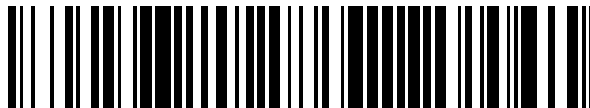


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 347**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2011 PCT/US2011/067366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2011 E 11853295 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2659002**

54 Título: **Cuantificación de muestras de títulos altos por PCR digital**

30 Prioridad:

**27.12.2010 US 201061427401 P**

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

**03.07.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 E. Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**CLEMENS, JOHN M. y  
SHAIN, ERIC B.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 621 347 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).

**Cuantificación de muestras de títulos altos por PCR digital****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente descripción proporciona sistemas, dispositivos, métodos, kits y composiciones para el análisis de ácido nucleico usando PCR digital. En particular, se proporcionan métodos para analizar muestras de títulos altos que no pueden dividirse en un número suficiente de particiones que contienen cero moléculas de ácido nucleico por partición para permitir el análisis de Poisson (análisis de PCR digital).

**FONDO**

[0002] La reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR) es un perfeccionamiento de los métodos convencionales de PCR que se pueden utilizar para cuantificar directamente y clonalmente amplificar ácidos nucleicos. La PCR convencional supone que la amplificación es exponencial. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden cuantificarse comparando el número de ciclos de amplificación y la cantidad de producto final de PCR con los de una muestra de referencia. Sin embargo, muchos factores complican este cálculo, creando incertidumbres e inexactitudes, incluyendo: amplificación no exponencial de ciclos iniciales, mesetas de amplificación, concentraciones iniciales bajas de moléculas de ácido nucleico diana y diferencias en la eficiencia de amplificación entre las secuencias diana y de referencia. La PCR digital está diseñada para cuantificar secuencias de ácido nucleico diana dividiendo la reacción de PCR en un número suficiente de subvolumenes de reacción de modo que el objetivo esté en dilución limitante, es decir, produciendo un número suficiente de subvolumen de reacción con cero copias diana para permitir la aplicación de las estadísticas de Poisson. La cuantificación se consigue haciendo funcionar la reacción a través de un número fijo de ciclos, suficiente para amplificar adecuadamente 1 copia a una respuesta detectable y después contar el número de subvolumenes reactivos y no reactivos. La cuantificación se basa en la aplicación de las estadísticas de Poisson, utilizando principalmente el número de subvolumenes no reactivos para establecer el número de copias iniciales que se distribuyeron a través de todos los subvolumenes de reacción. Sin embargo, la PCR digital requiere típicamente que una muestra se divida en muchos subvolumenes de tal manera que un número significativo de estos subvolumenes contengan cero moléculas de ácido nucleico diana. Los problemas de cuantificación por PCR digital surgen cuando la concentración de moléculas de ácido nucleico es demasiado alta de tal manera que el número de subvolumenes que contienen cero diana es inexistente o es demasiado bajo para aplicar las estadísticas de Poisson. dPCR convencional es poco práctico para aplicaciones en las que el rango dinámico es grande, por ejemplo,  $>10^6$  copias por reacción. En muestras de títulos altos, incluso después de dividir una muestra en un gran número de particiones, puede no ser posible crear una población de cero subvolumenes diana sin crear un número impracticamente elevado de subvolumen. Lo que se necesita son métodos para cuantificar con precisión las muestras utilizando el formato de PCR digital en el que las particiones contienen hasta 10, 100 o más moléculas diana.

**40 RESUMEN DE LA INVENCION**

[0003] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la cuantificación de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: (a) separar la muestra en una pluralidad de particiones, en las que la muestra comprende: una mezcla de moléculas de ácido nucleico, reactivos de amplificación, reactivos de detección y una secuencia estándar interna que tiene las mismas secuencias de unión de cebadores que la secuencia diana; en la que una porción de la pluralidad de particiones contiene una o más moléculas estándar internas y una porción de la pluralidad de particiones contiene cero moléculas estándar internas; (b) tratar la pluralidad de particiones en condiciones de amplificación tales que las secuencias diana se amplifiquen para producir amplicones diana detectables y las secuencias estándar internas se amplifiquen para producir amplicones estándar internos detectables, en donde los amplicones diana detectables y los amplicones estándar internos detectables son diferencialmente detectables; (c) determinar el cambio en la amplificación de la secuencia diana en respuesta a la competencia de cebadores de la secuencia estándar interna; y (d) calcular el número inicial de secuencias diana para la muestra, en donde la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición (por ejemplo, 2-100). En algunas realizaciones, la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 10 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición (por ejemplo, 10-100). En algunas realizaciones, la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 100 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición.

[0004] En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación comprenden cebadores configurados para hibridar con secuencias idénticas en la secuencia diana y la secuencia de estándar interno. En algunas realizaciones, el reactivo de detección comprende una primera sonda marcada configurada para unirse a la secuencia diana y una segunda sonda marcada configurada para unirse a la secuencia estándar interna, en la que la primera sonda marcada y la segunda sonda marcada son detectables diferencialmente. En algunas realizaciones, la primera sonda marcada y la segunda sonda marcada comprenden diferentes marcadores fluorescentes. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de una muestra ambiental, una muestra biológica, una muestra clínica y una muestra forense.

[0005] También se describen en este documento métodos para extender el rango dinámico de un proceso de

amplificación de ácido nucleico no simétrico: (a) separar una muestra en una pluralidad de particiones, en las que una parte de las particiones contiene cero moléculas de ácido nucleico diana; y (b) la amplificación de una secuencia diana de ácido nucleico por el proceso de amplificación de ácido nucleico no simétrico para producir amplicones diana. En algunas realizaciones, una pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2-100 o más moléculas de ácido nucleico por partición. En algunas realizaciones, un proceso de amplificación no simétrico es un proceso de amplificación de PCR (LATE-PCR) lineal después de exponencial. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además (c) la detección de los amplicones diana en la pluralidad de particiones usando reactivos de detección. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden marcadores fluorescentes. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden sondas fluorescentemente marcadas. En algunas realizaciones, la detección es una detección de punto final después de la finalización del proceso de amplificación no simétrica.

[0006] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la cuantificación de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende: (a) la separación de la muestra en una pluralidad de particiones, en las que la muestra comprende: una mezcla de moléculas de ácido, reactivos de amplificación nucleicos para la amplificación de ácidos nucleicos no simétricos, y reactivos de detección; (b) la amplificación de la secuencia diana de ácido nucleico mediante el proceso de amplificación de ácido nucleico no simétrico para producir amplicones diana; (c) la detección de los amplicones objetivo en la pluralidad de particiones usando los reactivos de detección; y (d) las correlación de la intensidad producida por los reactivos de detección después de la amplificación a la concentración inicial de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra, en donde la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2 o más moléculas de ácido nucleico dadas por partición (por ejemplo, 2-100). En algunas realizaciones, la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 10 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición (por ejemplo, 10-100). En algunas realizaciones, la pluralidad de particiones comprende, en promedio, 100 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición.

[0007] En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación comprenden un cebador en exceso y un cebador limitante. En algunas realizaciones, el proceso de amplificación no simétrica es un proceso de amplificación de PCR (LATE-PCR) lineal después de exponencial. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden marcadores fluorescentes. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden sondas fluorescentemente marcadas. En algunas realizaciones, la detección es una detección de punto final después de la finalización del proceso de amplificación no simétrica. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de una muestra ambiental, una muestra biológica, una muestra clínica y una muestra forense.

[0008] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas o dispositivos para realizar la partición, la amplificación, la clasificación, y/o métodos de cuantificación descritos en este documento.

[0009] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits que comprenden los reactivos para la realización de uno o más de la partición, la amplificación, la clasificación, y/o métodos de cuantificación descritos en el presente documento.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010] La descripción resumida y detallada se entiende mejor cuando se lee conjuntamente con los dibujos adjuntos que se incluyen a modo de ejemplo y no a modo de limitación.

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo que proporciona el diseño de una realización que utiliza un ensayo de PCR digital competitivo.

La Figura 2 muestra un gráfico que demuestra la relación del punto final entre la fluorescencia y el número de copias genéticas iniciales usando LATE-PCR.

## DEFINICIONES

[0011] Tal como se utiliza aquí, el término "partición" se refiere a un volumen de fluido (por ejemplo, líquido o gas) que es una parte separada de un volumen mayor. Un volumen mayor puede dividirse en cualquier número adecuado (por ejemplo,  $10^2$  ...  $10^3$  ...  $10^4$  ...  $10^5$  ...  $10^6$  ...  $10^7$ , etc.) de volúmenes más pequeños (es decir, las particiones). Las divisiones pueden estar separadas por una barrera física o por fuerzas físicas (por ejemplo, tensión superficial, repulsión hidrófoba, etc.). Las particiones generadas a partir del volumen mayor pueden ser de tamaño sustancialmente uniforme (monodispersa) o pueden tener tamaños no uniformes (polidispersos). Las particiones se pueden producir de cualquier manera adecuada (por ejemplo, emulsión, microfluidica, microdispersión, etc.). Las particiones ejemplares son gotitas. Las particiones se denominan "subvolúmenes" y "microvolúmenes".

[0012] Tal como se utiliza aquí, el término "gotita" se refiere a un pequeño volumen de líquido que es inmisible con el entorno (por ejemplo, gases, líquidos, superficies, etc.). Una gotita puede residir sobre una superficie, estar encapsulada por un fluido con el cual es inmisible (por ejemplo, la fase continua de una emulsión, un gas (por ejemplo aire, nitrógeno)), o una combinación de los mismos. Una gotita es típicamente de forma esférica o sustancialmente esférica, pero puede ser no esférica. La forma de una gotita esférica o sustancialmente esférica puede alterarse por deposición sobre una superficie o constricción en un canal capilar de menor diámetro. Una gotita puede ser una "gotita simple" o una "gotita compuesta", en la que una gotita encapsula una o más gotitas adicionales más pequeñas. El volumen de una gotita y/o el volumen promedio de un conjunto de gotitas proporcionados en este documento es típicamente menos de aproximadamente un microlitro (por ejemplo, 0,1  $\mu$ L ... 10 nL ... 1 nL ... 0,1nL ... 10 pL ... 1 pL ... 0,1pL ... 100 fL ... 10 fL ... 1 fL). El diámetro de una gotita y/o el diámetro

promedio de un conjunto de gotitas proporcionados en este documento es típicamente menos de aproximadamente un milímetro (por ejemplo, 1 mm... 100 µm... 10 µm... 1 µm). Las gotitas pueden formarse por cualquier técnica adecuada (por ejemplo emulsificación, microfluidica, inyección, etc.) y pueden ser monodispersas (por ejemplo, sustancialmente monodispersas) o polidispersas.

