

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 453**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/US2014/036591**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14186152**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14798247 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2997166**

54 Título: **Métodos de enriquecimiento de analito**

30 Prioridad:

13.05.2013 US 201361822695 P

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

19.02.2020

73 Titular/es:

**QIAGEN SCIENCES, LLC (100.0%)
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874, US**

72 Inventor/es:

**OLEJNIK, JERZY;
GORDON, STEVE y
WERNER, MARTINA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 453 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de enriquecimiento de analito

Campo de la invención

5 Se describen métodos y composiciones para enriquecer una población de partículas que contienen un analito. En una realización, se usan perlas de enriquecimiento que son de mayor tamaño que las perlas usadas para la amplificación. Se emplea un dispositivo de separación que puede retener perlas más grandes con perlas amplificadas unidas. La técnica encuentra muchos usos, incluido el enriquecimiento de perlas con plantilla amplificada clonalmente, que pueden usarse en una variedad de ensayos, incluida la secuenciación de ácidos nucleicos.

Antecedentes

10 La amplificación clonal por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está bien establecida. Una muestra se reparte de modo que las moléculas de ácido nucleico individuales dentro de la muestra se localizan en muchas regiones separadas. Esto se puede hacer de varias maneras, incluido el aislamiento en micropocillos, capilares, cámaras y emulsiones. El reparto de la muestra permite controlar el número de moléculas diferentes limitando la dilución. Por ejemplo, para asegurar que la instancia de dos plantillas de ácido nucleico en un compartimento es un
15 evento de baja frecuencia, la plantilla se diluye de modo que, como promedio, haya menos de una molécula de plantilla por compartimento. Como resultado, cada compartimento generalmente contendrá moléculas "0" o "1"; después de la PCR, la amplificación es negativa o positiva, respectivamente.

20 Un planteamiento para la amplificación clonal implica la amplificación en fase sólida a la dilución limitante de la plantilla en compartimentos acuosos (es decir, gotículas) en una emulsión de aceite, en donde los compartimentos contienen partículas (por ejemplo, perlas), plantilla, nucleótidos y enzima de amplificación de ácido nucleico. Después de la PCR, algunos compartimentos contienen perlas amplificadas clonalmente, pero solo con una abundancia del 10-20% (gobernada por una distribución de Poisson). Esto presenta un problema de eficiencia. Aunque se logra la amplificación clonal, simplemente hay demasiadas reacciones negativas. Si se desea llevar a cabo otra reacción o análisis adicional, esto no se puede realizar de manera eficiente en todas las perlas, ya que solo el 10-20% tendría ADN presente.

25 Lo que se necesita es una solución para este problema de eficiencia.

El documento WO2004/069849 describe un método para amplificar uno o más ácidos nucleicos que comprende las etapas de: (a) formar una emulsión de agua-en-aceite para crear una diversidad de microrreactores acuosos en donde al menos uno de los microrreactores comprende una plantilla de ácido nucleico simple, una perla simple capaz de unirse al ácido nucleico y solución para la reacción de amplificación que contiene reactivos necesarios para realizar la
30 amplificación del ácido nucleico; (b) amplificar los ácidos nucleicos en los microrreactores para formar copias de dichos ácidos nucleicos; y (c) unir las copias amplificadas a las perlas en los microrreactores.

El documento WO2005/003375 describe un método para realizar la secuenciación rápida de ADN, tal como la secuenciación genómica. El método incluye las etapas de preparar un ADN de muestra para secuenciación genómica y realizar una múltiple reacción de secuenciación en el ADN amplificado con solamente una etapa de hibridación de
35 cebador.

Chen Dan et al. describe un sistema de captura y enriquecimiento de ADN genómico diana, que podría usarse en la secuenciación profunda de regiones diana con secuenciación de la siguiente generación.

40 El documento US2007087362 enseña un método que comprende realizar la PCR en una emulsión usando un cebador inmovilizado en perlas y recuperando las perlas que contienen ácido nucleico amplificado usando perlas de enriquecimiento.

Sumario de la invención

45 La invención resuelve el problema de la baja eficiencia uniendo selectivamente partículas con amplicones de ADN con perlas de enriquecimiento (también llamadas perlas de captura) y separando perlas blanco (es decir, perlas que carecen de plantilla amplificada). Una de las realizaciones preferidas es el uso de perlas de enriquecimiento que son de mayor tamaño que las perlas utilizadas para la amplificación y un dispositivo de separación que puede retener perlas más grandes con perlas amplificadas unidas, permitiendo que las perlas no unidas pasen a través de ellas. En una realización, las perlas de enriquecimiento se modifican para comprender oligonucleótidos de captura (también llamados sondas de captura) o un ligando/compañero de unión, haciéndolos capaces de unir solamente perlas con amplicones de ADN (también llamadas perlas "vivas"). Después de realizarse la separación inicial, las partículas con amplicones se liberan de las perlas de enriquecimiento. Por ejemplo, en una realización, pueden liberarse usando el
50 mismo dispositivo de separación (por ejemplo, filtro de centrifuga) usando una solución de liberación que rompe la interacción entre la perla amplificada y la perla de enriquecimiento. Como resultado, las perlas que llevan ADN amplificado constituyen el 80-100% de la población total de perlas y sirven como una muestra mucho mejor para la secuenciación del ADN u otro análisis más adelante. No se pretende que el proceso o las composiciones se limiten a los métodos de ácido nucleico. El método y la composición son generalmente aplicables a cualquier analito.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de enriquecimiento, que comprende:

a) proporcionar

i) una emulsión que comprende uno o más compartimentos acuosos en aceite, comprendiendo al menos algunos de dichos compartimentos reactivos de PCR, un primer cebador de PCR inmovilizado en una perla de emulsión, un
5 segundo cebador de OCR biotinilado en solución y plantilla de secuencia de nucleótidos; y

ii) perlas de enriquecimiento, en donde dichas perlas de enriquecimiento son diferentes de dichas perlas de emulsión en dichos compartimentos;

b) exponer dicha emulsión a condiciones para amplificar al menos parte de dicha plantilla en al menos parte de dichas perlas de emulsión para producir una plantilla amplificada en al menos parte de dichos compartimentos; en donde un
10 cordón de dicha plantilla amplificada termina con biotina;

c) enriquecer en perlas de emulsión que comprenden dicha plantilla amplificada poniendo en contacto dichas perlas de emulsión con dichas perlas de enriquecimiento, en donde dicha plantilla amplificada se une a dichas perlas de enriquecimiento con dicha biotina para formar una población de complejos de perlas de emulsión – perlas de enriquecimiento y en donde las perlas de emulsión que no comprenden la plantilla amplificada no se unen a dichas
15 perlas de enriquecimiento; y

d) capturar al menos parte de dicha población de complejos en condiciones tales que no se capture la mayoría de dichas perlas de emulsión que no comprenden plantilla amplificada.

La presente invención puede comprender además después de la etapa d): e) someter dicha población de complejos a condiciones para separar dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada de dichas perlas de enriquecimiento de tal manera que la mayoría de dichas perlas de emulsión que comprenden plantilla amplificada se separan de dichas perlas de enriquecimiento.
20

No se pretende que la presente invención esté limitada por la manera en que se capturan las perlas de enriquecimiento. En una realización preferida, la captura en la etapa d) comprende la selección de tamaño. La presente invención contempla una variedad de técnicas de selección de tamaño. En una realización, dicha selección de tamaño comprende centrifugación de densidad. Por ejemplo, los complejos se ponen en medio relativamente denso (por ejemplo, glicerol) y se someten a centrifugación. En otra realización, dicha selección de tamaño comprende capturar dichos complejos en un filtro, por ejemplo, en la superficie de un filtro (o en el cuerpo del filtro) en condiciones tales que la mayoría de dichas perlas de emulsión que no comprenden plantilla amplificada no se capturan y estas perlas no capturadas pasan a través de dicho filtro. En una realización, las perlas de emulsión atraviesan bajo la fuerza de la gravedad. En una realización, las perlas de emulsión atraviesan bajo una presión positiva (por ejemplo, usando una jeringa). En una realización, se usa una combinación de fuerzas (por ejemplo, presión positiva y gravedad). En una realización, dicho filtro se coloca en una columna centrífuga y la separación se facilita por centrifugación.
25
30

En una realización, la presente invención contempla también la captura de complejos en una superficie no de filtro. En una realización, la superficie se modifica con un ligando de forma que se capturen las perlas.

En una realización, el cebador inverso en dicha emulsión se modifica y lleva un ligando que luego se incorpora a los amplicones. Las perlas de enriquecimiento están recubiertas con la pareja de unión que une solo las perlas que llevan amplicones modificados con un ligando. En una realización, dicha pareja de unión es estreptavidina o avidina y el ligando es biotina.
35

No se pretende que la presente invención esté limitada por las condiciones que permiten la amplificación. En una realización, la exposición a las condiciones de la etapa b) comprende ciclos de temperatura.
40

Como se señala en el presente documento, en una realización se controla la concentración de la plantilla (por ejemplo, limitando la dilución) de modo que cada compartimento comprende en promedio menos de una plantilla de ácido nucleico. Esto maximiza la frecuencia de amplificar solo una molécula de plantilla para generar una plantilla amplificada que sea homogénea.

En una realización, la presente invención contempla además romper dicha emulsión después de la etapa b) y antes de la etapa c). Esto puede hacerse de varias maneras (discutido más adelante) y libera las perlas de emulsión de sus compartimentos. Además, se elimina el aceite.
45

No se pretende que la presente invención esté limitada por la forma en la que las perlas de emulsión se unen a las perlas de enriquecimiento. En una realización, los oligos de captura están en las perlas de enriquecimiento. En otra realización, un ligando de unión está en la perla de enriquecimiento. Con respecto a esto último, en una realización la presente invención contempla que dicho segundo cebador comprenda una primera parte de una pareja de interacción, y en el que dichas perlas de enriquecimiento comprendan la segunda parte de dicho par de interacción. En una realización, dicho par de interacción es biotina y estreptavidina (o avidina). En una realización, dicho segundo cebador está biotinilado de manera tal que una cadena de dicha plantilla amplificada termina con una biotina, y en donde dichas
50

perlas de enriquecimiento comprenden estreptavidina y dichas perlas de emulsión que comprenden la plantilla amplificada se unen en la etapa c) a través de una interacción biotina-estreptavidina.

5 Cuando las perlas de enriquecimiento comprenden oligos de captura y las perlas de emulsión se unen a las perlas de enriquecimiento mediante hibridación (véase la Figura 3), se contempla en una realización del método desnaturalizar dicha plantilla amplificada después de dicha etapa de ruptura y antes de la etapa d). Esto genera una plantilla amplificada monocatenaria en dichas perlas de emulsión, permitiendo la hibridación a dichos oligos de captura en dichas perlas de enriquecimiento. Por ejemplo, dichas perlas de enriquecimiento pueden comprender oligonucleótidos de captura que comprenden una secuencia al menos parcialmente complementaria de dicha plantilla amplificada, de modo que dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada se unen a dichas perlas de enriquecimiento en la etapa c) por hibridación.

10 Como se señaló anteriormente, en una realización los complejos se capturan en un filtro. En una realización preferida, dicho filtro es una malla de nylon de una sola capa (véase la Figura 11). Para una mayor eficiencia, en una realización se contempla que dicha malla se ponga en una columna giratoria. Esto permite centrifugar la columna giratoria durante la etapa d) para promover la separación al facilitar el paso de dichas perlas de emulsión no unidas a través de dicha malla. Alternativamente, el complejo puede ser capturado en el filtro y la separación puede tener lugar por gravedad. En una realización, la presente invención contempla el complejo capturado en el filtro como una composición.

