste en perlas de Sepharose, perlas sólidas y perlas monodispersadas.
 - 35 6. Método según la reivindicación 1, en el que se distribuye uniformemente una pluralidad de los microrreactores acuosos a lo largo del flujo continuo.
 - 40 7. Método según la reivindicación 1, en el que la dimensión de los microrreactores acuosos es de 10 a 50 veces menor que el diámetro del tubo de flujo continuo.
 8. Método según la reivindicación 1, en el que el flujo se dirige mediante un conducto a través de un dispositivo de procesamiento térmico, que expone el flujo continuo a zonas alternas de una temperatura superior y temperatura inferior.
 - 45 9. Método según la reivindicación 8, en el que el conducto se selecciona del grupo que consiste en un conducto de acero inoxidable, un conducto de politetrafluoroetileno (PTFE) y un conducto de sílice fundida.
 - 50 10. Método según la reivindicación 8, en el que el dispositivo de procesamiento térmico comprende un mandril, en el que el conducto se enrolla helicoidalmente alrededor del mandril que comprende una zona de primera temperatura y una zona de segunda temperatura.
 - 55 11. Método según la reivindicación 8, en el que el dispositivo de procesamiento térmico comprende secciones alternas del conducto, en el que las secciones alternas de conducto son lineales y comprenden una zona de primera temperatura controlada y una segunda sección comprende una zona de segunda temperatura controlada.
 - 60 12. Método según la reivindicación 11, en el que las secciones alternas del conducto están situadas adyacentes opuestas a la zona de primera temperatura lineal y la zona de segunda temperatura.
 13. Método según la reivindicación 1, en el que:

65 los microrreactores acuosos se forman a una tasa controlada.

14. Método según la reivindicación 13, en el que:
la tasa controlada comprende una tasa de formación de gotitas de 500 a 1000 gotitas de emulsión por segundo.
- 5 15. Método según la reivindicación 13, en el que:
la tasa controlada comprende una tasa de formación de gotitas de más de 1000 gotitas de emulsión por segundo.
- 10 16. Método según la reivindicación 1, en el que:
el flujo continuo de aceite fluye a una tasa constante.
- 15 17. Método según la reivindicación 16, en el que:
la tasa constante incluye una tasa de aproximadamente 1-10 ml/min.
- 20 18. Método según la reivindicación 16, en el que:
la tasa constante incluye una tasa de aproximadamente 3 ml/min.
- 25 19. Método según la reivindicación 1, en el que:
el dispositivo vibratorio antiobstrucción es un accionador piezoeléctrico o un accionador electromagnético.
- 30 20. Aparato para amplificar material genético que comprende:
al menos un dispositivo de suministro de fluido;
al menos una zona de primera temperatura para someter a ciclado una pluralidad de microrreactores acuosos que incluyen cada uno una o más especies de moldes de ácido nucleico hasta una primera temperatura;
al menos una zona de segunda temperatura para someter a ciclado la pluralidad de microrreactores acuosos hasta una segunda temperatura inferior a la primera temperatura;
un primer conducto para hacer fluir al menos una corriente continua de aceite en el mismo desde un primer depósito;
un segundo conducto para hacer fluir al menos una disolución de PCR a base de agua que incluye moldes de ácido nucleico, una pluralidad de perlas que pueden capturar un molde de ácido nucleico y reactivo de PCR desde un segundo depósito;
- 45 un emulsificador de flujo cruzado que comprende un orificio para el suministro de la disolución de PCR a base de agua desde el segundo conducto al interior del primer conducto para crear una emulsión de agua en aceite en un flujo continuo, en el que el emulsificador de flujo cruzado comprende uno o más elementos en T de inyección (mezclado) y un dispositivo vibratorio antiobstrucción para evitar que las perlas obstruyan una boquilla del uno o más elementos en T de inyección, y en el que la emulsión de agua en aceite comprende una pluralidad de gotitas que comprenden los microrreactores para realizar reacciones en cadena de la polimerasa, y en el que una pluralidad de los microrreactores incluyen cada uno una o más especies de molde de ácido nucleico y una perla individual que puede capturar un molde de ácido nucleico.
- 50 21. Aparato para amplificar material genético según la reivindicación 20, en el que aguas abajo del orificio, un tramo del primer conducto desde una posición de partida hasta una posición de terminación está dispuesto con respecto a al menos las zonas de primera y segunda temperatura de tal manera que el tramo del primer conducto está expuesto a procedimientos alternos de calentamiento y enfriamiento a una temperatura y durante un tiempo suficientes para amplificar cualquiera de los moldes de ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa.
- 60 22. Aparato según la reivindicación 20, en el que el orificio tiene un tamaño de entre 50 μm y 300 μm , y opcionalmente tiene un tamaño de aproximadamente 150 μm .
- 65 23. Aparato según la reivindicación 20, en el que un área de intersección del orificio y el primer conducto incluye un diámetro de entre más de 50 μm y aproximadamente 800 μm , y opcionalmente un diámetro de

aproximadamente 400 μm .