5 **[0013]** Tal como se utiliza aquí, el término "paquete" se refiere a un conjunto de gotitas u otras particiones aisladas dispuestas en el mismo volumen continuo, en la misma región de un volumen continuo, sobre la misma superficie, o agrupado de otra manera. Un paquete puede constituir todas las gotitas de volumen a granel (por ejemplo, una emulsión), o una fracción segregada de gotitas de un volumen voluminoso (por ejemplo, en un intervalo de posiciones a lo largo de un canal, que contiene el mismo amplicón diana, etc.). Un paquete puede constituir todas las gotitas situadas a lo largo de una superficie (por ejemplo, una superficie de chip o microfluidica), o las gotitas en una región definida de una superficie. Un paquete puede referirse a un conjunto de gotitas que cuando se analizan parcial o totalmente, dan un muestreo estadísticamente relevante para el análisis cuantitativo de toda la muestra inicial (por ejemplo, el volumen total).

15 **[0014]** Tal como se utiliza aquí, el término "amplificar" o "amplificación" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la producción de múltiples copias de un polinucleótido, o una porción del polinucleótido, generalmente a partir de una pequeña cantidad del polinucleótido (por ejemplo, una sola molécula de polinucleótido), donde los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables. La amplificación de polinucleótidos abarca una diversidad de procesos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o pocas copias de una molécula de ADN objetivo o molde durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción isotérmica o una reacción en cadena de la ligasa (LCR) son formas de amplificación. La amplificación no se limita a la duplicación estricta de la molécula de partida. Por ejemplo, la generación de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN en una muestra utilizando transcripción inversa (RT)-PCR es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una sola molécula de ADN durante el proceso de transcripción es también una forma de amplificación.

25 **[0015]** Tal como se usa en este documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, tanto si se produce de forma natural como en un digesto de restricción purificada o si se produce sintéticamente, siendo capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca bajo condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico se induce (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como un biocatalizador (*por ejemplo*, una polimerasa de ADN o similares) y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es típicamente monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación, pero alternativamente puede ser de doble hebra. Si se trata de doble hebra, el cebador generalmente se trata primero para separar sus hebras antes de utilizarse para preparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador es suficientemente largo para cebear la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente de cebador y el uso del método.

35 **[0016]** Tal como se utiliza aquí, el término "PCR digital" (dPCR) se refiere a un método de amplificación de ácido nucleico para la cuantificación y el análisis de secuencias de ácidos nucleicos diana mediante la partición de la reacción en un número suficiente de subvolúmenes de reacción de manera que el objetivo está en dilución limitante, es decir, produciendo un número suficiente de subvolumen de reacción con cero copias diana para permitir la aplicación de las estadísticas de Poisson.

40 **[0017]** Como se usa en este documento, "métodos de PCR digitales" se refieren a la utilización de uno o más de los pasos típicamente empleados por dPCR, pero no requiere que se logre la "hipótesis digital", a saber, el supuesto de que cualquier subvolumen de reacción que produjo amplicones diana que tenían una copia inicial única de la secuencia diana.

45 **[0018]** Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier cosa susceptible de ser analizada por los métodos proporcionados en este documento. En algunas realizaciones, la muestra comprende o se sospecha que comprende uno o más ácidos nucleicos capaces de ser analizados por los métodos. Preferiblemente, las muestras comprenden ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ADN, ARN, ADNc, microARN, ADN mitocondrial, etc.). Las muestras pueden ser muestras complejas o mezcladas, que contienen ácidos nucleicos que comprenden múltiples secuencias de ácido nucleico diferentes (por ejemplo, ácidos nucleicos de huésped y de patógeno, especies mutantes y de tipo salvaje, tumor heterogéneo) Las muestras pueden comprender ácidos nucleicos de más de una fuente. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la purificación de la muestra o la purificación del ácido nucleico o ácidos nucleicos de la muestra. En algunas realizaciones, la muestra contiene ácido nucleico purificado. En algunas realizaciones, una muestra se deriva de una fuente biológica, clínica, ambiental, de investigación, forense u otra fuente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

60 **[0019]** La presente invención proporciona sistemas, dispositivos, métodos, kits y composiciones para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos usando PCR digital (dPCR). En particular, se proporcionan aquí métodos para analizar muestras de alto título (por ejemplo, alta concentración de ácido nucleico) que no pueden dividirse en particiones tales que el número de particiones que contienen cero moléculas de ácido nucleico por partición es suficiente para aplicar el análisis estadístico de Poisson. En otras palabras, el número de copias diana en la muestra de título alto excede significativamente el número de particiones utilizadas en el método.

65 **[0020]** En algunas realizaciones, una muestra se analiza para la presencia y/o abundancia de secuencias de ácido nucleico diana en una muestra potencialmente compleja, que puede contener muchas secuencias de ácido nucleico

diferentes, pudiendo cada uno de los cuales contener o no la secuencia diana. En algunas realizaciones, se determina si está presente o no un ácido nucleico diana en una muestra. En algunas realizaciones, se cuantifica la cantidad de secuencia de ácido nucleico diana en una muestra potencialmente compleja. En algunas realizaciones, se analiza una muestra para determinar la proporción de moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia diana de interés. En algunas realizaciones, se analiza una muestra compleja para detectar la presencia y/o medir la abundancia o la abundancia relativa o múltiples secuencias diana. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria se utilizan para determinar qué secuencias están presentes en una muestra mezclada y/o en qué proporciones relativas.

**[0021]** En algunas realizaciones, una muestra que contiene múltiples secuencias de ácido nucleico se analiza por los métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, una muestra es una muestra de título elevado, o una muestra que contiene una alta concentración de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, debido a la mezcla de secuencias de ADN contenidas en la muestra, el análisis directo (por ejemplo, detección, cuantificación, secuenciación, etc.) de los ácidos nucleicos en la muestra no permitiría la resolución de las secuencias individuales de ácido nucleico contenidas en la misma. En algunas realizaciones, la muestra se divide en muchas particiones (por ejemplo, gotitas, etc.) utilizando métodos descritos en la presente memoria (por ejemplo, emulsión, micro-pulverización, microfluídica, etc.). En algunas realizaciones, una muestra tiene una alta concentración de moléculas de ácido nucleico y por lo tanto no se puede dividir en particiones que producen un número suficiente de particiones con 0 copias diana para permitir el análisis por las estadísticas de Poisson. En algunas realizaciones, una muestra se divide en muchas particiones (por ejemplo,  $10^2 \dots 10^3 \dots 10^4 \dots 10^5 \dots 10^6 \dots 10^7$ , etc.), pero debido a la alta Concentración de ácido nucleico, la muestra no se puede dividir en particiones dando un número suficiente de particiones con cero copias diana para permitir el análisis por las estadísticas de Poisson. En algunas realizaciones, una muestra de título alto es una que no puede ser particionada de tal manera que proporcione un número suficiente de particiones con cero copias diana para permitir el análisis por las estadísticas de Poisson.

**[0022]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la amplificación (por ejemplo, la amplificación por PCR (por ejemplo PCR digital (por ejemplo PCR digitales competitivos, PCR LATE digital, etc.))) de los ácidos nucleicos con particiones de una muestra. En algunas realizaciones, se añaden reactivos de amplificación (por ejemplo, cebadores) a una muestra antes de partición y/o concurrencia con partición, o se añaden reactivos de amplificación a la muestra particionada, o se reparten los reactivos de amplificación y después se unen o coalescen con la muestra particionada. En algunas realizaciones, los cebadores se hibridan con ácidos nucleicos moldeados (por ejemplo, ácidos nucleicos diana, estándares internos) antes de la partición o después de la partición.

**[0023]** En algunas realizaciones, los reactivos de detección (por ejemplo, etiquetas fluorescentes) se incluyen con reactivos de amplificación añadidos a la muestra global o particiones. En algunas realizaciones, los reactivos de amplificación también sirven como reactivos de detección. En algunas realizaciones, los reactivos de detección se añaden a las particiones después de la amplificación. En algunas realizaciones, los reactivos de detección comprenden marcadores fluorescentes. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana amplificados (amplicones) son detectables a través de reactivos de detección en su partición. En algunas realizaciones, no se detectan moléculas de ácido nucleico no amplificadas y/o no de diana. En algunas realizaciones, las particiones son detectables usando uno o más reactivos de detección (por ejemplo, marcadores fluorescentes). En algunas realizaciones, la concentración final de amplicones (por ejemplo, amplicones diana, amplicones estándar internos, etc.) en una partición se cuantifica usando reactivos de detección (por ejemplo, marcadores (por ejemplo, marcadores fluorescentes)). En algunas realizaciones, la señal producida por reactivos de detección (por ejemplo, intensidad de fluorescencia) se correlaciona con la concentración de amplicón. En algunas realizaciones, las mediciones de la proporción relativa de ácidos nucleicos diana en una muestra (por ejemplo, en relación con otros ácidos nucleicos diana, con respecto a ácidos nucleicos no diana, con respecto a los ácidos nucleicos totales, etc.) o la concentración de ácidos nucleicos diana en una muestra se puede medir basándose en la cuantificación de amplicones (por ejemplo, amplicones diana, amplicones estándar internos, etc.) en una pluralidad de particiones. En algunas realizaciones, la concentración diana final se compara con la concentración estándar interna final. En algunas realizaciones, la señal procedente de los reactivos de detección de amplicón diana se compara con la señal de los reactivos de detección de amplicón del estándar interno (EI) (por ejemplo, para determinar la concentración diana final).