15 La captura en el filtro se realiza eficazmente cuando dichas perlas de enriquecimiento son de diferente tamaño que dichas perlas de emulsión. Idealmente, el filtro debería atrapar las perlas de enriquecimiento más grandes (en un complejo con las perlas de emulsión que comprende la plantilla amplificada) pero permite que las perlas de emulsión más pequeñas sin plantilla amplificada pasen a través del filtro. No se pretende que la presente invención esté limitada a diferencias de tamaño precisas entre las perlas de emulsión y las perlas de enriquecimiento. En una realización, dichas perlas de enriquecimiento son al menos cinco veces y hasta cien veces más grandes que dichas perlas de emulsión. Convenientemente, las perlas de enriquecimiento son entre 10 y 20 veces más grandes.

20 Tampoco se pretende que los complejos estén limitados por el número de perlas de emulsión implicadas. En una realización preferida, al menos una porción de dichas perlas de enriquecimiento se une a más de una de dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada. De hecho, típicamente las perlas de enriquecimiento se unen a una diversidad de perlas de emulsión (véase la Figura 10), comprendiendo dichas perlas de emulsión una plantilla amplificada.

25 Una vez que las perlas de emulsión se capturan en las perlas de enriquecimiento y las perlas de emulsión que carecen de plantilla amplificada se separan, en algunas realizaciones es útil separar las perlas de emulsión capturadas de las perlas de enriquecimiento. Esto se puede hacer de varias maneras. En una realización, dichas perlas de emulsión que comprenden plantilla amplificada se separan de dichas perlas de enriquecimiento por centrifugación.

30 No se pretende que la presente invención se limite a los reactivos de PCR particulares en los compartimentos de la emulsión. En una realización, dichos reactivos de PCR comprenden nucleótidos o análogos de nucleótidos y polimerasa en un tampón.

35 La presente invención contempla una variedad de fuentes de plantilla. En una realización, dicha plantilla comprende fragmentos de ADN cortados (por ejemplo, ADN genómico fragmentado). En una realización, dichos fragmentos de ADN cizallados comprenden adaptadores 3' y 5'. En esta realización, dichos primer y segundo cebadores son complementarios a una parte de uno de dichos adaptadores. Alternativamente, se emplean cebadores específicos para una región de los fragmentos de ADN cortados. En otra realización más, se emplean cebadores aleatorios.

40 No se pretende que la presente invención esté limitada por la longitud de los cebadores empleados. Si bien pueden emplearse longitudes de 8 a 100 nucleótidos (o más), convenientemente se emplean cebadores de entre 20 - 30 nucleótidos de longitud.

45 Durante el método, las etapas de separación se pueden facilitar por diversos medios. Por ejemplo, en una realización, dichas perlas de emulsión son magnéticas y dichas perlas de emulsión separadas de dichas perlas de enriquecimiento se exponen a un imán. Esto puede permitir el conveniente aislamiento y concentración de las perlas de emulsión separadas.

50 En otra enseñanza, la presente invención contempla un método de enriquecimiento, que comprende: a) proporcionar i) una emulsión que comprende una diversidad de compartimentos acuosos en aceite, comprendiendo una porción de dicha diversidad de compartimentos perlas de emulsión, reactivos de PCR, un cebador directo inmovilizado en una perla de emulsión, un cebador inverso biotinilado en solución, y plantilla, y ii) perlas de enriquecimiento, comprendiendo dichas perlas de enriquecimiento estreptavidina, y siendo más grandes que dichas perlas de emulsión; b) exponer dicha emulsión a condiciones para amplificar al menos parte de dicha plantilla en al menos algunas de dichas perlas de emulsión en al menos algunos de dichos compartimentos, comprendiendo dicha plantilla amplificada biotina en una hebra de un dúplex de dos hebras; c) romper dicha emulsión para liberar dichas perlas de emulsión de dichos compartimentos; d) enriquecer para perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada entre dichas perlas de emulsión libres de dichos compartimentos poniendo en contacto con dichas perlas de enriquecimiento, en donde la mayoría de las perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada se unen a dichas perlas de

enriquecimiento para hacer complejos de perlas de biotina-estreptavidina y la mayoría de perlas de emulsión sin plantilla amplificadas permanecen sin unir; e) capturar dichos complejos de perlas en un filtro en condiciones tales que las perlas de emulsión no unidas pasen a través de dicho filtro; f) someter dichos complejos de perlas a condiciones para separar dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificadas de dichas perlas de enriquecimiento.

5 Nuevamente, la presente invención no se limita a ninguna condición particular para la amplificación. En una realización, dicha exposición a las condiciones de la etapa b) comprende ciclos de temperatura.

10 Como se mencionó anteriormente, las separaciones se pueden facilitar de varias maneras. En una realización, dichas perlas de emulsión en dichos compartimentos son magnéticas y dichas perlas magnéticas se recuperan después del paso c) y luego se exponen a un imán y se lavan. Esto facilita la separación de las perlas de emulsión de la emulsión, y permite múltiples etapas de lavado (si se desea) para eliminar cualquier aceite residual y/o reactivos sin reaccionar.

15 Las perlas de emulsión que forman parte de los complejos se pueden liberar y separar de las perlas de enriquecimiento de varias maneras. En una realización, dichas condiciones de la etapa f) comprenden condiciones desnaturizantes. Esta separación se puede facilitar de varias maneras. En una realización, dichas perlas de emulsión separadas de dichas perlas de enriquecimiento son magnéticas. En esta realización, dichas perlas de emulsión separadas de dichas perlas de enriquecimiento se exponen a un imán. Esto permite que estas perlas de emulsión se aislen y se concentren fácilmente.

No se pretende que la presente invención se limite a la naturaleza particular del tipo de filtro. En una realización, dicho filtro es una malla de nylon de una sola capa.

20 Para la amplificación clonal, se controla la concentración de la plantilla. En una realización, cada compartimento comprende en promedio menos de una molécula de plantilla.

25 La captura en el filtro se mejora cuando hay una diferencia de tamaño entre las perlas de emulsión y las perlas de enriquecimiento. No se pretende que la presente invención se limite a diferencias de tamaño precisas. En una realización, dichas perlas de enriquecimiento son al menos cinco veces y hasta cien veces más grandes que dichas perlas de emulsión. En una realización, dichas perlas de emulsión tienen aproximadamente 1 μm de diámetro y dichas perlas de enriquecimiento tienen aproximadamente 15 μm de diámetro.

30 Como se indicó anteriormente, la presente invención permite un proceso más eficiente mediante la recuperación de dichas perlas de emulsión separadas que comprenden una plantilla amplificadas para crear una población enriquecida contaminada con un porcentaje relativamente bajo de perlas sin plantilla amplificadas. En una realización, la población está contaminada con menos del 20% de perlas sin plantilla amplificadas. En una realización, la población está contaminada con menos del 10% de perlas sin plantilla amplificadas. En otra realización, la población está contaminada con menos del 5% de perlas sin plantilla amplificadas. En otra realización más, dicha población enriquecida es contaminada con menos del 1% de perlas sin plantilla amplificadas.

35 No se pretende que el proceso se limite a un pequeño número de perlas. En realidad, la presente invención contempla que puedan ser procesados muchos cientos, miles, millones y miles de millones de perlas de emulsión. En una realización, dicha población enriquecida comprende entre 1 y 20 millones de perlas.

40 Como se mencionó anteriormente, para muchas aplicaciones y ensayos posteriores, incluida la secuenciación, se desea que el proceso genere una plantilla principalmente homogénea. En una realización, después de completarse el método de enriquecimiento, al menos el 50% de dicha población enriquecida de perlas comprende una plantilla homogénea. En otra realización, al menos el 80% de dicha población enriquecida de perlas comprende una plantilla homogénea. En otra realización, entre 80 y 100% comprende una plantilla homogénea.

45 Como se mencionó anteriormente, se desea que el proceso implique una baja frecuencia de instancias en las que dos plantillas diferentes se amplifiquen en un compartimento de la emulsión. En una realización, después de completarse el método de enriquecimiento, menos del 30% de dicha población de perlas enriquecida comprende una plantilla heterogénea. En otra realización más, menos del 20% de dicha población de perlas enriquecida comprende una plantilla heterogénea. En otra realización más, menos del 10% de dicha población de perlas enriquecida comprende una plantilla heterogénea. En una realización adicional, menos del 1% comprende una plantilla heterogénea.

50 Se contemplan variaciones en el método. Al margen de estas variaciones, la presente invención contempla poblaciones resultantes de partículas enriquecidas (por ejemplo, perlas) como composiciones de materia. En una realización, la presente invención contempla una población de perlas (por ejemplo, perlas de emulsión) que comprende plantilla amplificadas, dicha población contaminada con menos del 20% (y más preferiblemente 10%) de perlas sin plantilla amplificadas, en donde al menos el 50% de dicha población comprende plantilla homogénea. En una realización, al menos el 80% de dicha población comprende una plantilla homogénea. En otra realización más, entre el 80 y el 95% comprende una plantilla homogénea. En una realización adicional, el 100% comprende una plantilla homogénea.

Como se señaló anteriormente, los métodos y composiciones de la presente invención resuelven el problema de ineficiencia de la amplificación clonal. En una realización, la presente invención contempla dónde dicha población está contaminada con menos del 1% de perlas sin plantilla amplificada.

5 La población de perlas enriquecidas puede ser grande en número, pero de tamaño pequeño. Por ejemplo, en una realización de una población enriquecida, dichas perlas tienen 1 µm de diámetro. En una realización de dicha población enriquecida, dicha población comprende entre 1 y 20 millones de perlas. En una realización, dicha población de perlas enriquecidas se dispone en una cámara para manipulaciones adicionales, incluida la secuenciación de la plantilla amplificada. En una realización, dicha población de perlas enriquecidas se dispone en un chip. En una realización, al menos una porción de dicha población de perlas enriquecidas se usa para hacer una matriz.

10 En una realización, los diversos métodos y procesos descritos anteriormente están automatizados. Por ejemplo, el método de enriquecimiento puede realizarse usando un sistema de procesamiento de muestras automatizado. El sistema puede tener regiones para tareas particulares, p. ej. centrifugación, hacia las cuales y desde qué materiales, por ejemplo tubos que contienen perlas, son movidos por un brazo robótico o similar. Las regiones pueden tener plataformas, cajones o cubiertas. El QIAcube disponible comercialmente de Qiagen está equipado con una
15 centrifugadora automatizada y un sistema de pipeteo que puede programarse para realizar todos o parte de las etapas del método con una intervención humana limitada.

Aun sin pretender limitarse a ningún sistema o dispositivo automatizado en particular, el sistema o dispositivo puede comprender una plataforma, comprendiendo la plataforma una diversidad de elementos portadores de muestra que pueden incluso configurarse de forma extraíble. Los soportes de muestra pueden ser tanto móviles como extraíbles
20 en una pieza o en piezas. Los soportes de muestra se pueden colocar sobre un termobloque, permitiendo un ciclo de temperatura y amplificación. Posteriormente, esta plataforma puede retirarse y reemplazarse con vehículos de muestras colocados sobre un imán, permitiendo una fácil separación de partículas magnéticas, por ejemplo, perlas magnéticas.

El sistema de control de procesamiento de muestras puede automatizar el sistema de procesamiento de muestras de manera que uno o más tubos o placas (por ejemplo, placas de microtitulación) se puedan procesar de acuerdo con uno o más protocolos. Este procesamiento de muestras puede comprender uno o más protocolos y etapas de muestreo, tales como (pero sin limitarse a ellos) agregar reactivos, mezclar, centrifugar, eliminar el sobrenadante, agregar tampón de lavado, centrifugar nuevamente, eliminar el sobrenadante, pipetear y similares.

El dispositivo de procesamiento automático puede comprender un brazo robótico que tiene movimiento robótico, y en algunas realizaciones movimiento cartesiano. El brazo puede comprender uno o más elementos, tales como una jeringa, pipeta o sonda, un elemento sensor de volumen de fluido y/o aplicador de aire. La jeringa, pipeta o sonda pueden estar conectadas de forma fluida con un depósito u otro recipiente, y pueden aplicar uno o más de los siguientes elementos: agentes de aclarado (por ejemplo, tampones y similares), reactivos desnaturizantes (para separar dúplex de ADN), materiales adicionales (incluyendo perlas). La jeringa, la pipeta o la sonda pueden conectarse
35 de forma fluida a un vacío o bomba para la aspiración de reactivos, como la aspiración de sobrenadante.