- 5 24. Aparato según la reivindicación 20, que comprende además medios de recogida para recoger uno o más de los moldes de ácido nucleico amplificados desde el primer conducto aguas abajo de las fuentes de calentamiento y enfriamiento.
25. Aparato según la reivindicación 24, en el que los medios de recogida comprenden un filtro.
- 10 26. Aparato según la reivindicación 20, en el que las zonas de primera y segunda temperatura están dispuestas circunferencialmente en lados opuestos de una superficie curvada, en el que el tramo del primer conducto está enrollado helicoidalmente alrededor de la superficie curvada para proporcionar partes alternas del tramo de primer conducto adyacentes o bien a la zona de primera temperatura o bien a la zona de segunda temperatura.
- 15 27. Aparato según la reivindicación 26, en el que la superficie curvada comprende un mandril.
- 20 28. Aparato según la reivindicación 20, en el que las zonas de temperatura están dispuestas a lo largo de superficies lineales de calentamiento y enfriamiento opuestas, respectivamente, en el que el tramo de primer conducto está enrollado a lo largo de las superficies opuestas de tal manera que partes del tramo de primer conducto están expuestas de manera alterna a las superficies de calentamiento y enfriamiento una pluralidad de veces.
- 25 29. Aparato según la reivindicación 28, en el que las superficies lineales son sustancialmente verticales u horizontales.
- 30 30. Aparato según la reivindicación 20, además los moldes de ácido nucleico se capturan sobre perlas, en el que las perlas tienen un diámetro de entre aproximadamente 2 micrómetros y aproximadamente 100 micrómetros.
- 30 31. Aparato según la reivindicación 30, en el que la perla se selecciona del grupo que consiste en una perla de Sepharose, una perla sólida y una perla monodispersada.