**[0024]** En algunas realizaciones, después de la amplificación, las particiones que contienen ácidos nucleicos diana amplificados (amplicones) se extraen de particiones que no contienen amplicones, desde particiones que no contienen ácidos nucleicos, o de amplicones que contienen otros objetivos amplificados. En alguna realización, las particiones que contienen amplicones estándar internos se aíslan y/o se clasifican a partir de particiones sin amplicones estándar internos. En algunas realizaciones, las particiones se clasifican basándose en las características físicas, químicas y/u ópticas de la partición, los ácidos nucleicos en las mismas (por ejemplo concentración) y/o etiquetas en la mismas (por ejemplo, etiquetas fluorescentes). En algunas realizaciones, las particiones individuales se aíslan para posterior manipulación, procesamiento y/o análisis de los amplicones. En algunas realizaciones, las particiones que contienen características similares (por ejemplo, los mismos marcadores fluorescentes, concentraciones similares de ácidos nucleicos, presencia o ausencia de amplicón, etc.) se agrupan (por ejemplo en paquetes) para posterior manipulación, procesamiento y/o análisis (por ejemplo, de los tabiques o de los amplicones de los mismos, etc.).

**[0025]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona dPCR competitivo (cdPCR). En algunas realizaciones, la presente invención supera los desafíos presentados por muestras de alto título (es decir, alta concentración de ácido nucleico) a través del uso de cdPCR. En algunas realizaciones, cdPCR se configura en un formato de amplificación competitiva, utilizando un ácido nucleico estándar interno que comparte secuencias de

cebador con la secuencia diana (o secuencias diana) a analizar (por ejemplo, cuantificada). En algunas realizaciones, el EI se añade de manera que existe un número suficiente de subvolumenes de reacción con cero copias diana para permitir la aplicación de las estadísticas de Poisson. En algunas realizaciones, el EI se añade a la muestra a una concentración lo suficientemente baja que, cuando se comparte, cero o 1 copias EI están presentes en cada partición, antes de la amplificación. En algunas realizaciones, la amplificación de una sola copia de EI compite con la amplificación de las secuencias diana en las particiones que contienen una molécula de ácido nucleico EI. En algunas realizaciones, la suposición digital no puede alcanzarse para una secuencia diana, pero puede lograrse para la EI. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona condiciones de reacción dPCR para el EI (por ejemplo, particionado); en el que un número significativo de reacciones (particiones) no tienen EI; de tal manera que la interpretación cuantitativa de la respuesta EI se puede determinar mediante el análisis de Poisson. En algunas realizaciones, el número exacto de copias de EI en una reacción (es decir, partición) es conocido porque el EI se ejecuta a un nivel en el que sólo está presente cero o 1 copias en cualquier partición. En algunas realizaciones, si una partición contiene una copia inicial de EI, la reacción de amplificación en esa partición producirá amplicones de EI. En algunas realizaciones, si una partición contiene cero copias iniciales de EI, la reacción de amplificación en esa partición no producirá amplicones de EI. En algunas realizaciones, la calibración requerida por PCR competitiva convencional no es necesario para cdPCR. En algunas realizaciones, cdPCR permite determinar el porcentaje de reducción de la señal debido a la competencia con EI. En algunas realizaciones, la reducción de señal debida a la competencia con EI proporciona un medio para la cuantificación usando cdPCR. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención (por ejemplo, cdPCR) proporcionan análisis de competencia de amplificación entre una o más moléculas de ácido nucleico diana y una copia de EI. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención proporcionan análisis de la competencia de amplificación entre una o más moléculas de ácido nucleico diana y una o más copias de EI. En algunas realizaciones, la asunción digital no se cumple para una muestra particionada. En algunas realizaciones, el EI se añade a la muestra a una concentración que, cuando está dividida, no cumple con la suposición digital, en el sentido de que algunas particiones tienen más de una copia antes de la amplificación. En algunas realizaciones, la concentración total de EI en todas las particiones se determina mediante análisis de Poisson. En algunas realizaciones, el EI se lleva en la asunción digital. En algunas realizaciones, el EI no se lleva en la asunción digital, pero es todavía digitalmente cuantificable (por ejemplo, a través del análisis de Poisson). En algunas realizaciones, cdPCR proporciona métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos diana en el extremo superior del intervalo dinámico. En algunas realizaciones, cdPCR proporciona la cuantificación de ácidos nucleicos en una muestra en la que el dPCR convencional es incapaz debido a la incapacidad de particionar adecuadamente la muestra en particiones en las que una parte de las particiones no tiene diana. En algunas realizaciones, se proporcionan múltiples secuencias de EI en una reacción para competir con múltiples secuencias de ácido nucleico diana diferentes.

**[0026]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona dPCR LATE (lineal-después-de-exponencial). En algunas realizaciones, la presente invención supera los retos presentados por el título elevado (es decir, alta concentración de ácido nucleico) a través del uso de dPCR LATE. En algunas realizaciones, dPCR LATE proporciona los métodos de PCR conocidos como PCR LATE, o elementos de la misma (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. Nº 20060177841, la patente de EE.UU. Nº 7.632.642), en un formato digital o particionado. En algunas realizaciones, dPCR LATE proporciona amplificación lineal después de la fase exponencial. En algunas realizaciones, en dPCR LATE, las curvas de respuesta de PCR no crecen exponencialmente y después se estabilizan, sino que siguen creciendo de forma lineal después de cruzar lo que se consideraría la región de umbral de PCR en tiempo real tradicional de la curva de crecimiento. En algunas realizaciones, el crecimiento lineal continuo permite la correlación de la intensidad de la señal en el ciclo final con la concentración de la diana inicial. En algunas realizaciones dPCR LATE proporciona métodos para la cuantificación de la concentración de ácido nucleico de diana inicial en una partición basada en la concentración final de amplicón después de múltiples rondas de amplificación de dPCR LATE. En algunas realizaciones, la cuantificación de particiones múltiples (por ejemplo 5 ... 10 ... 100 ... 1000 ... 10.000, etc.) proporciona la cuantificación de la muestra global original.

**[0027]** En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento (por ejemplo cdPCR, dPCR LATE, etc.) extienden la cuantificación más allá del rango alcanzable por métodos típicos dPCR que emplean análisis de Poisson. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención (por ejemplo, cdPCR, dPCR LATE, etc.) extienden la cuantificación de los ácidos nucleicos diana a las concentraciones de ácido nucleico de la muestra en donde la suposición digital (es decir, cero o 1 moléculas de ácido nucleico por partición) y/o la relación reactiva/métodos fallan. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención (por ejemplo, cdPCR, dPCR LATE, etc.) se realizan en una única reacción (por ejemplo, muchas particiones dentro de un único volumen de reacción). En algunas realizaciones, la dilución no es necesaria con los métodos descritos en este documento (por ejemplo, cdPCR, dPCR LATE, etc.). En algunas realizaciones, un conocimiento *a priori* del rango de concentración de ácido nucleico no es necesario con los métodos descritos en este documento (por ejemplo cdPCR, dPCR LATE, etc.). En algunas realizaciones, los métodos (por ejemplo, cdPCR) proporcionan la cuantificación de ácido nucleico diana sin una curva de calibración de ensayo.

**[0028]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona condiciones en las que el número de particiones con cero copias de destino es insuficiente para permitir la aplicación de la estadística de Poisson, que proporciona un mayor rango de cuantificación, una mayor precisión, y/o mejora de la precisión en la medición de la magnitud de la respuesta de pequeña señal.

**[0029]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos que comprenden, pero no se limitan a, una o más de las etapas de: (I) la partición de una muestra (por ejemplo, la generación de gotitas), (II) de amplificación (III) de detección de amplicón/cuantificación, y (IV) clasificación/aislamiento de amplicones,

abordándose cada uno de los cuales a continuación.