El sistema de procesamiento de muestras está configurado para lograr una secuencia apropiada de eventos que alcanza un resultado deseado hasta cierto punto. Al lograr esta secuencia de manera automatizada, hasta cierto punto, el sistema de procesamiento de muestras se considera un sistema de procesamiento de muestras automatizado y logra el procesamiento automático de al menos una muestra. Esta secuencia automatizada, así como otros aspectos
40 de la invención, pueden controlarse mediante hardware, software o alguna combinación de ellos para lograr una secuencia deseada con intervención humana limitada.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "ensayo" se usa ampliamente para referirse a un procedimiento o protocolo que incorpora una o más reacciones. Los ensayos se usan típicamente para caracterizar una muestra de interés. Un
45 ensayo se puede realizar usando al menos una "mezcla de ensayo" o una "mezcla de reactivos" que es una composición a partir de la cual se detectan una o más señales de prueba, antes, durante y/o después del procesamiento de la composición para permitir una reacción, si es que hay alguna, para que ocurra. Una prueba o ensayo puede determinar la presencia (por ejemplo, la concentración) o actividad, entre otros, de uno o más analitos en una muestra.

50 Como se usa en el presente documento, "analito" se usa ampliamente para referirse a ácido nucleico, proteína (por ejemplo, una enzima), una célula, un virus, un anticuerpo, un orgánulo, un fármaco, un biomarcador, una sustancia en un fluido corporal, un lípido, un carbohidrato, una sustancia inorgánica, o cualquier combinación de los mismos, entre otros.

Como se usa en el presente documento, "reacción" se usa ampliamente para referirse a una reacción química, una interacción de unión, una reacción enzimática, o algo similar. Un ejemplo de reacción es la polimerización catalizada por enzimas. Otro ejemplo es la unión de un sustrato o producto a un compañero de unión.

Como se usa en el presente documento, los "reactivos" son compuestos o conjuntos de compuestos combinados con una muestra con el fin de realizar una prueba o tratamiento particular en la muestra. Un reactivo puede ser un reactivo específico de la diana, que es cualquier composición de reactivo que confiera especificidad para la detección de una diana o un analito en particular en una prueba. Un reactivo puede incluir opcionalmente un reactivo químico y/o un compañero de unión para la prueba. En realizaciones ejemplares, el reactivo puede ser un reactivo de amplificación, tal como nucleótidos o análogos de nucleótidos. Más específicamente, los reactivos pueden incluir desoxinucleótido (y/o nucleótido) trifosfatos (dNTPs y/o NTPs) y una sal de magnesio en un tampón.

La secuencia de un ácido nucleico se define por el orden en el que las bases nucleicas están dispuestas a lo largo del esqueleto. Esta secuencia generalmente determina la capacidad del ácido nucleico para unirse específicamente (hibridarse o "recocerse") a una cadena asociada (o formar un dúplex intramolecular) mediante enlaces de hidrógeno.

Como se usa en el presente documento, "amplificación" se refiere a un proceso en el que aumenta el número de copias. La amplificación puede ser un proceso en el cual la replicación ocurre repetidamente a lo largo del tiempo para formar múltiples copias de una plantilla. La amplificación puede producir un aumento exponencial o lineal en el número de copias a medida que progresa la amplificación. Los ejemplos de amplificación incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), replicación por círculo rodante (RCA), RCA en cascada, amplificación basada en ácido nucleico (NASBA) y similares. Además, la amplificación puede utilizar una plantilla lineal o circular. La amplificación se puede realizar bajo cualquier condición de temperatura adecuada, como con ciclos térmicos o isotérmica. Además, la amplificación puede realizarse en una mezcla de amplificación (o mezcla de reactivos), que es cualquier composición capaz de amplificar una diana de ácido nucleico en la mezcla, si la hay.

La amplificación por PCR se basa en ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento (es decir, ciclos térmicos) para lograr rondas sucesivas de replicación. La PCR se puede realizar mediante ciclos térmicos entre dos o más puntos de consigna de temperatura, como una temperatura de desnaturalización más alta y una temperatura de recocido/extensión más baja, o entre tres o más puntos de consigna de temperatura, como una temperatura de desnaturalización más alta, una temperatura de recocido más baja y una temperatura de extensión intermedia, entre otros. La PCR se puede realizar con una polimerasa termoestable, como la ADN polimerasa Taq. La PCR generalmente produce un aumento exponencial en la cantidad de un amplicón producto en ciclos sucesivos.

Como se usa en el presente documento, un "amplicón" es un producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser monocatenario o bicatenario, o una combinación de los mismos. Un amplicón corresponde a cualquier segmento adecuado o la longitud total de un objetivo de ácido nucleico.

Como se usa en este documento, un cebador es un oligonucleótido usado para cebar la replicación de una plantilla de ácido nucleico. Así pues, un cebador es un ácido nucleico más corto que es complementario a una plantilla más larga. Durante la replicación, el cebador se extiende, basándose a la secuencia de la plantilla, para producir un ácido nucleico más largo que es una copia complementaria de la plantilla. Un cebador puede ser ADN, ARN o un análogo de los mismos (es decir, un ácido nucleico artificial), y puede tener cualquier longitud adecuada, como al menos aproximadamente 10, 15, 20, 30 o 40 nucleótidos. Los cebadores a menudo se sintetizan químicamente. Los cebadores se pueden suministrar como un par de cebadores para la amplificación de una diana de ácido nucleico. El par de cebadores puede ser un cebador sensorial y un cebador antisentido que definen colectivamente los extremos opuestos (y por tanto el tamaño) de un amplicón resultante.

Como se usa en el presente documento, una "sonda" es un ácido nucleico usado para detectar y/o confirmar la presencia de otro ácido nucleico. Una sonda está típicamente conectada a un marcador detectable. Una sonda puede ser un compañero de unión de secuencia específica para una diana de ácido nucleico y/o amplicón. Un ejemplo de sonda incluye uno o más ácidos nucleicos conectados a un colorante (por ejemplo, un colorante fluorescente) o un par de colorantes. El par de colorantes puede proporcionar respectivamente primer y segundo emisor o un emisor (un informador) y un apagador.

Como se usa en este documento, un "marcador" es un marcador o identificador distintivo. Normalmente está conectado o incorporado a cualquier entidad, como una molécula, un complejo molecular, un compuesto, una partícula biológica o una gotícula. La etiqueta o marcador puede describirse como un elemento que marca la entidad particular para producir una entidad etiquetada. Un marcador puede ser, por ejemplo, un colorante que hace que una entidad sea ópticamente detectable o al menos más detectable ópticamente. Los ejemplos de colorantes utilizados para marcar son los colorantes fluorescentes (fluoróforos) y los apagadores de fluorescencia.

Como se usa en el presente documento, un "compañero de unión" o "ligando" es un miembro de un "par de interacción" de miembros que se unen el uno al otro. Cada miembro puede ser un átomo, una molécula, un complejo molecular, un compuesto y/o una partícula biológica (una célula, virus, orgánulo o similar), entre otros. Los socios de unión pueden unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de parejas de unión específicas incluyen biotina y avidina/estreptavidina, un ácido nucleico sentido y un ácido nucleico antisentido complementario, un cebador y su diana, un anticuerpo y un antígeno correspondiente, un receptor y su ligando, un ácido nucleico y una proteína que reconoce un motivo de secuencia presente en el ácido nucleico, y similares.

5 Como se usa en el presente documento, "partícula" se refiere a objetos pequeños y discretos que pueden estar en diversas formas, tales como una esfera (por ejemplo, perlas), cápsula, poliedro y similares. Las partículas pueden ser macroscópicas o microscópicas, como micropartículas o nanopartículas. Las partículas pueden ser no magnéticas o magnéticas. Las partículas magnéticas pueden comprender una sustancia ferromagnética, y la sustancia ferromagnética puede ser Fe, Ni, Co, un óxido de hierro o similar.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra una realización de un flujo de trabajo general utilizado en los planteamientos de secuenciación de próxima generación. El ADN se fragmenta y se modifica con adaptadores, antes de la amplificación en una emulsión.
- 10 La Figura 2 muestra una realización de un esquema de amplificación y enriquecimiento de gotículas.
- La Figura 3 representa una realización del proceso de enriquecimiento de la presente invención, concretamente el enriquecimiento de microesferas/perlas amplificadas en gotículas. Los elementos/etapas representados de la siguiente manera:
1. Perlas de enriquecimiento cargadas con sondas de captura complementarias al amplicón.
 - 15 2. Perlas sin amplicones (blanco).
 3. Perlas con amplicones.
 4. Perlas con amplicón unido a la perla de enriquecimiento.
 5. Separación de perlas de enriquecimiento con perlas amplificadas unidas, de perlas blanco.
 6. Desnaturalización y separación de perlas de secuenciación y perlas de enriquecimiento.
- 20 La Figura 4 muestra la distribución de señal/histogramas medidos por FACS para partículas no enriquecidas (A) y enriquecidas (B). Las partículas que contienen dianas amplificadas se visualizan usando una sonda de oligonucleotídico marcada con fluorescencia (Cy5) complementaria al extremo distal del amplicón.
- La Figura 5 muestra una imagen de microscopio de las perlas/partículas (1) dentro de las gotículas de emulsión (2) sobre un fondo de fase de aceite en masa (3).
- 25 La Figura 6 ilustra la recuperación de perlas recubiertas de estreptavidina Dynal MyOne de 1 µm de diámetro usando diferentes filtros. La muestra de control usa un filtro de red de nylon, todas las demás muestras son filtros de membrana con diámetros de poro promedio variables.
- La Figura 7 ilustra la recuperación de perlas recubiertas de estreptavidina Dynal MyOne de 1 µm de diámetro en varias etapas de enriquecimiento y usando sondas de captura de diferentes longitudes en perlas de enriquecimiento (Spherotech cat. # SVP-150-4) usando diferentes filtros. La muestra de control usa un filtro de red de nylon, todas las demás muestras son filtros de membrana con diámetros de poro promedio variables.
- 30 La Figura 8 muestra el enriquecimiento usando filtros de red de nylon usando un protocolo manual y un Vórtexer o un protocolo completamente automatizado usando un QIAcube, disponible comercialmente de Qiagen.
- 35 La Figura 9 muestra imágenes de las perlas de ePCR visualizadas mediante la hibridación de la sonda marcada con Cy5 complementaria al extremo distal del amplicón y obtenida una imagen usando un CelUometer: mezcla inicial, flujo, lavado y elución usando solución desnaturalizante (hidróxido de sodio).
- La Figura 10 muestra imágenes de microscopio de perlas de enriquecimiento (16 µm, recubiertas con estreptavidina, Spherotech) antes y después de la unión a las perlas de ePCR diana. Las perlas diana son visibles ligadas a las perlas de enriquecimiento.
- 40 La Figura 11 muestra imágenes de microscopio de la membrana (izquierda) y la red de nylon (derecha). La membrana tiene una amplia gama de distribuciones de tamaño de poro, aunque la red de nylon tiene aberturas muy bien definidas.
- La Figura 12 ilustra la recuperación de microesferas de amplicón durante dos realizaciones de un proceso de enriquecimiento, cada una utilizando dos tipos diferentes de mezclado: vórtexer e instrumento QIAcube.
- 45 La Figura 13 muestra la eficiencia de enriquecimiento (porcentaje de perlas vivas medidas) en las muestras enriquecidas usando un vórtexer y un QIAcube.

Descripción de la invención

Se describen métodos y composiciones para enriquecer una población de partículas que contienen un analito. En una realización, se usan perlas de enriquecimiento que son de mayor tamaño que las perlas usadas para la amplificación.

Se emplea un dispositivo de separación que puede retener perlas más grandes con perlas amplificadas unidas. La técnica encuentra muchos usos, incluyendo el enriquecimiento de perlas con plantilla amplificadas clonalmente, que se puede usar en una variedad de ensayos, incluida la secuenciación de ácidos nucleicos.