FIG. 1

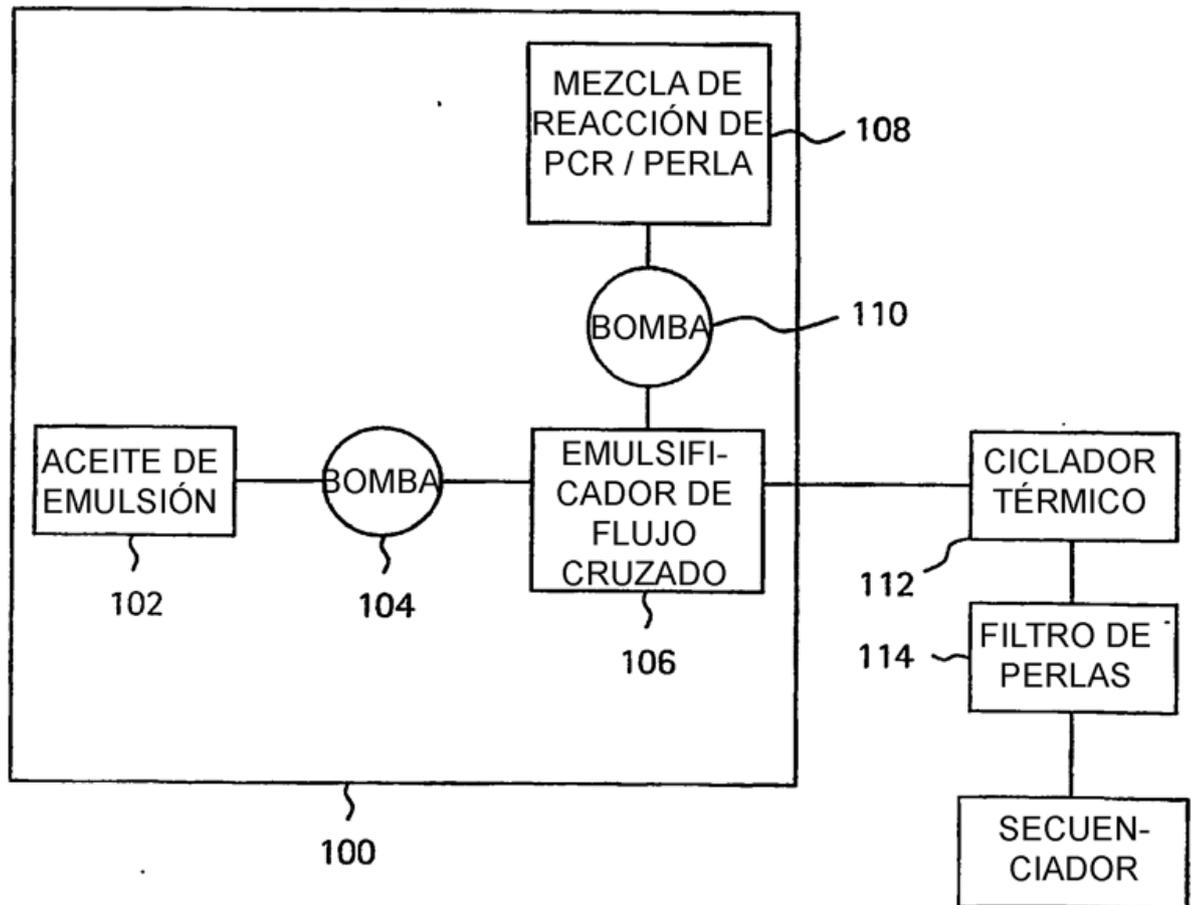


FIG. 2

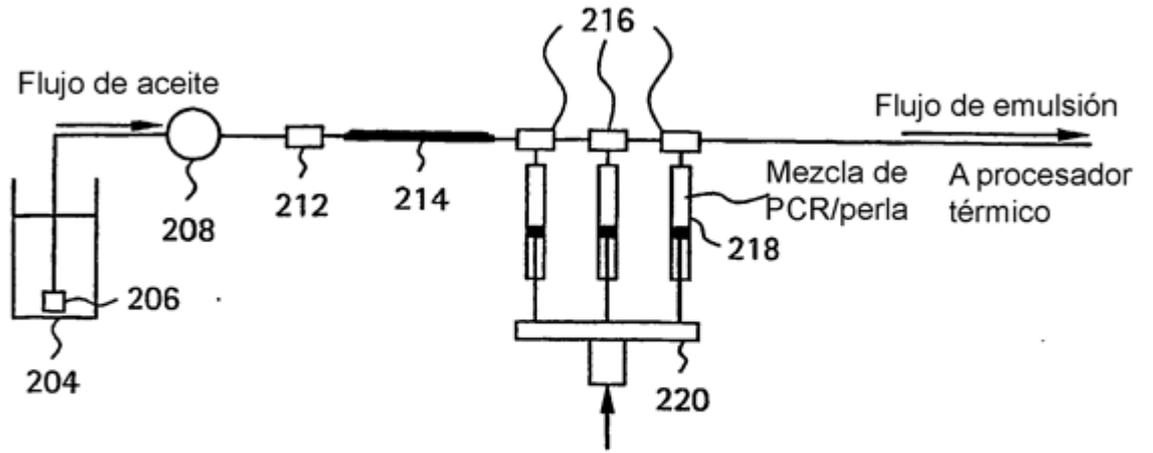


FIG. 3

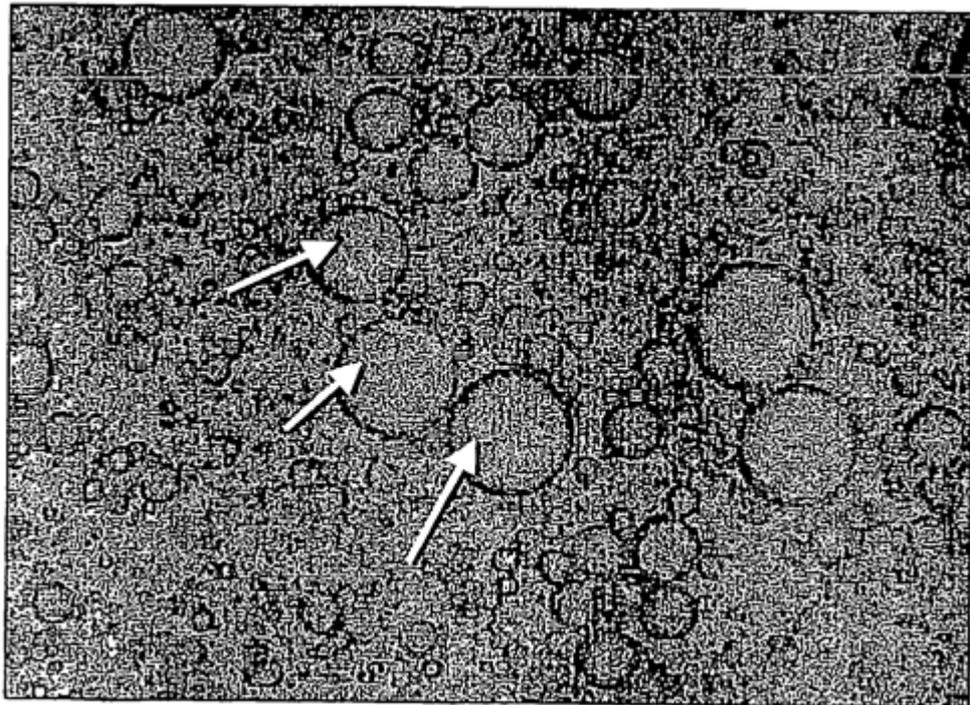


FIG. 4

Disolución de PCR y perlas