## I. La partición

- 5 **[0030]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas, dispositivos y métodos para dividir los volúmenes de líquidos y/o reactivos en particiones (por ejemplo, gotas, microvolúmenes, subvolúmenes, etc.). En algunas realizaciones, la presente invención utiliza sistemas de partición, dispositivos y/o métodos. En algunas realizaciones, los métodos y sistemas de partición ejemplares incluyen uno o más de emulsificación, actuación de gotitas, plataformas microfluídicas, microfluidos de flujo continuo, inmovilización de reactivos y combinaciones de los mismos.
- 10 **[0031]** En algunas realizaciones, la partición se realiza para generar particiones de microvolumen que contienen un pequeño número de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 0-1000, 2-500, 10-100, etc.) en comparación con el número de moléculas de ácido nucleico presentes en la muestra a granel. En algunas realizaciones, los métodos de partición descritos en el presente documento son incapaces de conseguir 0 o 1 moléculas de ácido nucleico por partición, sin dificultad indebida (por ejemplo demasiadas particiones), debido a la alta concentración de ácido nucleico en la muestra global. En algunas realizaciones, una o más moléculas de ácido nucleico del estándar interno (EI) se añaden a una muestra antes o después de la partición. En algunas realizaciones, el EI se añade en una concentración lo suficientemente pequeña como para que cada partición contenga cero o 1 moléculas EI. En algunas realizaciones, el EI se añade a una concentración en la que algunas particiones pueden tener más de 1 molécula EI. En algunas realizaciones, la concentración de EI es determinable utilizando el análisis de Poisson.
- 15 **[0032]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas, métodos y dispositivos para dividir un volumen mayor en particiones (por ejemplo, gotas) por emulsificación (Nakano et al. J Biotechnol 2003; 102: 117-124; Margulies et al. Nature 2005; 437: 376-380). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas y métodos para generar gotitas "agua-en-aceite" (Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20100173394).
- 20 **[0033]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas de microfluidos, métodos y dispositivos para particionar un volumen mayor en particiones (Sol. Pat. EE.UU. N° 20100236929; Sol. Pat. EE.UU. N° 20100311599; Sol. Pat. EE.UU. N° 20100163412; Pat. EE.UU. N° 7.851.184).
- 25 **[0034]** En algunas realizaciones, los sistemas microfluídicos están configurados para generar gotas monodispersas (Besa et al Anal Chem 2008 1 de diciembre; 80 (23): 8975-8981).
- 30 **[0035]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas de microfluidos para la manipulación de muestras y/o de partición. En algunas realizaciones, un sistema de microfluídica comprende uno o más de los canales, válvulas, bombas, etc. (Pat. de EE.UU. N° 7,842,248).
- 35 **[0036]** En algunas realizaciones, un sistema de microfluidos es un sistema de microfluídica de flujo continuo (Kopp et al., Science, vol. 280, pp. 1046-1048, 1998).
- 40 **[0037]** En algunas realizaciones, la microarquitectura de la presente invención incluye, pero no se limita a los microcanales, placas de microfluidos, microcanales fijos, redes de microcanales, bombas internas; bombas externas, las válvulas, los elementos de fuerza centrífuga, etc. En algunas realizaciones, la microarquitectura de la presente invención (por ejemplo, microaccionador de gotas, plataforma microfluídica, y/o microfluídica de flujo continuo) se complementa o se suplementa con técnicas de manipulación de gotas, incluyendo, pero no limitado a medios eléctricos (por ejemplo, accionamiento electrostático, dielectroforénesis), magnéticos, térmicos (por ejemplo, efectos térmicos Marangoni, termocapilarios), mecánicos (por ejemplo, ondas acústicas de superficie, microbombeo, peristálticos), ópticos (por ejemplo, opto-electrohúmedantes, pinzas ópticas), y medios químicos (por ejemplo, gradientes químicos). En algunas realizaciones, un microaccionador de gotas se complementa con una plataforma microfluídica (por ejemplo, los componentes de flujo continuo) y dicha combinación se acerca a operaciones de gotas discretas y elementos microfluídicos están dentro del alcance de la invención.
- 45 **[0038]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un microaccionador de gotas. En algunas realizaciones, un microaccionador de gotas es capaz de efectuar la manipulación de las gotitas y/o operaciones, tales como la dispensación, la división, el transporte, la fusión, mezcla, agitación, y similares. En algunas formas de realización la invención emplea estructuras de operación de la gota y técnicas descritas en la patente de EE.UU. N° 6.911.132, titulada "Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques", emitida el 28 de junio de 2005 a Pamula et al.; solicitud de patente de EE.UU. US 20060194331, titulada "Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board", presentada el 30 de enero de 2006; Patente de EE.UU. N° 6.773.566, titulada "Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same," emitida el 10 de agosto de 2004 y la Patente de EE.UU. N° 6.565.727, titulada "Actuators for Microfluidics Without Moving Parts", emitida el 24 de enero de 2000, tanto para Shenderov et al.; la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20060254933, titulada "Device for transporting liquid and system for analyzing", publicada el 16 de noviembre de 2006 por Adachi et al. Manipulación de la gota, en algunas formas de realización, se lleva a cabo utilizando campo eléctrico de actuación mediada. En tales formas de realización, los electrodos están acoplados electrónicamente a un medio para el control de las conexiones eléctricas del microaccionador de gotas. Un microaccionador de gotas a modo de ejemplo incluye un sustrato que incluye una ruta de acceso y/o matriz de electrodos. En algunas realizaciones, un microaccionador de gotas incluye dos sustratos paralelos separados por un hueco, y una serie de electrodos en uno o ambos sustratos. Uno o ambos de los sustratos puede ser una placa.
- 50 **[0039]** En algunas realizaciones, objetivos de ácido nucleico, cebadores y/o sondas para el uso en formas de realización de la presente invención se inmovilizan en una superficie, por ejemplo, un sustrato, placa, matriz, perla, partícula, etc. En algunas realizaciones, la inmovilización de uno o más reactivos proporciona (o ayuda a) uno o más de: la partición de los reactivos (por ejemplo, EI, ácidos nucleicos diana, cebadores, sondas, etc.), controlando el
- 55
- 60
- 65

número de reactivos por partición, y/o el control de la proporción de un reactivo a otro en cada partición. En algunas realizaciones, los reactivos de ensayo y/o ácidos nucleicos diana se inmovilizan a una superficie al tiempo que conserva la capacidad de interactuar y/o reaccionar con otros reactivos (por ejemplo reactivos dispensados desde una plataforma de microfluidos, un microaccionador de gotas, etc.). En algunas realizaciones, los reactivos (por ejemplo, EI, ácidos nucleicos diana, cebadores, sondas, etc.) están inmovilizados sobre un sustrato y las gotitas o reactivos con particiones se ponen en contacto con los regentes inmovilizados. En algunas formas de realización, la inmovilización de reactivos está implicada en otros métodos y etapas de la presente invención (por ejemplo, análisis de secuencias). Las técnicas para la inmovilización de ácidos nucleicos y otros reactivos a superficies se conocen bien por expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.472.881; Taira et al. Biotechnol Bioeng 2005 30 de marzo; 89(7):835-8).

## II. Amplificación

**[0040]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, etc.). En algunas realizaciones, la amplificación se lleva a cabo en una muestra que se ha dividido en particiones (por ejemplo, gotitas). En algunas realizaciones, una reacción de amplificación se lleva a cabo dentro de cada partición. En algunas realizaciones, una partición contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación de ácido nucleico (por ejemplo cebadores, polimerasa, desoxinucleótidos, plantilla (por ejemplo, diana, estándar interno, etc.), etc.). En algunas realizaciones, la amplificación se realiza usando métodos dPCR, donde el número de subvolúmenes que contienen 0 diana es inexistente o es demasiado bajo para aplicar la estadística de Poisson.

**[0041]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, imprimaciones, tampones, sales, dianas de ácido nucleico, etc.) y métodos para la amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR digital, amplificación de gotita digital, amplificación PCR, amplificación repartida, cdPCR, dPCR LATE, combinaciones de los mismos, etc.). En algunas realizaciones, una reacción de amplificación es una reacción en la que la replicación del ácido nucleico se produce repetidamente en el tiempo para formar múltiples copias de al menos un segmento de una plantilla o molécula diana de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN). En algunas realizaciones, la reacción de amplificación se consigue mediante el ciclo térmico repetido. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación se consigue isotérmicamente. En algunas realizaciones, la amplificación genera un aumento exponencial o lineal en el número de copias del ácido nucleico de molde. Las amplificaciones pueden producir más de un aumento de 1.000 veces en la plantilla de número de copia y/o señal de detección de focalización. Reacciones de amplificación ejemplares incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o reacción en cadena de la ligasa (LCR), siendo cada uno de ellas accionada por el ciclo térmico. Las amplificaciones se utilizan en el método o ensayos de la presente invención pueden llevarse a cabo a granel y/o volúmenes de particiones (por ejemplo, gotitas). Reacciones de amplificación alternativas, que pueden llevarse a cabo isotérmicamente, también encuentran uso en el presente documento, tales como ensayos de sonda de ADN ramificados, cascada-RCA, amplificación dependiente de la helicasa, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación basada en ácido nucleico (NASBA), reacción de amplificación enzimática mellar (NEAR), PAN-AC, amplificación de la replicasa Q-beta, replicación de círculo rodante (RCA), replicación de secuencia autosostenible, amplificación por desplazamiento de cadena, y similares.

**[0042]** La amplificación puede realizarse con cualesquiera reactivos adecuados (por ejemplo, ácido nucleico molde (por ejemplo, ADN o ARN), cebadores, sondas, tampones, enzimas de replicación catalizadoras (por ejemplo, Polimerasa de ADN, Polimerasa de ARN), nucleótidos, sales (por ejemplo,  $MgCl_2$ ), etc. en algunas realizaciones, una mezcla de amplificación incluye cualquier combinación de al menos un cebador o par de cebadores, al menos una sonda, al menos una enzima de replicación (por ejemplo, al menos una polimerasa, tal como al menos uno de ADN y/o polimerasa de ARN), y desoxinucleótido (y/o nucleótidos) trifosfatos (dNTPs y/o NTPs), etc.

**[0043]** En algunas realizaciones, la presente invención utiliza la amplificación de ácido nucleico que se basa en la alternancia de ciclos de calentamiento y enfriamiento (es decir, ciclos térmicos) para lograr las sucesivas rondas de replicación (por ejemplo, PCR). En algunas realizaciones, se utiliza la PCR para amplificar los ácidos nucleicos diana (por ejemplo, dianas particionadas). La PCR puede ser realizada por los ciclos térmicos entre dos o más puntos de ajuste de temperatura, tales como una mayor temperatura de fusión (desnaturalización) y una temperatura de recocido inferior/extensión, o entre tres o más puntos de ajuste de temperatura, tal como una temperatura de fusión más alta, una temperatura de recocido más baja y una temperatura de extensión intermedia, entre otros. PCR se puede realizar con una polimerasa termoestable, tal como Polimerasa de ADN Taq (por ejemplo, enzima de tipo salvaje, un fragmento Stoffel, polimerasa FastStart, etc.), polimerasa de ADN Pfu, polimerasa S-Tbr, polimerasa Tth, polimerasa Vent, o una combinación de los mismos, entre otros. Los métodos de PCR típicos producen un aumento exponencial en la cantidad de un producto de amplificación durante ciclos sucesivos, aunque los métodos de PCR lineales también encuentran uso en la presente invención.

**[0044]** Cualquier metodología de PCR adecuado, combinación de metodologías de PCR, o combinación de técnicas de amplificación se pueden utilizar en los métodos de particiones (detección basada en la gotita, por ejemplo, la separación, y/o secuenciación de ácidos nucleicos diana) descritos en el presente documento, tales como cdPCR, dPCR LATE, PCR de alelo-específico, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, PCR de punto final, PCR de inicio caliente, PCR in situ, PCR de intersecuencia específica, PCR inversa, PCR lineal después de exponencial, PCR mediada por ligadura, PCR de metilación específica, PCR minicebador, amplificación de sonda dependiente de ligación multiplex, PCR multiplex, PCR anidada, PCR de extensión-solapamiento, conjunto de ciclaje de polimerasa, PCR cualitativa, PCR cuantitativa, PCR en tiempo real, RT-PCR, PCR de una sola célula, PCR de fase sólida, PCR



entrelazada térmica asimétrica, PCR de toma de contacto, o PCR universal de marcha rápida, etc.