5 En una realización de la invención, la amplificación de la emulsión de perlas se realiza uniendo una plantilla de ácido nucleico (por ejemplo, una plantilla de ADN) para que se amplifique a un soporte sólido, preferiblemente en forma de una perla generalmente esférica. Las perlas se suspenden en una mezcla de reacción acuosa y luego se encapsulan en una emulsión de agua en aceite. En una realización preferida de la invención, se une a la perla al menos un cebador y el ADN plantilla se incluye en solución en la mezcla de reacción de amplificación.

10 En ciertas realizaciones, la emulsión está compuesta de microgotas de fase acuosa discretas, por ejemplo con un promedio de aproximadamente entre 1 y 100 μm de diámetro, encerradas por una fase de aceite termoestable. Cada microgota contiene preferiblemente una solución de reacción de amplificación (es decir, los reactivos necesarios para la amplificación del ácido nucleico). Un ejemplo de una solución de reacción de amplificación sería una mezcla de reacción de PCR (polimerasa, sales en tampón, dNTP, etc.) y cebadores de PCR (cebadores inversos y directos), con un cebador unido a la perla. En algunos casos (a causa de la dilución limitante), el ADN plantilla se incluye en la mezcla de reacción. Como resultado, solo un subconjunto o porción de la población de microgotas incluye la perla de ADN y la plantilla. Este subconjunto de la población de microgotas es la base para la amplificación. Las microcápsulas o compartimentos restantes no contienen ADN plantilla y no participarán en la amplificación.

15 En una realización preferida, la plantilla de ácido nucleico a amplificar mediante la amplificación de la emulsión de microesferas es una población de ADN tal como, por ejemplo, ADN genómico fragmentado o 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 conseguirse, por ejemplo, ligando una primera secuencia de ADN del adaptador a un extremo y una segunda secuencia de ADN del adaptador a un segundo extremo de cada miembro de la población de ADN. La plantilla de ácido nucleico puede ser de cualquier tamaño susceptible de amplificación *in vitro* (incluidas las técnicas de amplificación preferidas de PCR y PCR asimétrica). En una realización preferida, la plantilla tiene un tamaño de entre aproximadamente 150 y 750 pb, tal como, por ejemplo, un tamaño de aproximadamente 250 pb.

20 Las perlas utilizadas en este documento pueden fabricarse a partir de cualquier número de 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, poliácridamidas, geles de látex, dextrano, caucho, silicio, plásticos, nitrocelulosa, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio poroso de control, metales, dextranos reticulados (p. ej., Sephadex™), gel de agarosa (Sephacrose™) y otros soportes de fase sólida conocidos por los expertos en la técnica. En realizaciones preferidas, las perlas de emulsión son perlas de aproximadamente 1 micra de diámetro.

25 Para uso con la presente invención, las perlas de emulsión, con o sin plantilla de ácido nucleico unida, se suspenden en una emulsión de agua-en-aceite térmicamente estable. Se contempla que una parte de la población de microgotas incluya solo una plantilla y una perla. Puede haber muchas gotículas que no contengan una plantilla o que no contengan una perla. Del mismo modo, puede haber gotículas que contengan más de una copia de una plantilla. La emulsión se puede formar de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. A continuación, se describe un método para crear una emulsión, pero se puede usar cualquier método para hacer una emulsión. Estos métodos son conocidos en la técnica e incluyen métodos adyuvantes, métodos de contraflujo, métodos de corriente cruzada, métodos de tambor giratorio y métodos de membrana. Además, el tamaño de las microcápsulas se puede ajustar variando el caudal y la velocidad de los componentes. Por ejemplo, en la adición gota a gota, pueden variar el tamaño de las gotas y el tiempo total de suministro. Preferiblemente, la emulsión contiene una densidad de entre aproximadamente 10.000 – 1.000.000 de perlas encapsuladas por microlitro. Este número depende del tamaño de las microesferas, las gotículas y la relación de fases de emulsión (es decir, de oleosa a acuosa).

30 Después de la encapsulación, el ácido nucleico plantilla puede amplificarse, mientras está unido o no unido a las perlas, por cualquier método adecuado de amplificación. En una realización preferida, la amplificación de ADN se realiza por PCR. La PCR de acuerdo con la presente invención puede realizarse encapsulando la plantilla de ácido nucleico con una solución de PCR que comprende todos los reactivos necesarios para la PCR. Entonces, la PCR se puede lograr exponiendo la emulsión a cualquier régimen de termociclado adecuado conocido en la técnica.

35 Después de la amplificación de la plantilla de ácido nucleico y la unión de las copias de amplificación a la perla, la emulsión se "rompe" (también se refiere a "desemulsificación" en la técnica). Existen muchos métodos para romper una emulsión. Los procesos para romper las emulsiones conocidos en la técnica anterior incluyen procesos que usan un desmenuante inorgánico u orgánico, y procesos que tratan las emulsiones mecánicamente. Un método preferido de rotura de la emulsión utiliza aceite adicional para hacer que la emulsión se separe en dos fases. Luego se elimina la fase oleosa y se agrega un solvente orgánico adecuado. Después de mezclar, se elimina la fase de aceite/disolvente orgánico. Esta etapa puede repetirse varias veces. Finalmente, se eliminan las capas acuosas que hay sobre las perlas. Las perlas se lavan luego con una mezcla de un disolvente orgánico y un tampón de recocado (por ejemplo, se describe un tampón de hibridación o "tampón de recocado" adecuado en los ejemplos que siguen), y luego se lavan

nuevamente en un tampón de recocado. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, isopropanol y similares. En otra realización, la emulsión se rompe mediante la adición de una fase orgánica que solubiliza tanto la fase acuosa como el aceite/detergente y la solución homogénea se elimina después de la centrifugación o separación magnética. El tratamiento generalmente viene seguido por lavados con tampones acuosos, como PBS con detergente adicional (Tween-20).

Como se señaló anteriormente, un alto porcentaje de las perlas puede ser negativo si el propósito es minimizar el número de perlas que están asociadas con dos o más especies diferentes de plantillas de ácido nucleico, es decir, minimizar la instancia donde las perlas comprenden plantilla heterogénea. Aunque se puede lograr el objetivo, los resultados son ineficientes. Esta ineficiencia se puede mejorar significativamente si las perlas que contienen amplicón (que se originan de la asociación con al menos una plantilla) se separan de las que no tienen amplicón (que se origina de perlas sin plantilla asociada). Un amplicón se define como cualquier molécula de ácido nucleico producida por una técnica de amplificación nucleica *in vitro*. Se puede usar una etapa de separación para eliminar la mayoría o la totalidad de las perlas sin ADN, dejando una población enriquecida de perlas con una especie de ADN amplificado, es decir, la mayor parte de las perlas en la población enriquecida comprenden una plantilla homogénea.

La invención resuelve el problema de la baja eficiencia uniendo selectivamente partículas con amplicones de ADN con perlas de enriquecimiento (también llamadas perlas de captura) y separando perlas blanco (es decir, perlas que carecen de plantilla amplificada). Una de las realizaciones preferidas es el uso de perlas de enriquecimiento que son de mayor tamaño que las perlas utilizadas para la amplificación y un dispositivo de separación (tal como un filtro) que puede retener perlas más grandes con perlas amplificadas unidas, permitiendo que las perlas no unidas fluyan a través de ellas. En una realización, las perlas de enriquecimiento se modifican para comprender oligos de captura (también llamados sondas de captura) o un ligando, haciéndolos capaces de unir solo perlas con amplicones de ADN (también llamados perlas "vivas"). Después de haberse realizado la separación inicial, las partículas con amplicones se liberan de las perlas de enriquecimiento. Por ejemplo, se pueden liberar usando el mismo dispositivo de separación usando una solución de liberación que rompe la interacción entre la perla amplificada y la perla de enriquecimiento. Como resultado, las perlas que llevan ADN amplificado constituyen la mayoría de las perlas, y más preferiblemente constituyen el 80-100% de la población total de perlas y sirven como muestra mucho mejor para la secuenciación del ADN u otro análisis posterior. El proceso se puede automatizar fácilmente. No se pretende que el proceso o las composiciones se limiten a los métodos de ácido nucleico. El método y la composición son generalmente aplicables a cualquier analito.

30 Descripción de realizaciones preferidas

Como se señaló anteriormente, las técnicas de enriquecimiento descritas en el presente documento encuentran muchos usos, incluido el enriquecimiento de perlas con plantilla amplificada clonalmente, que se pueden usar en una variedad de ensayos, incluyendo la secuenciación de ácido nucleico. La Figura 1 muestra esquemáticamente una realización de un flujo de trabajo general utilizado en los planteamientos de secuenciación de próxima generación. La PCR en emulsión se usa para amplificar clonalmente la plantilla para la secuenciación posterior.

La Figura 2 es un esquema de una realización en la que se emplea la etapa de enriquecimiento. Después de la emulsión PCR, la emulsión se rompe. La etapa de enriquecimiento genera una población de perlas en la que la mayoría comprende amplicón. Entonces se cargan estas perlas en un chip y la plantilla se secuencia a continuación.

En una realización, las perlas de enriquecimiento se modifican para que comprendan oligos de captura (también llamados sondas de captura) o un ligando, haciéndolos capaces de unir solo perlas con amplicones de ADN (también llamados perlas "vivas"). La Figura 3 muestra esquemáticamente la realización en la que se usan oligos de captura en las perlas de enriquecimiento. Estos oligos de captura se hibridan con perlas que contienen amplicón durante el enriquecimiento. En una realización, el porcentaje de vida se puede medir hibridando una sonda marcada con fluorescencia complementaria al extremo distal del amplicón de PCR. La suspensión de perlas marcadas puede entonces analizarse utilizando técnicas de imagen (microscopio fluorescente) o un instrumento de Clasificación de Células Asistida por Fluorescencia (FACS). La Figura 4 muestra una distribución de perlas vivas antes y después del enriquecimiento tal como se midió usando FACS.

Para visualizar las emulsiones y medir la distribución del tamaño de las gotas de emulsión, se pueden utilizar técnicas de imagen (por ejemplo, microscopía) o métodos de dispersión láser (por ejemplo, un analizador de tamaño de partículas, como el Malvern MasterSizer disponible en el mercado). La Figura 5A muestra la imagen del microscopio de PCR en emulsión con gotículas que contienen perlas, mientras que la Figura 5B muestra la distribución del tamaño de las gotículas medida por un instrumento de dispersión láser (MasterSizer).

En una realización preferida, el material de filtro comprende una malla de nylon de una sola capa con una distribución de tamaños de malla estrecha. El uso de membranas porosas con una distribución amplia del tamaño de poro (a pesar de que el tamaño medio de poro es el tamaño correcto) da como resultado que las perlas queden atrapadas en los poros y da como resultado una recuperación relativamente escasa. La Figura 6 muestra el porcentaje de recuperación de cuentas en función de diferentes materiales de filtro. El control constituye una sola capa de filtro de malla de nylon con un tamaño de malla de 10 µm. Este ejemplo también muestra la mejor recuperación.

5 La Figura 7 muestra el flujo de trabajo del enriquecimiento de perlas amplificado utilizando sondas de captura de dos longitudes diferentes. En una realización, la longitud de la sonda de captura es equivalente a la longitud del adaptador ligado al ADN. En otra realización, el tamaño de la sonda de captura es más corto que la longitud del adaptador ligado al ADN. Como muestra la Figura 7, los resultados de enriquecimiento (porcentaje de perlas vivas) son similares para ambas sondas de captura.