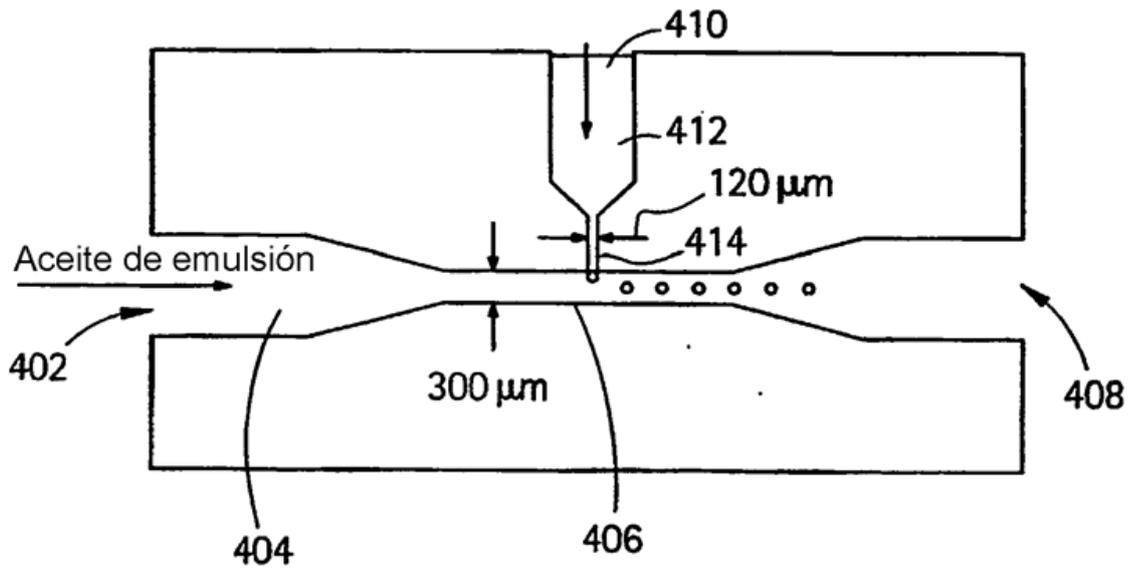


FIG. 5A

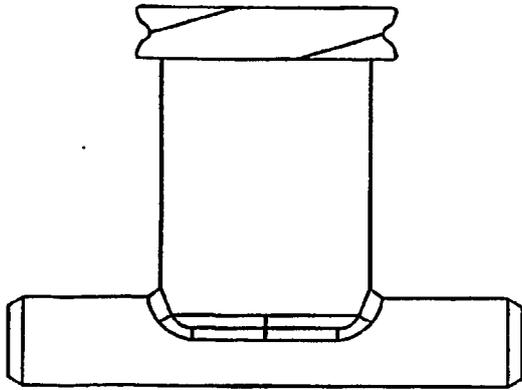


FIG. 5B

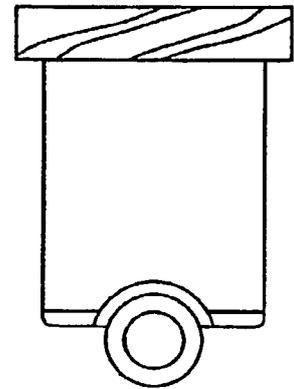


FIG. 5C