[0045] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos dPCR (véase, por ejemplo, Ramakrishnan, American Biotechnology Laboratory 27 (8), 11-13 (2009)). En algunas realizaciones, la PCR se realiza en porciones de una muestra (por ejemplo, particiones) para determinar la presencia o ausencia, la concentración y/o número de copia de un ácido nucleico diana en la muestra, basado en la cantidad de las porciones de muestra de la ayuda de amplificación de la diana. En algunas realizaciones, la PCR se realiza en porciones de una muestra (por ejemplo, particiones) para determinar la presencia o ausencia, la concentración y/o número de copias de un ácido nucleico diana en la muestra, en base a la cuantificación de la concentración de ácido nucleico se subvolumen determinada por métodos descritos en este documento (por ejemplo, cdPCR, dPCR LATE). En algunas formas de realización, la PCR se realiza en porciones de una muestra (por ejemplo, particiones) para detectar más de un ácido nucleico diana y/o para determinar la concentración, y/o las concentraciones relativas de múltiples ácidos nucleicos diana en una muestra. En algunas realizaciones, PCR digital se realiza como punto final de PCR (por ejemplo, para cada una de las particiones). En algunas realizaciones, PCR digital se realiza como rtPCR (por ejemplo, para cada una de las particiones). En algunas realizaciones, PCR digital se realiza como dPCR LATE (por ejemplo, para cada una de las particiones). En algunas realizaciones, PCR digital se realiza como cdPCR (por ejemplo, para cada una de las particiones).

[0046] PCR convencional resulta teóricamente en una amplificación exponencial de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, el molde o el ácido nucleico diana) de una muestra a través de una serie de ciclos en la primera parte del proceso de amplificación. Al medir el número de ciclos de amplificación que se requieren para lograr un nivel de umbral de la amplificación (como en PCR en tiempo real), la concentración de partida de ácido nucleico se puede calcular. Sin embargo, hay muchos factores que afectan a la amplificación exponencial del proceso de PCR, tales como diferentes eficiencias de amplificación, la competencia de dianas de número bajo de copias con mayores dianas de concentración de los reactivos, y la interferencia con el fondo de ácido nucleico contaminante. PCR Digital es generalmente menos sensible a estos factores, ya que no se basa en la suposición de que el proceso de PCR es exponencial. En la PCR digital, moléculas de ácido nucleico individuales de la muestra inicial se distribuyen entre las particiones, y después se amplifican a niveles detectables. La distribución de estas moléculas de ácidos nucleicos diana a través de las particiones se rige por las estadísticas de Poisson. La cuantificación de dPCR es posible siempre que haya un número suficiente de particiones que contienen diana 0 para aplicar la estadística de Poisson. A medida que el número de particiones que contienen diana 0 disminuye hacia cero, la incertidumbre en el valor de cuantificación se incrementa, convirtiéndose en última instancia en no definida (infinito) cuando no haya particiones que contienen diana 0. En realizaciones en las que se analizan múltiples ácidos nucleicos diana, PCR digital proporciona una medida estadísticamente relevante de las concentraciones o proporciones a múltiples ácidos nucleicos diana. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos dPCR, o elementos de los mismos.

[0047] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona LATE PCR (Pat. de EE.UU. Nº 7,632,642), o elementos de los mismos. En algunas realizaciones métodos LATE-PCR se llevan a cabo en un formato digital (por ejemplo dPCR LATE). En algunas realizaciones, los métodos de PCR LATE se llevan a cabo sobre una muestra con particiones. En algunas formas de realización, técnicas LATE-PCR se utilizan para la amplificación de una muestra con particiones (por ejemplo, muestra digital o no digital). En algunas realizaciones, LATE-PCR o dPCR LATE es una amplificación de ADN no simétrica empleando el proceso de reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando un cebador de oligonucleótido (el "cebador en exceso") por exceso de al menos cinco veces con respecto al otro cebador (el "cebador limitante"), que a su vez se utiliza a una concentración baja, de hasta 200 nM, a fin de agotarse en ciclos de PCR aproximadamente suficientes para producir amplicón de doble cadena de fluorescencia detectable, en el que la temperatura de fusión de concentración ajustada del cebador limitante al comienzo de la amplificación,  $T_m[0]^L$ , no es más de 5°C por debajo de la temperatura de fusión de la concentración ajustada del cebador en exceso al comienzo de la amplificación,  $T_m[0]^X$ , preferiblemente al menos tan alto y más preferiblemente de 3 a 10°C más alto; y en la que el ciclaje térmico se continúa durante múltiples ciclos después del agotamiento del cebador limitante para producir el producto de una sola cadena, es decir, el producto de extensión del cebador en exceso, a veces denominado "hebra de cebador en exceso".

[0048] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona PCR competitiva (por ejemplo cdPCR), o elementos de los mismos. PCR convencional competitiva es un método para la cuantificación diana mediante PCR de punto final, que emplea la co-amplificación de secuencias diana desconocidas e EI que comparten secuencias de los cebadores. Dado que ambas amplificaciones consumen los mismos cebadores, compiten por los recursos disponibles. Si cada reacción tiene la misma eficiencia, la relación de la concentración inicial (pre-amplificación) de ( $T_0$ ) desconocido e EI ( $EI_0$ ) a la concentración de post amplificación después de ciclos  $j$  ( $T_j$  y  $EI_j$ ) se describe con la expresión:

$$\text{Registro}(T_j/EI_j) = \text{registro}(T_0) - \text{registro}(EI_0)$$

En las aplicaciones convencionales de PCR competitiva, la utilización de este método requiere conocimiento *a priori* de  $EI_0$  o una curva de calibración para establecer la relación entre la respuesta medida y la concentración desconocida. La curva de calibración se expresa como:

$$\text{registro}(\text{respuesta diana/respuesta estándar interna}) \text{ vs. registro}(\text{[diana]}).$$

Esta respuesta produce una curva de línea relativamente recta que permite que se cuantifiquen reacciones posteriores. La curva se desvía de la línea recta en base a la similitud de las eficiencias de amplificación para las 2 dianas competitivas. En general, este método puede producir hasta aproximadamente 5 registros de cuantificación en función de la precisión de las mediciones de respuesta. Los problemas para la cuantificación asociados con el método PCR competitivo convencional incluyen el rango dinámico limitado y la imprecisión en los extremos del rango cuantitativo. Además, este método requiere la generación de la curva de calibración descrita anteriormente, debido a la variación en la concentración de ES de lote a lote, la reacción a la reacción, y otros factores. En algunas realizaciones, estos desafíos se superan mediante la realización de PCR competitiva en un formato digital.

**[0049]** En algunas realizaciones, la presente invención utiliza PCR en tiempo real, o elementos de los mismos. En algunas realizaciones, PCR en tiempo real alcanza la cuantificación mediante la lectura de la respuesta de fluorescencia de la reacción de PCR diana a intervalos de ciclo frecuentes (por ejemplo, cada ciclo), e identificar el número de ciclo en el que la señal cruza un valor umbral de respuesta. La cuantificación se basa en la eficiencia de amplificación y el número de ciclos o eventos de amplificación que se requieren para producir una concentración detectable de producto. Los problemas para la cuantificación asociados con PCR en tiempo real se relacionan en gran parte a la determinación de dianas de copia bajas en la presencia de otras amplificaciones, tal como para otras dianas de alto título o amplificaciones no específicas, por ejemplo, dímeros de cebadores. Otros desafíos incluyen la amplificación en presencia de ácido nucleico no de amplificación (por ejemplo, ADN genómico) que puede interferir con el proceso de amplificación y suprimir las respuestas bajas de amplificación de la copia. PCR en tiempo real también requiere algún tipo de calibración, típicamente una curva de calibración dentro del lote o almacenada, o un estándar de cuantificación de referencia (QS) de concentración conocida en cada reacción que define la relación entre el número de ciclo y la concentración.

**[0050]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona técnicas de amplificación (por ejemplo dPCR LATE, cdPCR, combinaciones de los mismos, etc.) capaces de extender el rango dinámico para dPCR y el logro de la cuantificación precisa en y más allá del extremo superior del rango cuantitativo. En algunas realizaciones, los métodos de amplificación y análisis descritos en este documento (por ejemplo dPCR LATE, cdPCR, combinaciones de los mismos, etc.) proporcionan una extensión del rango dinámico de dPCR hasta 8 órdenes de magnitud (por ejemplo, 5 órdenes de magnitud ... 6 órdenes de magnitud ... 7 órdenes de magnitud ... 8 órdenes de magnitud). En algunas realizaciones, los métodos de amplificación y análisis descritos en este documento (por ejemplo dPCR LATE, cdPCR, combinaciones de los mismos, etc.) proporcionan una extensión del rango dinámico dPCR por hasta tres registros sobre lo obtenible mediante el análisis de Poisson (por ejemplo, la extensión de 1 orden de magnitud, extensión de 2 órdenes de magnitud, la extensión de 3 órdenes de magnitud).

### III. Detección/cuantificación de amplicón

**[0051]** En algunas realizaciones, una muestra se reparte usando cualquier método adecuado, y un procedimiento de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo cdPCR, dPCR LATE, etc.) se lleva a cabo para amplificar ácidos nucleicos diana presentes en una o más de las particiones. En algunas formas de realización, se proporciona un método de cuantificación para cuantificar los amplicones producidos por las reacciones de amplificación en cada partición. En algunas formas de realización, la cuantificación se lleva a cabo después de la amplificación (por ejemplo, detección de punto final). En algunas formas de realización la cuantificación se realiza en tiempo real (por ejemplo, cuantificación de amplicón después de cada ronda de amplificación). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona sistemas, dispositivos, métodos y composiciones para detectar la presencia y/o cuantificar los ácidos nucleicos (por ejemplo amplicones (por ejemplo, amplicones de EI, amplicones diana), ácidos nucleicos marcados) en una muestra o partición. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona la detección de la presencia de amplicones en particiones. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la cuantificación de los amplicones (por ejemplo, amplicones de EI, amplicones diana) en una partición. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la cuantificación relativa de diana y amplicones de EI. En algunas formas de realización, la cuantificación de amplificación consiste en la medición o detección de una característica de particiones y/o amplicones, tales como un aspecto químico, de luminiscencia, o eléctrico físico, que se correlaciona con la amplificación (por ejemplo, fluorescencia, luminiscencia, radioactividad, u otra señal detectable) y permite la cuantificación de amplicón. En algunas formas de realización, la cuantificación de amplificación se lleva a cabo por una técnica de detección de fluorescencia.