10 Pueden medirse varios aspectos del rendimiento de ciertas realizaciones de la presente invención. Estos incluyen la recuperación total de perlas (es decir, el número de perlas al comienzo y al final) y el porcentaje de vida. Ambos factores afectan al rendimiento general. La Figura 8 ilustra el impacto del uso de varios métodos de enriquecimiento en la recuperación de perlas y el porcentaje de enriquecimiento mediante el uso de diversos mecanismos de agitación. En una realización, se usa un agitador de vórtice para realizar operaciones de mezclado y en otra realización se usa el pipeteo repetitivo adaptando QIACube, estación de trabajo de pipeteo/centrifugación automatizada. Como se ve en la Figura 8, el método de agitación utilizado no tiene un impacto significativo en la recuperación total de perlas y el porcentaje de vida.

15 En la práctica de la presente invención, es útil realizar una evaluación del porcentaje de perlas vivas hibridando las perlas con una sonda marcada con fluorescencia y obteniendo las imágenes en un microscopio fluorescente. En la Figura 9 se muestran imágenes del instrumento de análisis de células fluorescentes (Cellometer™). Como se puede ver en las imágenes, el número de perlas brillantes aumenta significativamente después del enriquecimiento y también se puede cuantificar usando una combinación de formación de imágenes de campo oscuro y fluorescentes.

20 Para visualizar el proceso de unión de las perlas de amplicón a las perlas de enriquecimiento, se puede usar una simple microscopía de campo oscuro. La Figura 10 muestra un ejemplo de tal imagen, en la que se visualiza la perla después de la incubación con perlas en blanco y después de unir perlas de amplicón. Las perlas de amplicón son claramente visibles como pequeños objetos unidos a la perla de enriquecimiento, lo que confirma la captura específica.

25 La Figura 11 ilustra imágenes microscópicas de dos tipos diferentes de filtros: membrana y red de nylon. Como se muestra en otra parte de la memoria, el uso de malla de red de nylon es una realización preferida ya que da como resultado una recuperación de perlas mucho mayor.

30 Las Figuras 12 y 13 muestran mediciones de perlas en varias etapas de enriquecimiento utilizando el Vortexer del robot de pipeteo automático (QIACube) para realizar el enriquecimiento (es decir, incubación de perlas amplificadas con perlas de enriquecimiento y maximizar las colisiones mediante vórtice o pipeteo repetitivo. La velocidad de captura se logra maximizando los eventos de colisión entre las perlas de amplicón y las perlas de enriquecimiento. Esto se puede lograr reduciendo el volumen o aumentando la tasa de colisión (por ejemplo, al aumentar la velocidad del vórtice o la tasa de pipeteo).

Experimental

Ejemplo 1 - Preparación de muestras de PCR en emulsión y PCR en emulsión.

35 Este ejemplo describe un protocolo para PCR en emulsión utilizando perlas. Las etapas del protocolo son las siguientes:

1. Preparar la fase aceite en un tubo de 50 ml. Una reacción de ePCR produce perlas suficientes para poblar 4 carriles de la celda de flujo MAX-Seq. Todos los volúmenes se dan en ml:

ES 2 743 453 T3

Reactivo	1 Rxn	2 Rxns	3 Rxns	4 Rxns
Tegosoft DEC (Evonik)	4,4	8,8	13,2	17,6
Aceite mineral	1,2	2,4	3,6	4,8
Tensioactivo (ABIL WE09)(Evonik)	0,425	0,85	1,275	1,7

2. Agitar en vórtice el aceite 10-20 segundos, hasta que esté homogéneo. Apartar a un lado hasta la etapa 4.

3. Preparar Fase Acuosa en un tubo siliconado de 1,5 ml. Todos los volúmenes se dan en μl :

Reactivo	1 Rxn	Concentración final	Mock
10X tampón PCR	96	1X	96
MgCl ₂ 1M	12,1	12,6 mM	12,1
dNTPs (25 mM cada uno: 100 mM total)	135	14 mM (total)	0
Cebador no marcado B2 2 mM (cebador inverso)	6	12,5 μM	0
M13F 10 μM (cebador directo)	5	0,052 μM	5
10 mg/ml BSA	20	208 ng/ μl	20
Plantilla	Varias		0
Tritón X-100 10%	9,6	0,1 %	9,6
Agua	515,3		662,3

- 5 4. Transferir 5,5 ml de aceite de emulsión a tubos de 50 ml.
5. Terminar de preparar un * tubo de fase acuosa añadiendo:
- a. 1,5 μl de pirofosfatasa inorgánica termoestable (2U/ μl)
 - b. 100 μl de ADN polimerasa Taq de grado e a la fase acuosa y vórtice.
 - c. 60 μl de perlas ($2,68 \times 10^8$ perlas en total) y vórtice.
- 10 6. Pipetear la fase acuosa a mezclar.
7. Poner un tubo de agitación IKA con mezcla de aceite en la unidad Ultra Turrax. Perforar la tapa con una punta de pipeta.
8. Ajustar el temporizador de la unidad en 5 minutos y la velocidad en 6.
9. Añadir la fase acuosa a la fase oleosa usando la bomba peristáltica.
- 15 10. Insertar el tubo de la bomba en un tubo de 2 ml que contiene fase acuosa de la emulsión. Encender la bomba "hacia adelante" mientras la configuración está en "purga". Observar que el líquido se está moviendo a través del tubo de la bomba hasta que alcanza el extremo de salida del tubo. Cambiar el ajuste a "lenta" con el dial ajustado en 5.
11. Poner en marcha la unidad Ultra Turrax.
12. Dispensar lentamente el volumen acuoso completo en la fase oleosa mientras está girando el agitador.
- 20 13. Después de dispensar la fase acuosa en la fase oleosa, continuar agitando la mezcla hasta que se agote el temporizador por un total de 5 minutos.
14. Ajustar el pipeteador repetidor en un volumen de dispensación de 150 μl y utilizar para distribuir la emulsión en los pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos (150 μl /pocillo).
- 25 15. Sellar la placa con un sello de papel de aluminio, y dejar a un lado la emulsión sobrante para fines de obtención de imágenes en el microscopio más adelante.

16. Ejecutar el protocolo "E-PCR" en el termociclador. Tener en cuenta qué muestra entró en qué ciclador. El programa funcionará durante aproximadamente 5 horas.

17. Regresar a la etapa 5 tantas veces como sea necesario para completar todas las emulsiones.

5 18. Pipetear 5 µl de la emulsión sobrante en un portaobjetos de microscopio de vidrio y poner un cubreobjetos sobre él. Observar al microscopio. Los microcompartimentos que contienen una perla (en promedio) deben ser evidentes. Se deben observar muy pocas perlas en la fase oleosa. La figura 5 muestra la imagen del microscopio de perlas dentro de gotículas de emulsión.

19. Pipetear toda la fase acuosa (960 µl) en el tubo de 50 ml que contiene la fase oleosa.

20. Mezclar en el Vórtexer digital Talboys durante 2 minutos y 15 segundos a una velocidad de 2200 rpm.

10 21. Usando una pipeta repetidora, cargar 50 µl de la emulsión/pocillo en una placa de 96 pocillos. Sellar con un sello de papel de aluminio, y apartar la emulsión sobrante con fines de obtención de imágenes en el microscopio más adelante.

22. Ejecutar el protocolo "EPCR-P" en el termociclador. Tener en cuenta qué muestra entró en qué ciclador. El programa se ejecutará durante aproximadamente 6 horas.

15 23. Volver a la etapa 5 tantas veces como sea necesario para completar todas las emulsiones. Pipetear 5 µl de la emulsión sobrante en un portaobjetos de microscopio de vidrio y poner un cubreobjetos sobre él. Observar al microscopio. Los microcompartimentos que contienen una perla (en promedio) deben ser evidentes. Se deben observar muy pocas perlas en la fase oleosa.

Parámetros de ciclación de PCR, EPCR-1.

20 1. 95 °C durante 3 minutos

2. 94 °C durante 15 segundos

3. 57 °C durante 30 segundos

4. 70 °C durante 30 segundos

5. Ir a la etapa 2, 119 veces

25 6. 72 °C durante 2 minutos

7. 2 °C para siempre

Ejemplo 2: Procesamiento de la PCR en emulsión.

Este ejemplo describe un protocolo para romper la emulsión y recuperar las perlas. Las etapas del protocolo son las siguientes:

30 1. Agrupar cada emulsión en un tubo cónico de 50 ml usando una aguja roma equipada con una jeringa de 10 ml con émbolo de goma.

2. Añadir isopropanol hasta la marca de 20 ml.

3. Agitar en vórtice en el Vortexer Talboys, durante 45 segundos a 3000 rpm. No deben quedar grumos.

4. Centrifugar en la centrifuga de mesa a 6000 RPM durante 2 minutos.

35 5. Decantar el sobrenadante.

6. Repetir las etapas 2 a 4. Después de la centrifugación, poner el tubo en una gradilla magnética y retirar con cuidado el sobrenadante con una pipeta serológica de 10 ml. Evitar eliminar perlas.

7. Usar una pipeta P200 para eliminar cualquier posible isopropanol residual del fondo del tubo mientras el tubo se asienta en una gradilla magnética.

40 8. Añadir tampón NXS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%, Triton X-100 al 1%, pH = 8,0) a la marca de 20 ml.

9. Agitar en vórtice en el Talboys Vortexer durante 90 segundos, a 3000 RPM.

10. Centrifugar en la centrifuga de mesa durante 3 minutos a 6000 RPM.

ES 2 743 453 T3

11. Decantar el sobrenadante. Si el sedimento se sale de la pared del tubo, colocar el tubo en un imán y retirar con cuidado todo el sobrenadante pipeteando con una pipeta serológica de 10 ml.
12. Resuspender las perlas en 500 µl de tampón TE y transferirlas a un tubo siliconado de 1,5 ml.
13. Ajustar el tubo en el imán durante 1 minuto y retirar/desechar el sobrenadante.
- 5 14. Lavar 3 veces con 500 µl de tampón TE (agitar en vórtice, luego girar durante 1 segundo en una minicentrífuga, ajustar el tubo en un imán durante 30 segundos, luego pipetear y desechar el sobrenadante).
15. Añadir 500 µl de NaOH 0,1 N, mezclar bien pipeteando, e incubar durante 5 minutos. El NaOH 0,1 N debe ser recién diluido de un stock 10N.
16. Ajustar el tubo en el imán durante 30 segundos, luego aspirar y desechar el NaOH.
- 10 17. Lavar con 500 µl de NaOH 0,1 N, añadiendo solución, agitando en vórtice, centrifugando brevemente, poniendo luego el imán hasta que la solución se aclare y aspirando/desechando el sobrenadante.
18. Lavar tres veces con 500 µl 1x de tampón de hibridación (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1 M, Tween-20 al 0,2%, pH = 8,0).

Ejemplo 3 - Enriquecimiento usando centrifugación de densidad en glicerol.

- 15 Este ejemplo describe un protocolo para una realización de un protocolo de enriquecimiento, utilizando centrifugación de densidad.

Materiales y equipo requerido:

- Perlas de enriquecimiento: perlas de poliestireno de 3,2 µm recubiertas con estreptavidina, Spherotech parte # SVP 30-5
- 20 • Oligonucleótido Bis biotina 5' TTTTTTTTTTACTTCAATTTACTATGTAGCAAAGG 3')
- Temporizador
- Pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl y 10 µl y sus correspondientes puntas.
- Centrifuga Eppendorf 5424 o equivalente.
- Glicerol
- 25 • Tampón B&W.
- Agua libre de nucleasa.
- Tampón TE.
- Tampón de hibridación.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- 30 • Termociclador.
- Vortexer.

Procedimiento:

1. Unir cebador a perlas de enriquecimiento:
 - a. Pipetear una alícuota de perlas de 540 µl en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
 - 35 b. Lavar 3 veces con 1 ml 1X de tampón B&W (Tris-HCl 5 mM, EDTA-Na 0,5 mM, NaCl 1M, pH = 8.0):
 - i. Añadir 1 ml de tampón B&W
 - ii. Pipetear para mezclar
 - iii. Centrifugar en centrífuga de mesa durante 1 min a 15.000 RPM
 - iv. Pipetear y desechar el sobrenadante
 - 40 c. Añadir 540 µl de Bisbiotin_B2 25 µM en tampón B&W

ES 2 743 453 T3

- d. Pipetear para mezclar
- e. Incubar en el tubo giratorio durante una hora a temperatura ambiente
- f. Repetir la etapa lb
- g. Resuspender en 60 µl de tampón B&W y almacenar a +4 °C durante un tiempo de hasta una semana.