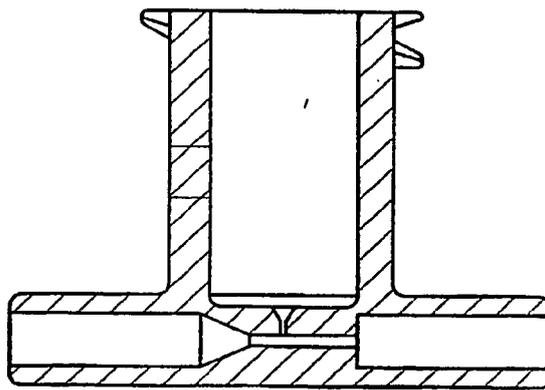


FIG. 5D

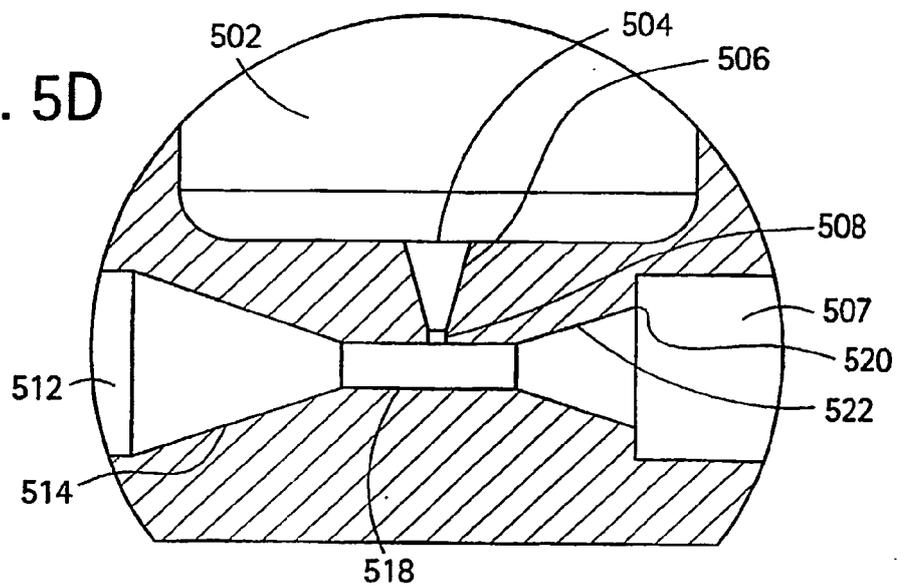


FIG. 5E

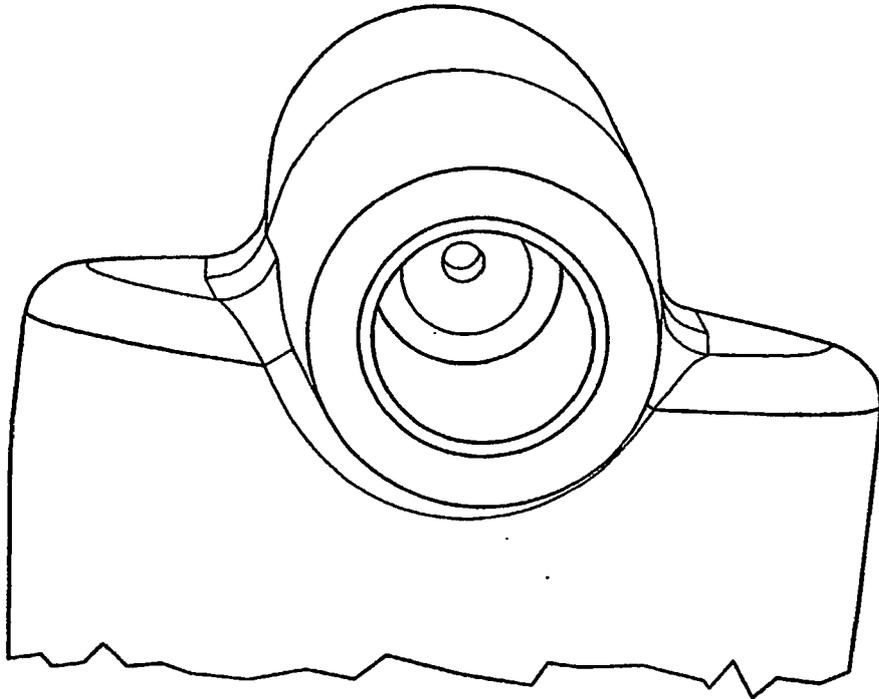


FIG. 5F

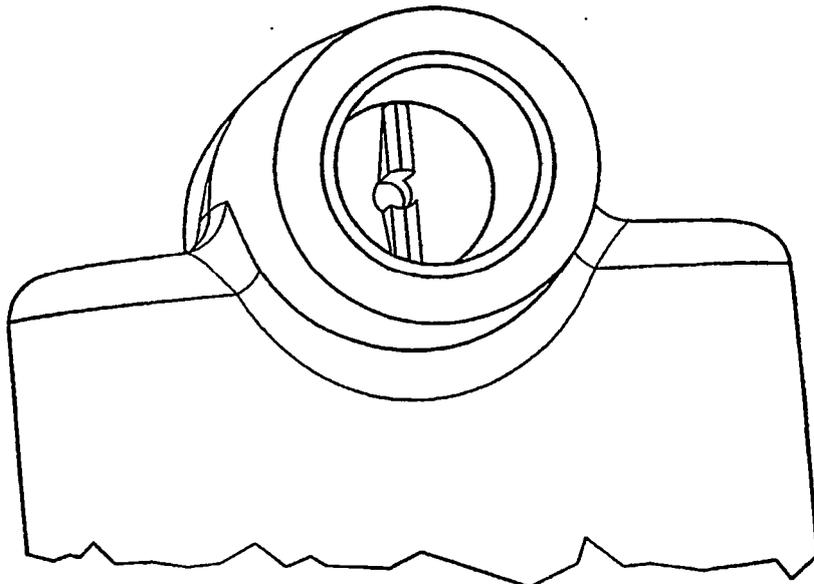