**[0052]** En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de detección por fluorescencia para la detección/cuantificación de ácidos nucleicos amplificados. Además de los reactivos ya discutidos, y los conocidos por los expertos en la técnica de amplificación y cuantificación de ácido nucleico, diversos reactivos de detección se proporcionan, tales como colorantes y sondas fluorescentes y no fluorescentes. Por ejemplo, los protocolos pueden emplear reactivos adecuados para su uso en una reacción de TaqMan™, tal como una sonda TaqMan™; reactivos adecuados para su uso en un sistema de detección de fluorescencia SYBR Green; reactivos adecuados para su uso en una reacción de baliza molecular, tales como sondas de baliza molecular; reactivos adecuados para su uso en una reacción de escorpión, tales como una sonda escorpión; reactivos adecuados para su uso en una reacción de tipo tinte de unión a ADN fluorescente, tal como una sonda fluorescente; y/o reactivos para su uso en un protocolo de LightUp, tal como una sonda LightUp. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos y composiciones para la cuantificación de una señal detectable (por ejemplo, fluorescencia) de las particiones que contienen ácido nucleico amplificado (por ejemplo, los amplicones diana, amplicones de EI, etc.). Así, por ejemplo, los métodos pueden emplear el etiquetado (por ejemplo, durante la amplificación, post-amplificación) ácidos nucleicos amplificados con un marcador detectable, exponiendo particiones a una fuente de luz a una longitud de

onda seleccionada para causar la fluorescencia del tinte de sonda atado de amplicón, y la detección y/o medición de la fluorescencia resultante. La fluorescencia emitida desde las particiones se puede seguir durante la reacción de amplificación para permitir la vigilancia de la reacción (por ejemplo, el uso de un compuesto de tipo SYBR Green), o la fluorescencia se puede medir post-amplificación.

5 **[0053]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para detectar y/o cuantificar la presencia de un ácido nucleico diana en particiones, proporcionando una sonda con especificidad para un ácido nucleico diana (por ejemplo, una sonda de tipo TaqMan™) en la amplificación con particiones reacciones, y la detección/medición de la fluorescencia resultante. En algunas realizaciones, las particiones que contienen ácido nucleico amplificado (por ejemplo amplicones del objetivo, es amplicones, etc.) exhibirán fluorescencia de post amplificación cuantificable. En algunas realizaciones, la detección de una señal fluorescente es indicativa de la presencia del ácido nucleico molde (por ejemplo, EI, diana) en la partición.

10 **[0054]** La presente invención proporciona métodos correspondientes para el uso de otras sondas adecuadas de diana específica (por ejemplo, tintes de intercalación, sondas escorpión, balizas moleculares, etc.), como se entendería por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la cuantificación de los ácidos nucleicos amplificados utilizando uno o más de etiquetado fluorescente, tintes de intercalación fluorescentes, los métodos de detección basados en FRET (Patente de EE.UU. Nº 5.945.283;. Publicación PCT WO 97/22719), PCR cuantitativa, métodos fluorogénicos en tiempo real (Pat. de EE.UU. Nºs 5.210.015 a Gelfand, 5.538.848 a Livak, et al., y 5.863.736 a Haaland, así como Heid, C.A., et al., Genome Research, 6: 986-994 (1996); Gibson, U.E.M., et al., Genome Research 6: 995-1001 (1996); Holland, P.M., et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 88: 7276-7280, (1991); y Livak, KJ, et al., PCR Methods and Applications 357-362 (1995)), balizas moleculares (Piatek, AS, et al., NatBiotechnol 16: 359-63 (1998); Tyagi, S. y Kramer, F.R., Nature Biotechnology 14: 303-308 (1996); y Tyagi, S. et al., NatBiotechnol 16: 49-53 (1998)), ensayos Invader™ (Third Wave Technologies, (Madison, Wisconsin))(Neri, B.P., et al., Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis 3826: 117-125, 2000), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA; véase, por ejemplo, Compton, J. Nucleic Acid Sequence-based Amplification, Nature 350: 91-91, 1991), sondas escorpión (Thelwell, et al. Nucleic Acids Research, 28: 3.752-3761, 2000), la detección de ADN capacitiva (véase, por ejemplo, Sohn, et al (2000) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 97: 10687-1 0690), etc.

20 **[0055]** En algunas realizaciones, los métodos de etiquetado se utilizan para etiquetar diferencialmente diferentes amplicones. En algunas formas de realización, amplicones EI y amplicones se marcan diferencialmente para permitir la detección y cuantificación por separado. En algunas realizaciones, amplicones EI y amplicones se marcan diferencialmente para permitir la clasificación de particiones que contienen EI de particiones sin amplicones ES. En algunas realizaciones, diferentes secuencias diana se marcan diferencialmente para permitir la detección y cuantificación por separado. En algunas realizaciones, diferentes secuencias diana se marcan diferencialmente para permitir la clasificación de una diana de otra. En algunas formas de realización, el etiquetado diferencial se consigue a través de sondas específicas de etiquetado de forma detectable de secuencia con diferentes etiquetas fluorescentes.

#### IV. Aislamiento de amplicón

40 **[0056]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para clasificar y/o aislar el ácido nucleico amplificado. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para clasificar y/o aislar las particiones que contienen ácido nucleico amplificado. En algunas formas de realización, después de la amplificación de secuencias y/o detección de amplicones, las particiones se ordenan según los amplicones contenidos en los mismos (por ejemplo, EI v. no EI, presencia de un amplicón en particular, etc.), para la posterior manipulación (por ejemplo, re-amplificación, etiquetado, digestión de restricción, etc.) y/o análisis (por ejemplo la secuenciación, detección de masas, etc.).

45 **[0057]** En algunas realizaciones, los amplicones se etiquetan con marcadores detectables y/o manipulables (por ejemplo, tintes fluorescentes), durante o después de la amplificación, por métodos aceptados comprendidos por expertos en la técnica (por ejemplo, la intercalación, la incorporación, la hibridación, etc.) En algunas formas de realización, las particiones que contienen amplicones marcados se detectan y/o se ordenan (por ejemplo, separados de particiones que no contienen amplicón, agrupados de acuerdo a la presencia de una etiqueta en particular, etc.). En algunas realizaciones, las particiones que contienen amplicones EI están ordenadas de partición que no contienen amplicones de EI. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las particiones que contienen amplicón se separan mecánicamente por micromanipulador, electroforesis, citometría de flujo, u otras técnicas de clasificación conocidas por expertos en la técnica. Las siguientes referencias proporcionan una guía para la selección de medios para el análisis y/o la clasificación de micropartículas: Pace, la patente de EE.UU. Nº 4.908.112; Saur et al., Patente de EE.UU. Nº 4.710.472; Senyei et al., Patente de EE.UU. Nº 4.230.685; Wilding et al., Patente de EE.UU. Nº 5.637.469; Penniman et al., Patente de EE.UU. Nº 4.661.225; Kamaukhov et al., Patente de EE.UU. Nº 4.354.114; Abbott et al., Patente de EE.UU. Nº 5.104.791; Gavin et al., Publicación PCT WO 97/403 83.

50 **[0058]** En algunas realizaciones, particiones que contienen cadenas de ADN marcadas con fluorescencia se detectan, se clasifican, se aíslan, y/o se ordenan por células activadas por fluorescencia (FACS; véase, por ejemplo, Van Dilla et al., Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis. (Academic Press, New York, 1985); Fulwyler et al., Patente de EE.UU. Nº 3.710.933; Gray et al., Patente de EE.UU. Nº 4.361.400; Dolbeare et al., Patente de EE.UU. Nº 4.812.394.

65 **[0059]** En algunas realizaciones, los amplicones están marcados con fluorescencia con etiquetas fluorescentes detectables y/o manipulables, durante o después de la amplificación, por métodos aceptados comprendidos por

expertos en la técnica (por ejemplo, la intercalación, la incorporación, la hibridación, etc.). En algunas formas de realización, tras la excitación con una o más fuentes de luz de alta intensidad, tal como un láser, una lámpara de arco de mercurio, o similares, cada partición que contiene ácidos nucleicos amplificados (y etiquetados) (por ejemplo, amplicón diana, amplicón EI, etc.) generará señales fluorescentes. En algunas formas de realización, las particiones que exhiben fluorescencia por encima de fondo, o por encima de un nivel de umbral, están ordenadas por un instrumento FACS, de acuerdo con métodos entendidos por expertos en la técnica. Así, en algunas formas de realización, las particiones se ordenan según su señal óptica relativa, y se recogen para su posterior análisis mediante la acumulación de las particiones que generan una señal dentro de un rango predeterminado de valores correspondientes a la presencia de ácido nucleico diana amplificado. En algunas formas de realización, las particiones se clasifican y se transfieren a recipientes de reacción y/o plataformas adecuadas para su posterior manipulación, procesamiento y/o análisis.