5 2. Preparar perlas magnéticas para enriquecer:

a. Obtener perlas con ADN monocatenario resultante de una emPCR a escala completa o media escala realizada con una cantidad limitada de ADN de plantilla y cebador B2_.

b. Resuspender estas perlas en el siguiente volumen de tampón TE:

i) Media escala: 20 µL

10 ii) Escala completa: 40 µL

3. Unir perlas magnéticas a perlas de enriquecimiento:

a. En un tubo de PCR de 0,2 ml, combinar un volumen igual de perlas magnéticas y de enriquecimiento (por ejemplo, para enriquecer todo de una emPCR a media escala, usar 20 µL de perlas de enriquecimiento).

b. Pipetear para mezclar.

15 c. Incubar a 58 °C en el termociclador durante 1 hora. Pipetear suavemente cada 10 min.

d. Retirar el tubo del ciclador y dejar que llegue a la temperatura ambiente (aproximadamente 5 minutos sobre la mesa).

4. Preparar diluciones recientes de glicerol:

20 a. Usar una jeringa de 1 ml para transferir la cantidad apropiada de glicerol al 100% (véase la tabla a continuación) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y llenar con agua libre de nucleasa a 1 ml.

b. Agitar bien en vórtice.

	Perlas magnéticas de 1 µm	Perlas magnéticas de 3 µm
% de glicerol	60	80
ml de glicerol en 1 mL	0,6	0,8
rpm	13.000	15.000
ref	15.871	21.130

5. Separar las perlas en dos fracciones ("en vivo" y "nulo"):

a. Pipetear 300 µl de glicerol diluido en el fondo de un tubo Eppendorf de 1,5 ml

25 b. Pipetear la mezcla de perlas de la etapa 3d en la parte superior del glicerol – la mezcla acuosa de perlas debe "flotar" sobre el glicerol.

c. Centrifugar en una centrífuga de mesa durante 1 minuto a la velocidad indicada en la tabla anterior.

d. Deben estar presentes dos poblaciones de perlas distintas:

i. Un sedimento denso de perlas magnéticas nulas en el fondo del tubo

30 ii. Una capa de perlas magnéticas vivas de color tostado mezcladas con perlas de enriquecimiento sobre el glicerol.

e. Pipetear la capa superior y recoger estas perlas en un tubo siliconado de 1,5 mL.

(Opcional: guardar y medir las perlas vivas usando una sonda fluorescente para determinar que no se han perdido perlas vivas en el sedimento).

6. Desnaturalizar el ADN para separar las perlas de Enriquecimiento de las perlas Magnéticas:

ES 2 743 453 T3

- a. Lavar las perlas 3 veces con 1 mL de tampón TE:
 - i. Añadir 1 mL de tampón TE
 - ii. Pipetear para mezclar
 - iii. Ajustar el imán hasta que el sobrenadante ya no presente color bronceado (aproximadamente 5 minutos).
- 5 iv. Pipetear y desechar el sobrenadante (es probable que tenga un aspecto muy "turbio" debido al exceso de perlas de Enriquecimiento)
- b. Resuspender las perlas en 1 mL de NaOH 0,1 N
- c. Pipetear para mezclar
- d. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente
- 10 e. Ajustar el imán hasta que la solución se aclare, luego pipetear y desechar el sobrenadante
- f. Lavar dos veces con NaOH 0,1 N.
- g. Lavar 3 veces con 1 ml de tampón de hibridación 1X (como se describe en las etapas 6.a.i-iv) hasta que el sobrenadante sea claro.
- h. Proceder a hibridar con el cebador apropiado para la secuenciación.
- 15 Ejemplo 4 - Enriquecimiento usando el método de filtro (filtro de jeringa).

Este ejemplo proporciona un protocolo para el enriquecimiento utilizando un método de filtro. Las perlas de enriquecimiento se unen a las perlas de emulsión para formar un complejo. El complejo queda atrapado o capturado en el filtro y se utiliza una combinación de dos jeringas y gravedad para conseguir la separación. En esta realización, la sonda de captura se une primero a las perlas de enriquecimiento.
- 20 Materiales y equipo requeridos:
 - Filtros de jeringa de red de nylon, Millipore, 25 mm de diámetro, tamaño de poro 11 µm, parte # NY1102500
 - Perlas de poliestireno de 16 µm recubiertas de estreptavidina, Spherotech, parte # SVP-150-4.
 - Portafiltros Whatman Swin-Lok 420200-25 mm
 - Jeringas desechables de 5 ml.
- 25 • Oligonucleótido bisbiotinilado B2 (Bis biotina 5' TTTTTTTTTTACTTCAATTTACTATGTAGCAAAGG 3')
- Temporizador.
- Pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl y 10 µl y sus correspondientes puntas.
- Centrífuga Eppendorf 5424 o equivalente
- Tampón B&W
- 30 • Agua libre de nucleasa.
- Tampón TE.
- Tampón de hibridación
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Termociclador
- 35 • Vortexer
- Tampón de enriquecimiento:

ES 2 743 453 T3

Componente	ml	conc. final
10 x PBS	1	1 x
5% BSA	0,4	0,20%
10 mg/ml de ADN de esperma de salmón	0,1	0,1 mg/ml
Tween 20 al 25%	0,02	0,05%
agua libre de nucleasa	8,46	
azida sódica al 5%	0,02	0,01%
volumen total	10	

Procedimiento:

1. Unir el oligo de captura a las perlas de Enriquecimiento.
 - a. Pipetear una alícuota de perlas de 540 µl en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
 - b. Lavar 3 veces con 1 ml de 1X tampón B&W:
 - 5 i. Añadir 1 ml de tampón B&W
 - ii. Pipetear para mezclar
 - iii. Centrifugar en una centrífuga de mesa durante 1 min a 15.000 RPM
 - iv. Pipetear y desechar el sobrenadante
 - c. Añadir 540 µL de Bisbiotin_B2 25 µM en tampón B&W
 - 10 d. Pipetear para mezclar
 - e. Incubar en tubo giratorio durante una hora a temperatura ambiente.
 - f. Repetir la etapa 1b
 - g. Resuspender en 60 µl de tampón B&W y almacenar a +4 °C durante un tiempo de hasta una semana.
2. Preparar las perlas magnéticas a enriquecer:
 - 15 a. Obtener perlas con ADN monocatenario resultante de una emPCR a escala completa o a media escala realizada con una cantidad limitada de ADN plantilla y cebador B2.
 - b. Resuspender estas perlas en el siguiente volumen de tampón TE:
 - i. Media escala: 20 µL
 - ii. Escala completa: 40 µL
- 20 3. Unir las perlas magnéticas a las perlas de enriquecimiento:
 - a. Lavar 5,7 ml de perlas de spherotech STV 2 veces con tampón de enriquecimiento y resuspender en 5,7 ml de tampón de enriquecimiento.
 - b. Dispensar perlas de spherotech STV en un tubo de 1,5 ml. Separar en un imán y eliminar el líquido. Resuspender las perlas en 400 µl de tampón de enriquecimiento.
 - 25 c. Añadir la mezcla de perlas de emPCR a las perlas de enriquecimiento. Usar 150 µl de tampón de enriquecimiento para enjuagar el tubo y añadir este aclarado a las perlas spherotech.
 - d. Incubar en agitador giratorio a temperatura ambiente durante 4 horas a la velocidad 2.
4. Separar las esferas en dos fracciones ("vivo" y "nulo"):
 - a. Diluir cada muestra a 1 ml con 1x PBS.
 - 30 b. Poner el disco filtrante en el soporte del filtro y fijar el cilindro de la jeringa al soporte del filtro.

ES 2 743 453 T3

- c. Filtrar la muestra diluida a través del filtro poniéndola en el cilindro de la jeringa. Guardar el filtrado para la medida de perlas no unidas (blanco) (añadir 2 x 1 ml de PBS y añadir al filtro, desechar el filtrado).
- d. Llenar una nueva jeringa con 3 ml de PBS y conectarla al extremo opuesto del soporte del filtro.
- e. Presionar suavemente el tampón hacia arriba a través del filtro y dentro del cilindro de la jeringa.
- 5 f. Retire la jeringa del fondo y la solución pasará libremente por el filtro y desechar la solución.
- g. Llenar una nueva jeringa con 3 ml de NaOH 0,1N y conectarla al extremo opuesto del soporte del filtro.
- h. Presionar suavemente el tampón hacia arriba a través del filtro y dentro del cilindro de la jeringa.
- i. Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- j. Retirar la jeringa del fondo y la solución pasará libremente a través del filtro.
- 10 k. Recoger esta solución en un tubo de 15 ml (filtrado A) que contiene perlas vivas.
- l. Llenar una jeringa nueva con 3 ml de NaOH 0,1N y conectarla al extremo opuesto del soporte del filtro.
- m. Presionar suavemente el tampón hacia arriba a través del filtro y dentro del cilindro de la jeringa.
- n. Incubar a temperatura ambiente 1 minuto.
- o. Retirar la jeringa del fondo y la solución pasará libremente por el filtro.
- 15 p. Recoger esta solución en un tubo de 15 ml (filtrado B) que contiene perlas vivas.
- q. Combinar el filtrado A y el B.
- r. Lavar 3 veces con 1 ml de tampón de hibridación 1X.

Ejemplo 5 - Enriquecimiento usando filtros de centrifugadora de red de nylon.

20 Este ejemplo describe una realización de enriquecimiento que emplea filtros y centrifugación. En esta realización, se usa un cebador ePCR inverso que está biotinilado. Esto elimina la necesidad de unir la sonda de captura a las perlas de enriquecimiento.

25 Después de realizada la separación inicial, las partículas con amplicones se liberan de las perlas de enriquecimiento. En este ejemplo, se liberan usando el mismo dispositivo de separación (por ejemplo, filtro de centrifugadora) usando una solución de liberación que rompe la interacción entre la perla amplificada y la perla enriquecida. En este ejemplo, el filtro de centrifugación con las perlas de emulsión unidas a las perlas de enriquecimiento capturadas se traslada a un nuevo tubo (por ejemplo, una columna de rotación). Después de aplicar la solución de liberación, el tubo se centrifuga y las perlas con amplicones se eluyen y se dirigen al fondo del tubo. Las perlas de enriquecimiento quedan atrapadas en el filtro. Se recogen las perlas con amplicones y se desecha el filtro con las perlas de enriquecimiento atrapadas.

30 Preparación de perlas de captura.

1. Agitar en vórtice una botella con perlas de captura (perlas de poliestireno recubiertas con SuperAvidin™, diámetro medio 15,3 µm, Bangs Laboratories) para resuspender las perlas.
2. Transferir 400 µl de perlas de captura a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y centrifugar a 15.000 rpm durante 1 minuto.
3. Eliminar el sobrenadante y volver a suspender las perlas en 1 ml de tampón de enriquecimiento.
- 35 4. Centrifugar las perlas a 8.000 rpm durante 1 minuto y eliminar tanta cantidad de sobrenadante como sea posible sin perder perlas. Dejar atrás ~ 50 µl de líquido.
5. Repetir las etapas 3 y 4.
6. Resuspender las perlas en 100 µl de tampón de enriquecimiento.

Enriquecimiento.

- 40 1. Lavar las perlas después de recuperarlas de la emulsión con tampón de enriquecimiento, poner el tubo con perlas en un soporte magnético para eliminar el sobrenadante.
2. Resuspender las perlas en 50 µl de tampón de enriquecimiento.