FIG. 6A

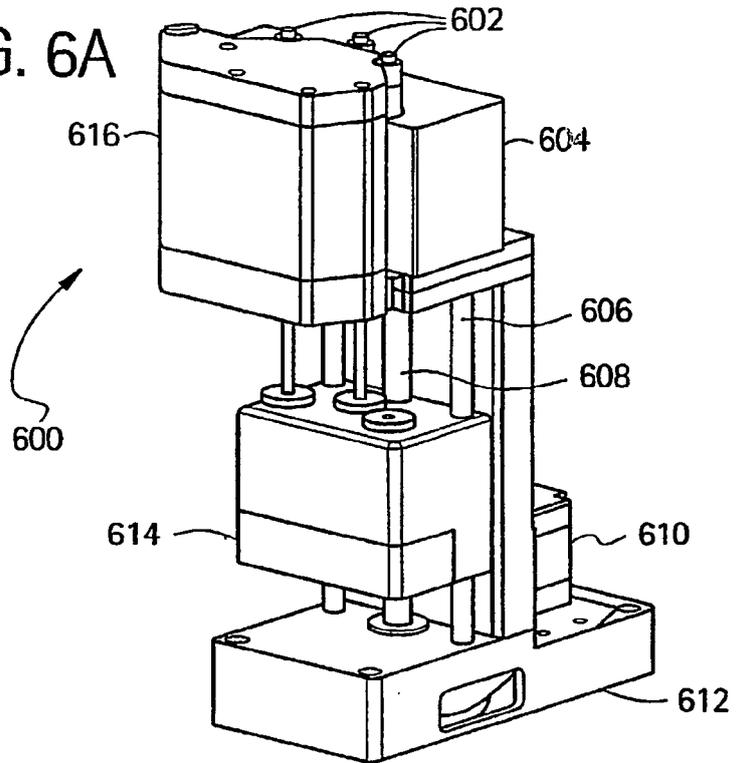


FIG. 6B

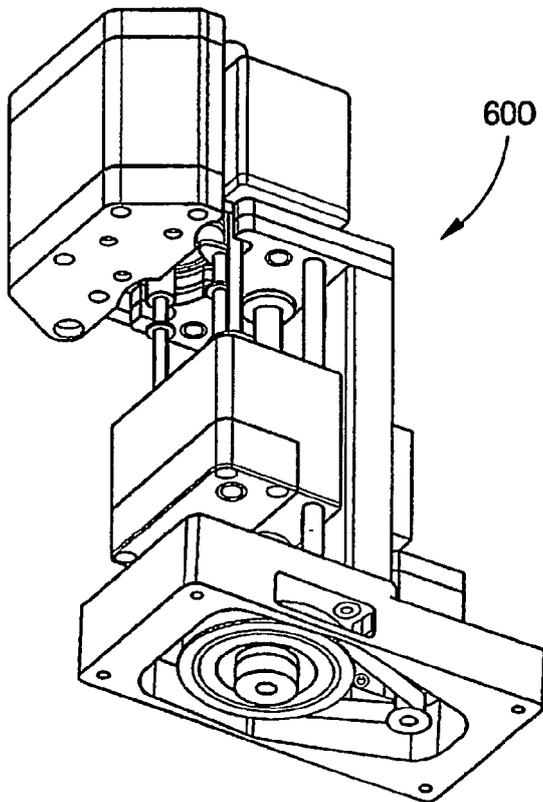


FIG. 6C

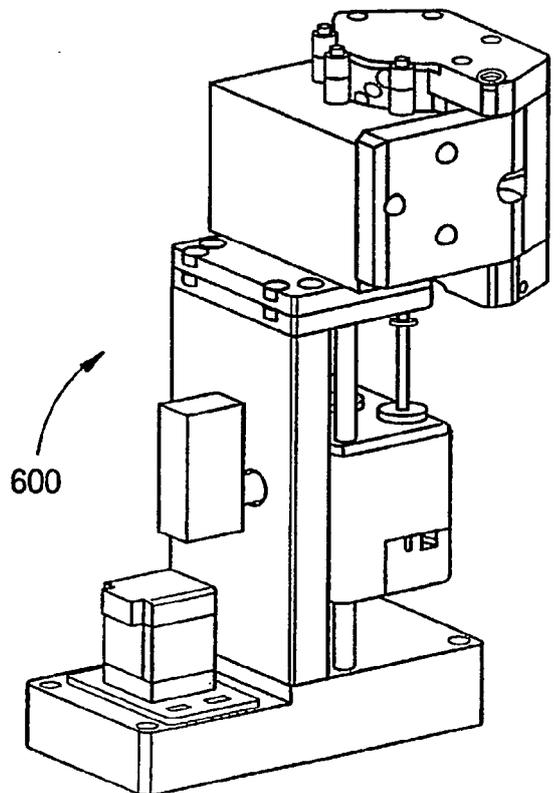


FIG. 6D