#### V. Muestras

- 15 **[0060]** En algunas realizaciones, los métodos, composiciones, sistemas y dispositivos de la presente invención hacen uso de muestras que incluyen un molde de ácido nucleico. Las muestras se pueden derivar de cualquier fuente adecuada, y para fines relacionados con cualquier campo, incluyendo pero no limitado al diagnóstico, investigación, medicina forense, epidemiología, patología, arqueología, etc. Una muestra puede ser biológica, ambiental, forense, veterinaria, clínica, etc. en origen. Las muestras pueden incluir ácido nucleico derivado de cualquier fuente adecuada, incluyendo eucariotas, procariotas (por ejemplo, bacterias infecciosas), mamíferos, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, bovinos, equinos, porcinos, ratones, virus, etc. Las muestras pueden contener, por ejemplo, organismos enteros, órganos, tejidos, células, orgánulos (por ejemplo, cloroplastos, mitocondrias), ácido nucleico sintético, lisados celulares, etc. ácido nucleico presente en una muestra (por ejemplo, el ácido nucleico diana, el ácido nucleico de molde, ácidos nucleicos no dianas, ácido nucleico contaminante puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, ADN genómico, ARN, plásmidos, bacteriófagos, origen sintético, origen natural, y/o secuencias artificiales (de origen no natural), secuencias producidas sintéticamente pero de origen natural, etc. Especímenes biológicos pueden, por ejemplo, incluir la sangre completa, el fluido linfático, suero, plasma, bucal, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, líquido seminal, excreciones vaginales, fluido seroso, líquido sinovial, fluido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido quístico, bilis, orina, fluidos gástricos, fluidos intestinales, las muestras de heces y frotis, aspirados (médula ósea, con aguja fina) o lavados (por ejemplo, oral, nasopharangeal, bronquial, bronquiolitis alveolar, óptico, rectal, intestinal, vaginal, epidérmico, etc.) y/u otras muestras frescas, congeladas, cultivadas, conservadas (PAXgene, RNAlater, RNasin, etc.) o archivadas (formalina fija de parafina incorporada (FFPE), célula fija/gránulo de linfocitos, etc.) biológicas.
- 35 **[0061]** En algunas realizaciones, las muestras que encuentran uso con la presente invención son muestras mixtas (por ejemplo, que contienen poblaciones de ácidos nucleicos mezclados). En algunas realizaciones, las muestras analizadas por métodos de la presente invención contienen, o pueden contener, una pluralidad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo,  $1 \dots 10 \dots 10^2 \dots 10^3 \dots 10^4 \dots 10^5 \dots 10^6 \dots 10^7, 10^8 \dots 10^9$ , etc.) que contienen una secuencia diana de interés en una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene cero moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia diana de interés en una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene moléculas de ácido nucleico con una pluralidad de diferentes secuencias que contienen todos una secuencia diana de interés. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo,  $1 \dots 10 \dots 10^2 \dots 10^3 \dots 10^4 \dots 10^5 \dots 10^6 \dots 10^7 \dots 10^8 \dots 10^9$ , etc.) que no contienen una secuencia diana de interés en una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene cero moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana de interés en una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo muestra mixta) contiene moléculas de ácido nucleico con una pluralidad de diferentes secuencias que no contienen una secuencia diana de interés. En algunas realizaciones, una muestra contiene más moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana que las moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana (por ejemplo,  $1,01: 1 \dots 2: 1 \dots 5: 1 \dots 10: 1 \dots 20: 1 \dots 50: 1 \dots 10^2: 1 \dots 10^3: 1 \dots 10^4: 1 \dots 10^5: 1 \dots 10^6: 1 \dots 10^7: 1$ ). En algunas realizaciones, una muestra contiene más moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia diana que las moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana (por ejemplo,  $1,01: 1 \dots 2: 1 \dots 5: 1 \dots 10: 1 \dots 20: 1 \dots 50: 1 \dots 10^2: 1 \dots 10^3: 1 \dots 10^4: 1 \dots 10^5: 1 \dots 10^6: 1 \dots 10^7: 1$ ). En algunas realizaciones, una muestra contiene una única secuencia diana que puede estar presente en una o más moléculas de ácido nucleico en la muestra. En algunas realizaciones, una muestra contiene dos o más secuencias diana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5  $\dots 10 \dots 20 \dots 50 \dots 100$ , etc.) que pueden estar presentes en una o más moléculas de ácido nucleico en la muestra.
- 60 **[0062]** En algunas realizaciones, una muestra comprende una concentración de moléculas de ácido nucleico que es suficientemente alta para hacer no factible la partición de la muestra en particiones, conteniendo algunas de las particiones cero molécula de ácido nucleico (por ejemplo, la muestra requeriría demasiadas particiones para el análisis).
- 65 **[0063]** En algunas realizaciones, diversas etapas de procesamiento de la muestra pueden realizarse para preparar las moléculas de ácido nucleico dentro de una muestra, incluyendo, pero no limitado a la lisis celular, la digestión de restricción, la purificación, la precipitación, la resuspensión (por ejemplo, en tampón de amplificación), diálisis, etc. En algunas realizaciones, el procesamiento de las muestras se lleva a cabo antes o después de cualquiera de los

pasos de la presente invención incluyendo, pero no limitado a la partición, la amplificación, la re-amplificación), la detección de amplicón, el aislamiento de amplicón, la secuenciación, etc.

EXPERIMENTAL

5

Ejemplo 1

dPCR competitiva

10 **[0064]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona cuantificación de métodos de una o más secuencias de ácido nucleico diana utilizando cdPCR (véase FIG. 1). Algunas realizaciones de la presente invención que utiliza cdPCR se realizan utilizando uno o más de los siguientes reactivos, procedimientos y análisis.

15 **[0065]** El ácido nucleico de la muestra se obtiene a partir de cualquier fuente adecuada, y se extrae y/o procesa de acuerdo con métodos conocidos para obtener ácido nucleico adecuado para la amplificación por PCR. Una mezcla de reacción de PCR se ha creado usando cualesquiera concentraciones usuales o adecuadas de reactivo de amplificación estándar, incluyendo: oligonucleótidos cebadores específicos para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de estándar interno, sondas fluorescentes (es decir, sondas específicas diferencialmente marcadas para la secuencia diana y la sonda), la enzima de polimerasa de ADN, tampón de amplificación, desoxinucleótidos, estándar interno (EI) de ácido nucleico, etc. El ácido nucleico de EI se añade a la mezcla de reacción tal que la concentración producirá un número suficiente de particiones que contienen 0 copias iniciales de EI por partición (por ejemplo,  $\lambda_{EI} \approx 0,01-1$ , donde  $\lambda_{EI}$  es el número medio de copias EI por partición). [En general, cuando  $\lambda_{EI} = 1$ , hay un número de particiones aproximado e igual que contienen cero copias EI iniciales y 1 copia EI inicial.] Los reactivos de PCR se añaden a la muestra de ácido nucleico en concentraciones conocidas por los expertos en la técnica como apropiadas para la amplificación por PCR (por ejemplo dPCR). La muestra después se particiona por cualesquiera métodos adecuados (por ejemplo, micro-cámaras de matriz, pocillos de la microplaca, gotitas de emulsión, microfluidos, etc.) descritos en este documento para producir subvolumenes de reacción que contienen menos de 1 (por ejemplo,  $\lambda_{EI} \approx 0,01-1$ ) molécula por partición. Las particiones se someten a condiciones de ciclaje térmico suficientes para amplificar ácidos nucleicos de molde en los subvolumenes de reacción. La fluorescencia de cada subvolumen de reacción se mide entonces para cada sonda fluorescente (por ejemplo, sonda diana, sonda EI).

20 **[0066]** La fluorescencia EI y la fluorescencia diana para cada partición están correlacionadas, y se realiza una determinación de si el ácido nucleico diana cumple con los requisitos para el análisis directo por métodos dPCR (por ejemplo, un número de particiones contiene cero moléculas diana suficientes para la evaluación cuantitativa por análisis de Poisson). Si el ácido nucleico diana no cumple con los criterios para el análisis de Poisson, las respuestas de partición se clasifican en dos grupos en función de la presencia o ausencia de amplicones de EI, es decir, que se detectó fluorescencia de la sonda de EI. Las particiones que exhiben una respuesta de EI en el grupo 1 y particiones sin respuesta EI en el grupo 2.

25 **[0067]** La respuesta de diana promedia se calcula para las particiones que contiene EI ( $I_{grupo1}$ ) de acuerdo con:

40

$$\langle I_{grupo\ 1} \rangle = \frac{\sum_i^{grupo\ 1} I_{diana}(i)}{N_1} - \langle no\ reactivo\ I_{diana} \rangle$$

45

En donde el  $^{grupo1}/_{diana}(i)$  es la intensidad medida para subvolumen de reacción  $i$ , y  $N_1$  es el número de subvolumenes que exhiben tanto al fluorescencia diana y como fluorescencia EI.  $\langle no\ reactivo/_{diana} \rangle$  es la estimación de la intensidad de fluorescencia en el canal de detección de respuesta diana cuando hay ninguna diana esté presente, a saber, el nivel de fluorescencia de fondo no reactivo.  $i$  se suma sobre las particiones  $N_1$  que exhiben tanto fluorescencia diana como fluorescencia EI.

50

**[0068]** La respuesta del objetivo promedio se calcula para el no-EI particiones ( $I_{grupo2}$ ) de acuerdo con:

55

$$\langle I_{grupo\ 2} \rangle = \frac{\sum_i^{grupo\ 2} I_{diana}(i)}{N_2} - \langle no\ reactivo\ I_{diana} \rangle$$

60

En donde  $^{grupo2}/_{diana}(i)$  es la intensidad medida de subvolumen de reacción  $i$ , y  $N_2$  es el número de subvolumenes que exhiben diana, pero no fluorescencia EI.  $i$  se suma sobre las particiones  $N_2$  que no presentan fluorescencia EI.