ES 2 743 453 T3

3. Mezclar las perlas de captura y las perlas Dynal en un tubo de 2 ml y poner el tubo en el agitador en el QiaCube.
4. Ajustar el agitador a 900 rpm durante 15 minutos.
5. Poner el filtro giratorio con membrana de malla de nylon en un tubo de 2 ml (columna giratoria).
6. Transferir la mezcla de perlas al filtro de centrifuga y centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm. La mayor parte de las perlas nulas se eliminan en esta etapa.
7. Transferir el filtro de centrifuga a un nuevo tubo de 2 ml y añadir 300 µl de PBS/Tween 20 al 0,05%.
8. Centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm.
9. Añadir 300 µl de PBS/Tween 20 al 0,05% al filtro de centrifugación y centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm.
10. Transferir el filtro de centrifuga a un tubo nuevo de 2 ml.
11. Añadir 300 µl de NaOH 0,2 N y dejar reposar durante 5 minutos.
12. Centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm.
13. Repetir las etapas 11 y 12.
14. Desechar el filtro de centrifuga y poner el tubo de 2 ml con perlas eluidas en una gradilla magnética.
15. Eliminar el sobrenadante y resuspender las perlas en PBS/Tween 20 al 0,05%.
16. Repetir la etapa 15 dos veces para un total de 3 lavados.
17. Resuspender las perlas vivas en 20 µl de PBS.

Tampón de enriquecimiento.

Componente	ml	Conc. Final
10x PBS	1	1x
5% BSA	0,4	0,20%
10 mg/ml de ADN de esperma de salmón	0,1	0,1 mg/ml
25% Tween 20	0,02	0,05%
Agua libre de nucleasa	8,46	
Azida sódica al 5%	0,02	0,01%
Volumen total	10	

Ejemplo 6 - Medición de perlas y amplicones.

- 20 Este ejemplo examina las perlas resultantes mediante el ensayo de dispersión de luz y los amplicones resultantes mediante fluorescencia.

Preparación de la muestra de perlas.

Material de partida: Perlas con ADN bicatenario marcado, en tampón de hibridación 1 X.

1. Diluir NEBuffer 2 (New England Biolabs, cat. # B7002S; NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM pH 7.9@25 °C) a una concentración de 1x. Se necesitarán 2,2 ml para la curva patrón y 120 µl por muestra. Bajar la centrifugación de las perlas y eliminar la mayor cantidad de tampón posible, dejando solo las perlas.
 2. Añadir a las perlas 49 µl 1X NEBuffer 2.
 3. Añadir a las perlas 1 µl de Exonucleasa III (Enzymatics, cat. # X8020L).
 4. Incubar a 37 °C durante un total de 60 minutos, mezclando las muestras para resuspender las perlas agitando suavemente o pipeteando a la mitad de la incubación. (Durante la segunda mitad de esta incubación, se puede empezar a preparar muestras para una curva patrón).
- 30

ES 2 743 453 T3

5. Añadir 70 µl de 1X NEBuffer 2 a cada muestra y agitar bien. Bajar el giro de la muestra para sedimentar las perlas (o ajustar en un imán), luego proceder con "Carga de la placa TECAN".

Preparación de la curva patrón.

5 Material de partida: stock de 250 nM de la sonda marcada con Cy5 (5'Cy5- ACT TCA ATT TAC TAT GTA GCA AAG G 3') utilizada para sondear las perlas (esto se puede lograr añadiendo 1 µl de stock 250 µM en 1 ml de 1X NEBuffer 2).

1. Diluir las muestras de acuerdo con la siguiente tabla:

Concentración [nM]	Picomoles	ADN 250 nM (µl)	NEBuffer 2 [µl]
200	40	160,0	40,0
100	20	80,0	120,0
50	10	40,0	160,0
25	5	20,0	180,0
12,5	2,5	10,0	190,0
6,25	1,25	5,0	195,0
3,125	0,625	2,5	197,5

Carga de la placa TECAN.

10 Material de partida: muestras experimentales y curva patrón, y placa Corning de fondo plano de 96 pocillos, negra.

1. Cargar 100 µl de cada muestra en la placa. Téngase en cuenta qué muestras se cargan en cada pocillo.

2. Cargar un pocillo con solo 1X NEBuffer 2 (esto sirve de blanco).

Funcionamiento del instrumento Tecan.

1. Abrir Magellan 6 desde el escritorio.

15 2. Hacer clic con el botón "mover la placa afuera". Esto hará que se abra la puerta en el instrumento.

3. Cargar la placa con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda.

4. Hacer clic en el botón "mover la placa adentro". Esto hará que la placa sea introducida en el instrumento.

5. Presionar el botón "marcha".

6. Seleccionar "Datos sin formato", hacer clic en "marcha".

20 7. Elegir qué pocillos se desea medir (se medirán todos los pocillos amarillos).

8. Arrastrar "Intensidad fluorescente" bajo el diagrama de la placa.

9. Si se usa Cy5: Elegir las siguientes opciones: Seleccionar el filtro 640 para rojo.

10. Modo: superior.

11. Retraso: 0.

25 12. Tiempo Int.: 20.

13. Leer flashes: 25.

14. Ganancia: óptima. (Si las muestras leen mucho más bajo o más alto que las muestras de la curva patrón, puede ser necesario cambiar esto, o las muestras diluidas).

15. Presionar "marcha" y se tomarán las lecturas.

16. Aparecerá un diagrama de las placas con datos en él. Para guardar los datos, hacer clic en "editar" y luego "copiar a Excel". Esto abrirá Excel e insertará los datos. Copiar y pegar los detalles adicionales acerca de la ejecución en la hoja de Excel para el mantenimiento de registros.

Ensayo de dispersión de luz.

- 5 1. Retirar todo el sobrenadante de la muestra de perlas y resuspender las perlas en 100 µl de 1X ThermoPol Buffer.
2. Añadir 50 µl de estas perlas en 450 µl de 1x de Tampón ThermoPol (New England Biolabs, cat. nº B9005S; Tris-HCl 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, Triton® X-100 al 0,1%, pH 8,8@25 °C en una cubeta.
3. Pipetear para mezclar.
4. Determinar la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro.
- 10 5. Calcular la carga relativa del amplicón usando la señal fluorescente y el recuento de perlas.

Ejemplo 7 - Enriquecimiento usando portaobjetos de vidrio/placa recubiertos con estreptavidina.

- Se realizó una reacción estándar de ePCR y se recuperaron las perlas, luego se resuspendieron en tampón de enriquecimiento. La suspensión de perlas se depositó luego sobre la superficie del portaobjetos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se eliminó el sobrenadante (perlas no unidas) y la superficie del portaobjetos se lavó con 1 x PBST. El portaobjetos se expuso luego a una solución de NaOH 0,1 N y se incubó durante 2 minutos para liberar las perlas enriquecidas. El líquido se eliminó y se realizó un lavado adicional con NaOH 0,1 N. Luego se puso la suspensión de perlas en un separador magnético y se eliminó el sobrenadante. Las perlas se lavaron con 2 x PBST y se midió la absorción a 600 nm para determinar la concentración de las perlas. Las perlas se hibridaron luego con una sonda marcada con fluorescencia para determinar el % de enriquecimiento y comparar con el % inicial de perlas vivas. El enriquecimiento en este caso mostró que el % de vida inicial fue del 17% (antes del enriquecimiento) y del 30% (después del enriquecimiento).
- 15
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un método de enriquecimiento que comprende:
 - a) proporcionar
 - 5 i) una emulsión que comprende uno o más compartimentos acuosos en aceite, comprendiendo al menos algunos de dichos compartimentos reactivos de PCR, un primer cebador de PCR inmovilizado en una perla de emulsión, un segundo cebador de PCR biotinilado en solución y plantilla de secuencia de nucleótidos; y
 - ii) perlas de enriquecimiento, en donde dichas perlas de enriquecimiento son diferentes de dichas perlas de emulsión en dichos compartimentos;
 - 10 b) exponer dicha emulsión a condiciones para amplificar al menos parte de dicha plantilla en al menos parte de dichas perlas de emulsión para producir una plantilla amplificada en al menos parte de dichos compartimentos, en donde un cordón de dicha plantilla amplificada termina con biotina;
 - 15 c) enriquecer en perlas de emulsión que comprenden dicha plantilla amplificada poniendo en contacto dichas perlas de emulsión con dichas perlas de enriquecimiento, en donde dicha plantilla amplificada se une a dichas perlas de enriquecimiento con dicha biotina para formar una población de complejos de perlas de emulsión – perlas de enriquecimiento y en donde las perlas de emulsión que no comprenden plantilla amplificada no se une a dichas perlas de enriquecimiento; y
 - d) capturar al menos parte de dicha población de complejos en condiciones tales que no se capture la mayoría de dichas perlas de emulsión que no comprenden plantilla amplificada.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además, después de la etapa d):
 - 20 e) someter dicha población de complejos a unas condiciones que separen dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada de dichas perlas de enriquecimiento de forma que la mayor parte de dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada se separa de dichas perlas de enriquecimiento.
3. El método de la reivindicación 1, en donde cada compartimento comprende por término medio menos de una plantilla.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, que comprende además romper dicha emulsión después de la etapa b) y antes de la etapa c).
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho segundo cebador de PCR biotinilado comprende una primera parte de un par de interacción, y en donde dichas perlas de enriquecimiento comprenden la segunda parte de dicho par de interacción.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde dichas perlas de enriquecimiento comprenden estreptavidina y dichas perlas de emulsión que comprenden plantilla amplificada se unen en la etapa c) mediante una interacción biotina-estreptavidina.
- 35 7. El método de la reivindicación 4, que comprende además desnaturalizar dicha plantilla amplificada después de dicha etapa de rotura y antes de la etapa d), opcionalmente en donde dichas perlas de enriquecimiento comprenden oligonucleótidos de captura que comprenden una secuencia al menos parcialmente complementaria a dicha plantilla amplificada, de forma que dichas perlas de emulsión que comprenden plantilla amplificada se unen a dichas perlas de enriquecimiento en la etapa c) mediante hibridación.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde la captura de al menos una parte de dicha población de complejos en la etapa d) es un filtro que comprende malla de nylon, y dicho filtro se pone en una columna de centrifugación, opcionalmente en donde dicha columna de centrifugación se centrifuga durante la etapa d) de forma que facilite el paso de dichas perlas de emulsión a través de dicho filtro.
9. El método de la reivindicación 2, en donde dichas perlas de emulsión que comprenden una plantilla amplificada son separadas de dichas perlas de enriquecimiento mediante centrifugación.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, en donde dichas perlas de enriquecimiento son de un tamaño diferente del de dichas perlas de emulsión.
11. El método de la reivindicación 2, en donde dichas perlas de emulsión son magnéticas y dichas perlas de emulsión separadas de dichas perlas de enriquecimiento son expuestas a un imán.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dicha exposición a las condiciones de la etapa b) comprende ciclación de temperatura.

13. El método de la reivindicación 2, que comprende además recuperar dichas perlas de emulsión separadas que comprenden una plantilla amplificada para crear una población enriquecida contaminada con menos del 10% de perlas sin plantilla amplificada; en donde dicha población enriquecida está contaminada con menos del 1% de perlas sin plantilla amplificada; o en donde dicha población enriquecida comprende entre 1 y 20 millones de perlas.