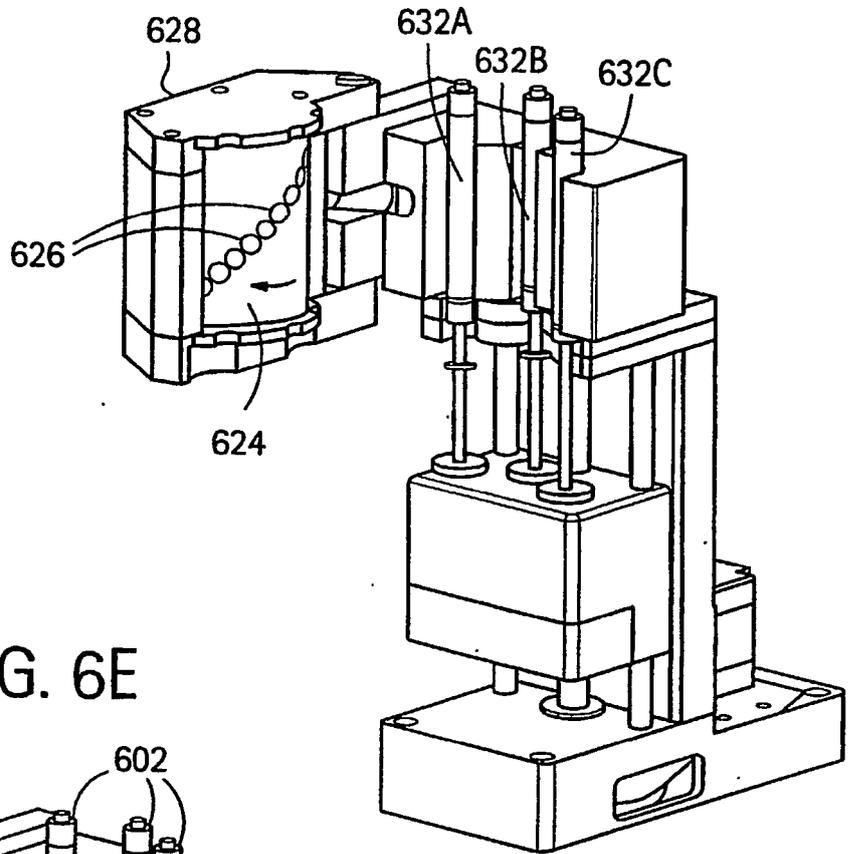


FIG. 6E

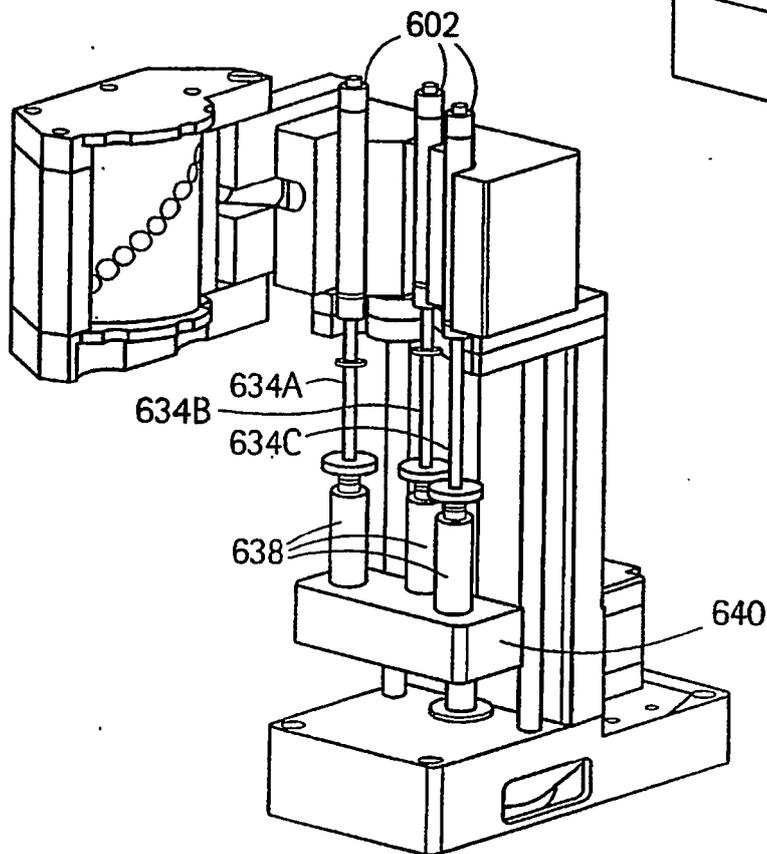


FIG. 7A

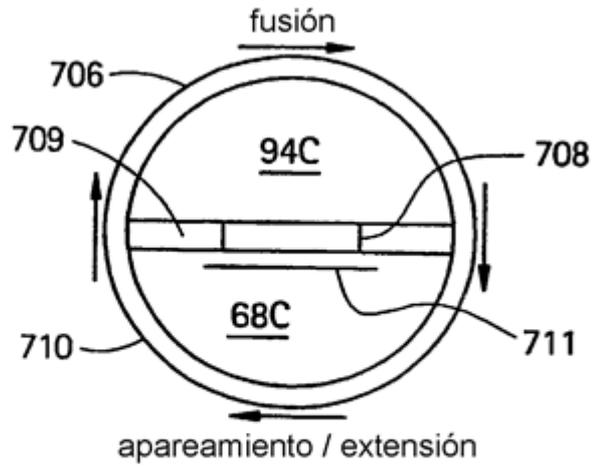


FIG. 7B

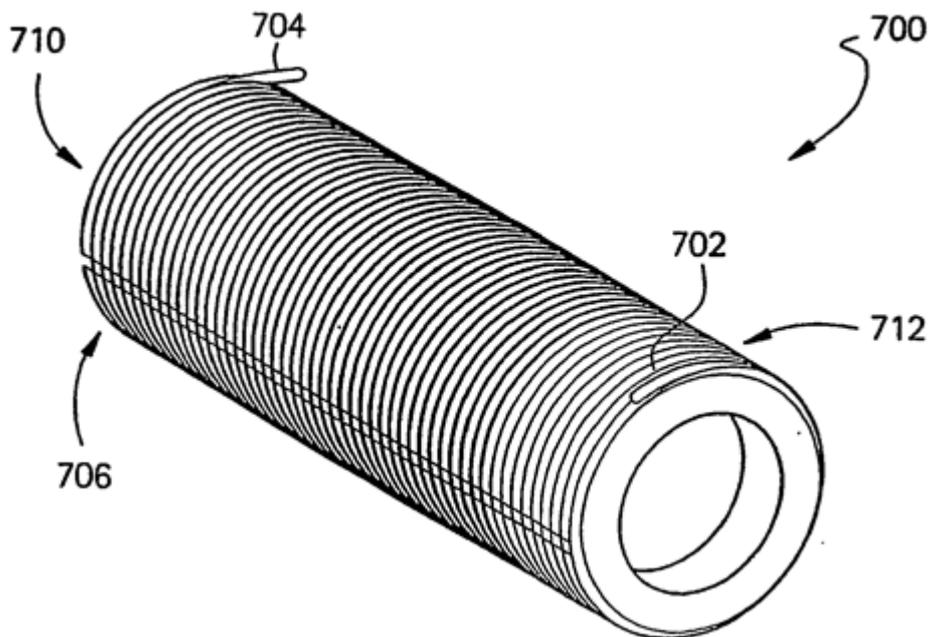