**[0069]** El cambio de porcentaje en respuesta diana con competencia EI se calcula de acuerdo a:

65

$$\%cambio\ con\ competencia = \frac{\langle I_{grupo\ 2} \rangle - \langle I_{grupo\ 1} \rangle}{\langle I_{grupo\ 2} \rangle} \times 100\%$$

**[0070]** El número medio de copias diana por reacción ( $\lambda$ ) se calcula a partir del % de cambio en respuesta diana con competencia EI de acuerdo a:

5

$$\lambda = \frac{1}{\% \text{cambio con competencia}} \times \frac{N_1 + N_2}{N_1} \times \ln \left[ \frac{N_1 + N_2}{N_2} \right]$$

**[0071]** El número de copias diana medido por el número total de subvolumenes de reacción se calcula a partir de  $\lambda$  multiplicando el número de particiones,  $N_1 + N_2$ . El número de copias diana en la reacción total se calcula de acuerdo con:

10

15

$$\frac{\text{copias diana}}{\text{reacción total}} = \lambda \times \frac{\text{volumen total de reacción}}{\text{volumen medio de partición}}$$

20

Ejemplo 2

dPCR LATE

25

**[0072]** La PCR digital usando mejoras en el diseño de ensayo de LATE-PCR, aprovecha el hecho de que la intensidad de fluorescencia detectada después de un número fijo de ciclos de LATE-PCR, por ejemplo, 40 ciclos, se correlaciona con la concentración de molde inicial (véase FIG. 2). El nivel de fluorescencia final después de la amplificación mediante LATE-PCR tiene una fuerte relación con el logaritmo de la concentración de partida. Por otra parte, los niveles de fluorescencia finales de dispersión muestran una reducción en LATE-PCR lineal de punto final en comparación con los valores de punto final exponenciales obtenidos por los métodos tradicionales en tiempo real, permitiendo cuantificación diana más precisa. Por lo tanto, la combinación de LATE-PCR, que genera respuestas de amplificación generalmente lineales en las últimas etapas del ciclo, proporciona un medio para extender el rango dinámico de dPCR. Con el fin de retener la especificidad de la diana deseada y evitar posibles artefactos desviados de mis-cebado, se prefiere que las temperaturas de fusión de concentración ajustada del cebador limitante en el inicio de la amplificación sea de 3-10°C más alta que la de la temperatura de fusión de concentración ajustada del cebador en exceso al comienzo de la amplificación. La cuantificación utilizando dPCR LATE puede requerir el análisis de muestras de calibración en una o más concentraciones conocidas para crear una curva de calibración correspondiente a nivel de fluorescencia final para comenzar la concentración.

30

35

40

**[0073]** Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. Varias modificaciones y variaciones de los métodos y composiciones descritas de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención comprendidos por expertos en los campos respectivos pretenden situarse dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Un método de cuantificación de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:

- 5 a) separar dicha muestra en una pluralidad de particiones, en la que dicha muestra comprende: una mezcla de moléculas de ácido nucleico, reactivos de amplificación, reactivos de detección, y una secuencia de estándar interno que tiene las mismas secuencias de unión a cebador como la secuencia diana; en el que la secuencia de estándar interno se añade a la muestra de tal manera que una parte de dicha pluralidad de particiones contiene cero moléculas de estándar interno,
- 10 en el que dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2 o más moléculas diana de ácido nucleico por partición, y en el que dicha pluralidad de particiones es un conjunto de gotitas que tiene un volumen medio de menos de aproximadamente un microlitro ( $\mu\text{L}$ );
- 15 b) tratar dicha pluralidad de particiones bajo condiciones de amplificación de manera que dichas secuencias diana se amplifican para producir amplicones diana detectables, y dichas secuencias de estándar interno se amplifican para producir amplicones estándar detectables internos, siendo dichos amplicones detectables y dichos amplicones detectables de estándar interno diferencialmente detectables;
- 20 c) determinar el cambio en la amplificación de dicha secuencia diana en respuesta a la competencia de cebador de dicha secuencia de estándar interno; y
- d) calcular el número inicial de secuencias diana para la muestra.

2. El método de la reivindicación 1, en el que:

- (i) dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2-100 moléculas de ácido nucleico diana por partición;
- 25 (ii) dicha pluralidad de particiones comprenden, en promedio, 10 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición; o
- (iii) dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 100 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:

- (i) dichos reactivos de amplificación comprenden cebadores configurados para hibridar con secuencias idénticas en dicha secuencia diana y dicha secuencia de estándar interno;
- 35 (ii) dicho reactivo de detección comprende una primera sonda marcada configurada para unirse a dicha secuencia diana, y una segunda sonda marcada configurada para unirse a dicha secuencia de estándar interno, en la que dicha primera sonda marcada y dicha segunda sonda marcada son diferencialmente detectables; o
- (iii) dicha muestra se selecciona de una muestra ambiental, una muestra biológica, una muestra clínica, y una muestra forense.

4. El método de la reivindicación 3 (ii), en el que dicha primera sonda marcada y dicha segunda sonda marcada comprenden diferentes etiquetas fluorescentes.

5. Un método de cuantificación de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:

- 45 a) la separación de dicha muestra en una pluralidad de particiones, en la que dicha muestra comprende: una mezcla de moléculas de ácido nucleico, reactivos de amplificación para la amplificación de ácido nucleico no simétrico, y los reactivos de detección, en el que dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2 o más moléculas diana de ácido nucleico por partición, y en el que dicha pluralidad de particiones es un conjunto de gotitas que tiene un volumen medio de menos de aproximadamente un microlitro ( $\mu\text{L}$ );
- 50 b) amplificar una secuencia diana de ácido nucleico en la muestra por dicho proceso de amplificación de ácido nucleico no simétrico para producir amplicones diana;
- c) detectar los amplicones diana en dicha pluralidad de particiones utilizando dichos reactivos de detección; y
- 55 d) correlacionar la intensidad producida por dichos reactivos de detección después de la amplificación de la concentración inicial de dicha secuencia de ácido nucleico diana en dicha muestra.

6. El método de la reivindicación 5, en el que:

- 60 (i) dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 2-100 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición;
- (ii) dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 10 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición; o
- (iii) dicha pluralidad de particiones comprende, en promedio, 100 o más moléculas de ácido nucleico diana por partición.
- 65

7. El método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que:

- (i) dichos reactivos de amplificación comprenden un cebador de exceso y un cebador limitante;
- 5 (ii) dicho proceso de amplificación no simétrica es un proceso de amplificación PCR lineal tras exponencial (LATE-PCR);
- (iii) dichos reactivos de detección comprenden marcadores fluorescentes;
- (iv) dicha detección es una detección de punto final después de la finalización del proceso de amplificación no simétrica; o
- 10 (v) dicha muestra se selecciona de una muestra ambiental, una muestra biológica, una muestra clínica, y una muestra forense.

8. El método de la reivindicación 7 (iii), en el que dichos reactivos de detección comprenden sondas marcadas fluorescentemente



FIGURA 1

Cuantificación de descripción de determinación para la PCR digital competitiva

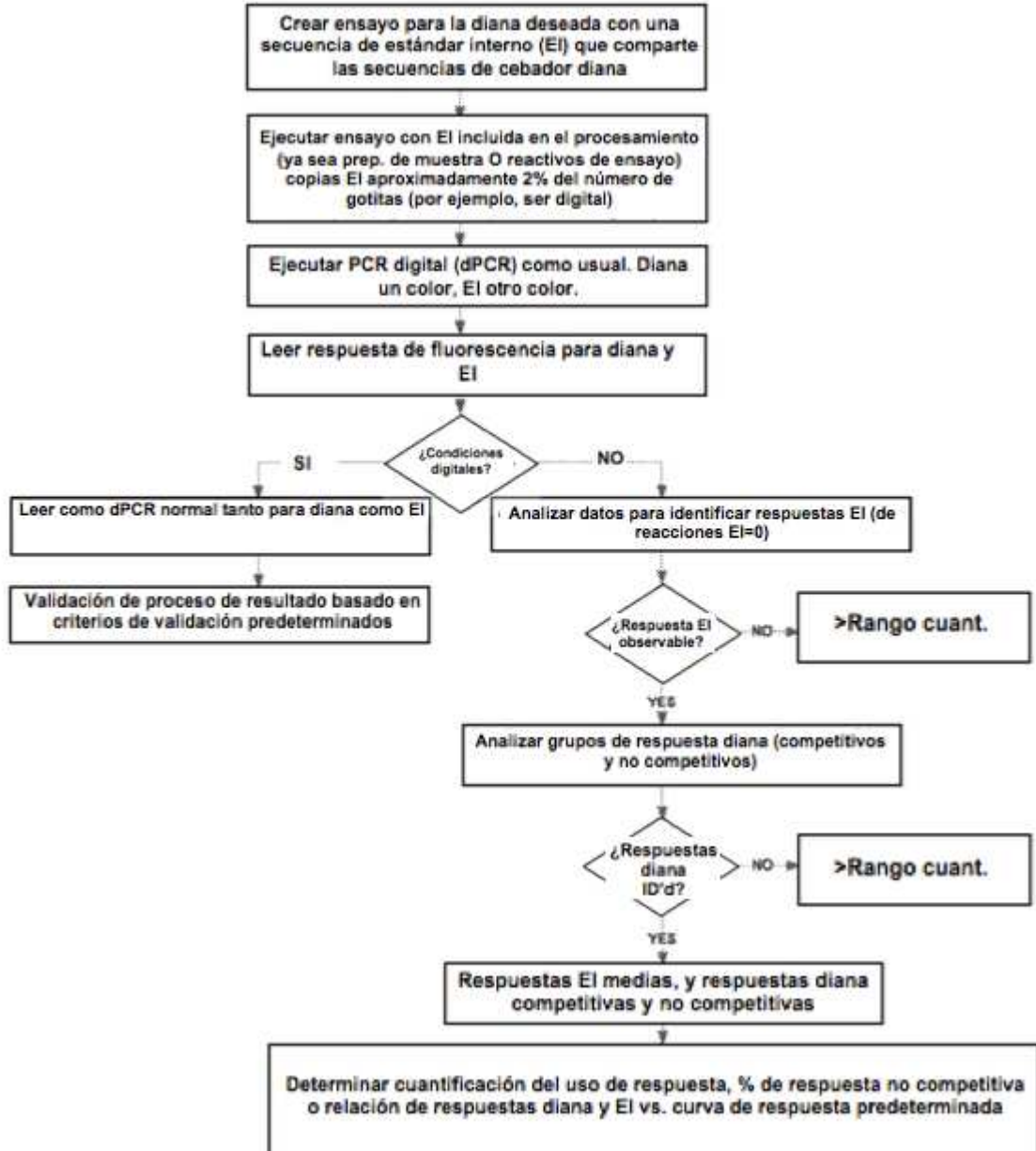


FIGURA 2