FIG. 8A

Esquema de sistema de procesamiento térmico de PCR en flujo

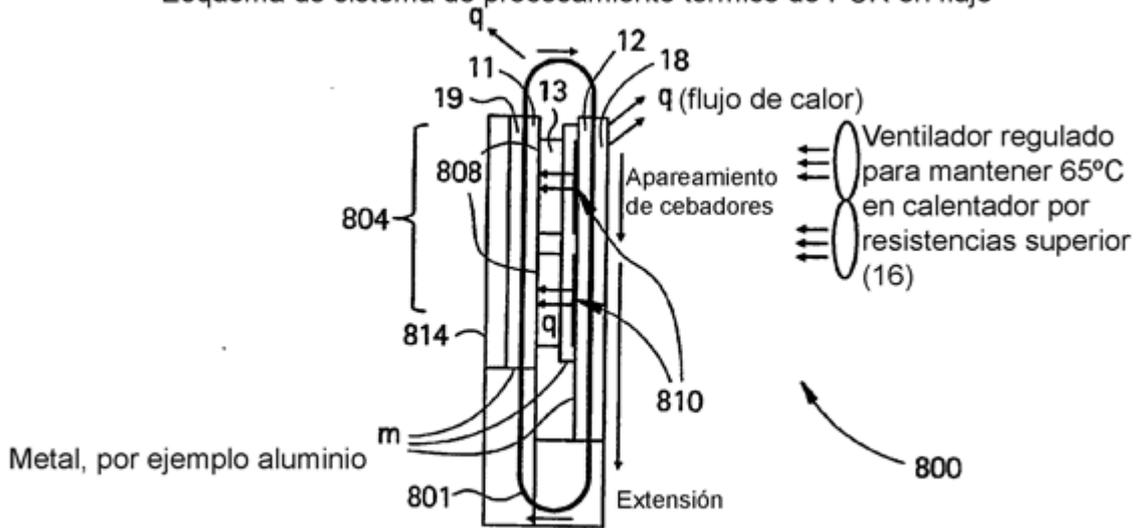


FIG. 8B

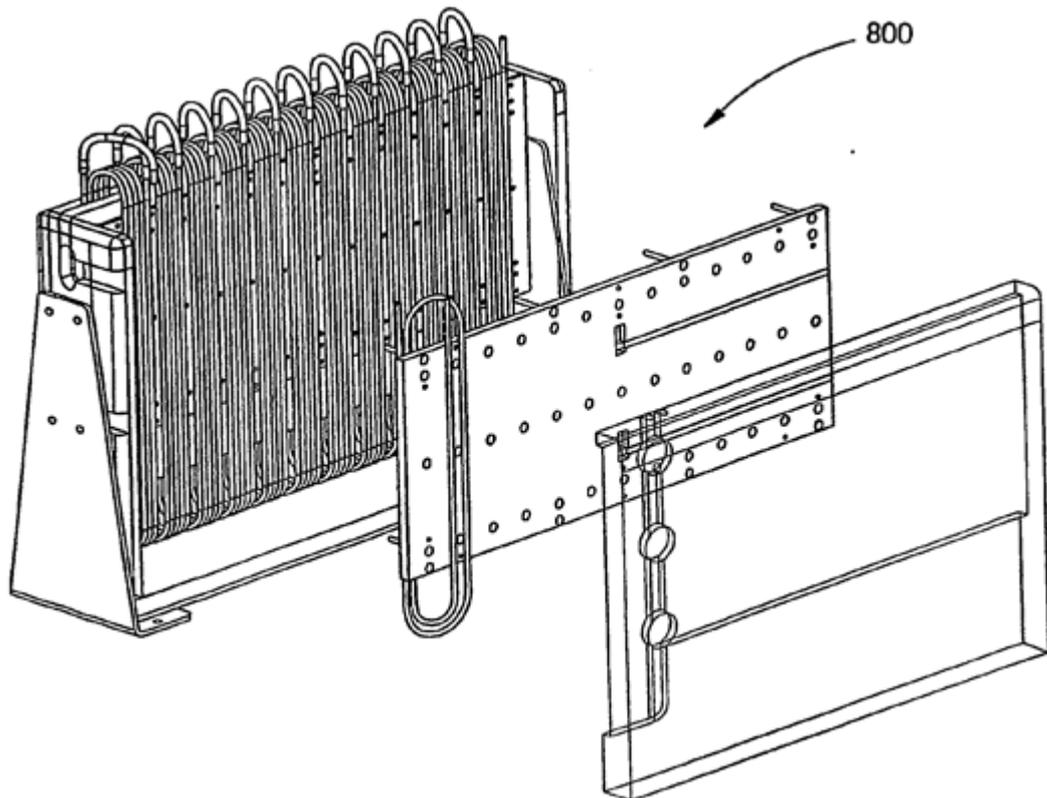


FIG. 8C