FIGURA 1

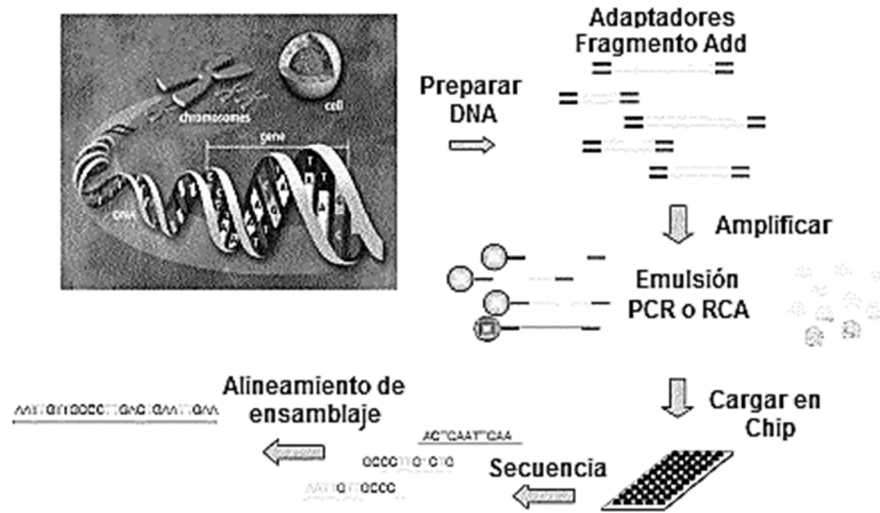


FIGURA 2

Prep. Muestra Basada en Gotículas

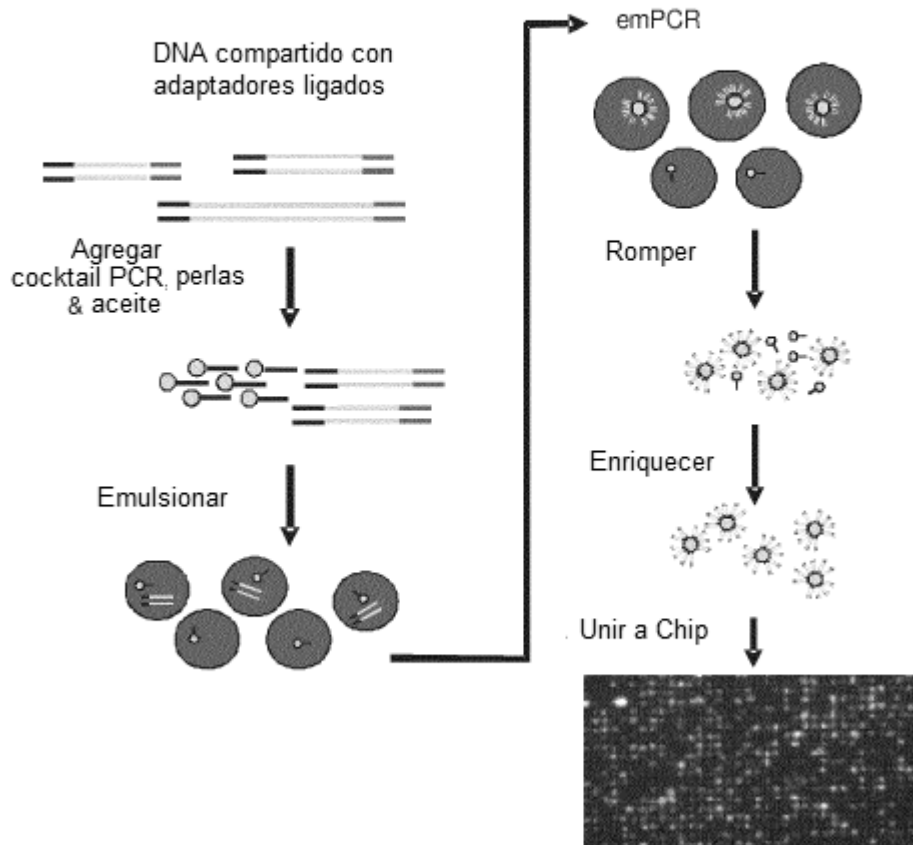


FIGURA 3

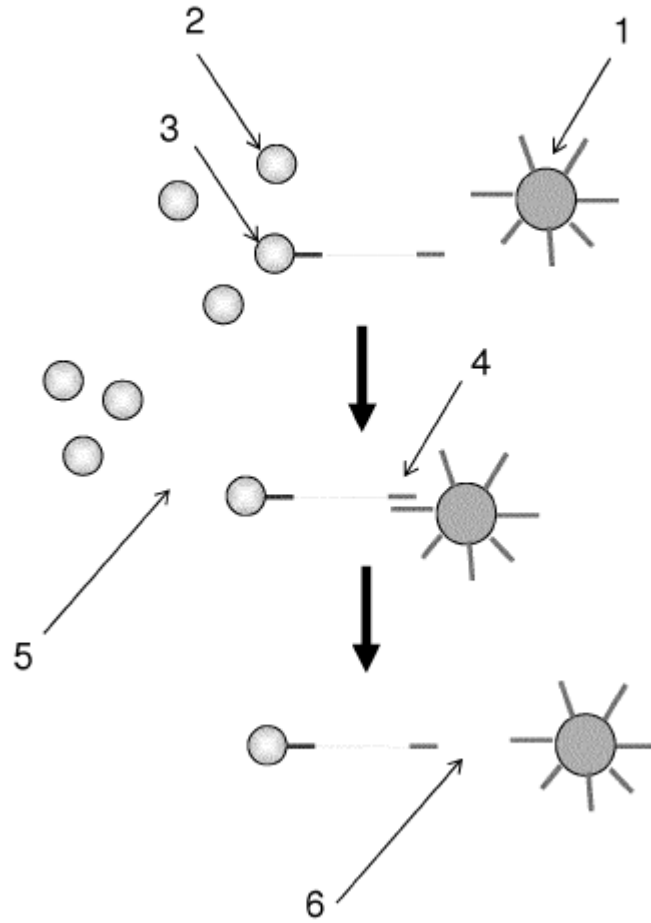


FIGURA 4

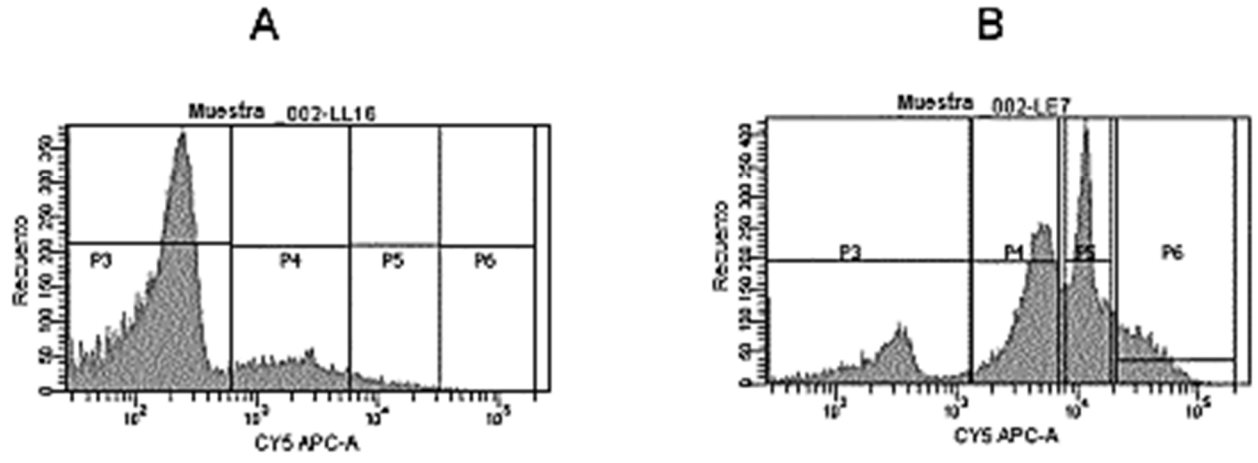
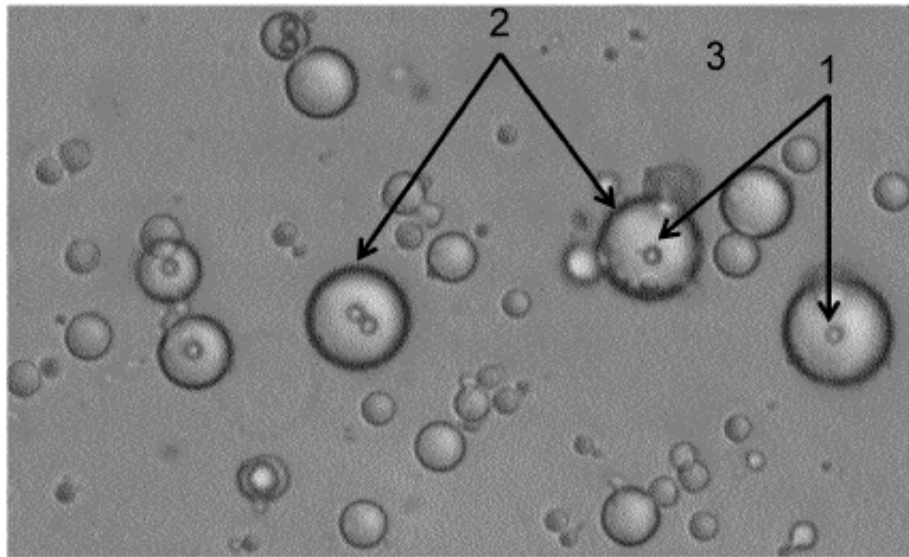
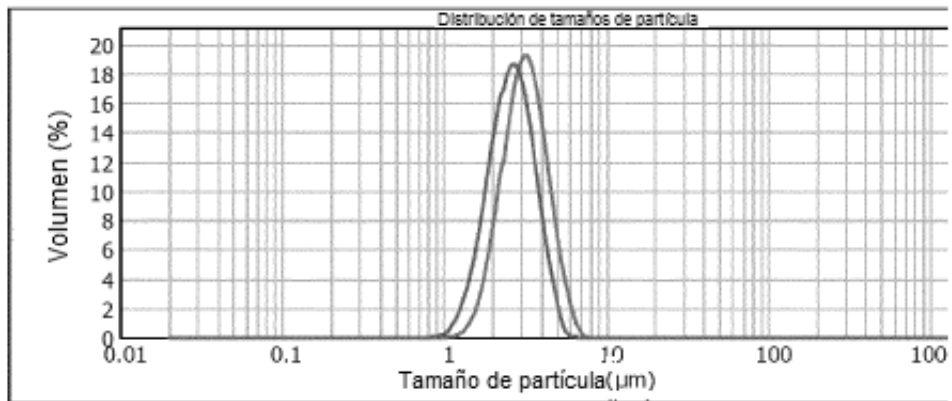


FIGURA 5



A



B

FIGURA 6

Muestra	% de recuperación
Control	97.81
388 1X	47.84
388 2X	51.03
389 1X	56.35
389 2X	37.21
1288 1X	62.73
1288 2X	44.65
1292 1X	48.91
1292 2X	34.02

FIGURA 7

	<i>Fase</i>	<i>Total de perlas contadas</i>	<i>Perlas vivas</i>	<i>% de perlas vivas</i>	<i>Intensidad promedio</i>
Muestra 1 (hibridada con Bis-biotina B2 - 46 pb)	antes de enriquecimiento	661.00	98.00	14.83	1756.26
	baja centrifugación	1190.00	33.00	2.77	1954.61
	lavado 1	557.00	168.00	30.16	2554.21
	lavado 2	784.00	420.00	53.57	2385.03
	Elución NaOH	424.00	278.00	65.57	2639.85
Muestra 2 (hibridada con cebador Bis-biotina B2 - 27 pb)	antes de enriquecimiento	593.00	108.00	18.21	2472.33
	baja centrifugación	1156.00	87.00	7.53	2522.85
	lavado 1	1786.00	155.00	8.68	2416.92
	lavado 2	319.00	84.00	26.33	2606.35
	Elución NaOH	1160.00	715.00	61.64	2431.90

FIGURA 8

Muestra	Total de perlas	%recuperación
Qiacube centrif.	4.67E+08	65.20
Qiacube lavado	1.55E+08	
no unido	6.22E+08	
Qiacube eluido	6.54E+07	
total	6.87E+08	
Vortexer centrif.	4.46E+08	60.52
Vortexer lavado	1.12E+08	
no unido	5.58E+08	
Vortexer eluido	6.07E+07	
total	6.19E+08	

	Muestra	% vivas
Qiacube	antes de enriquecimiento	20.51
	centrif.	0.84
	lavado	17.56
	elución	82.98
Vortexer	antes de enriquecimiento	20.67
	centrif.	0.76
	lavado	21.62
	elución	82.92

FIGURA 9

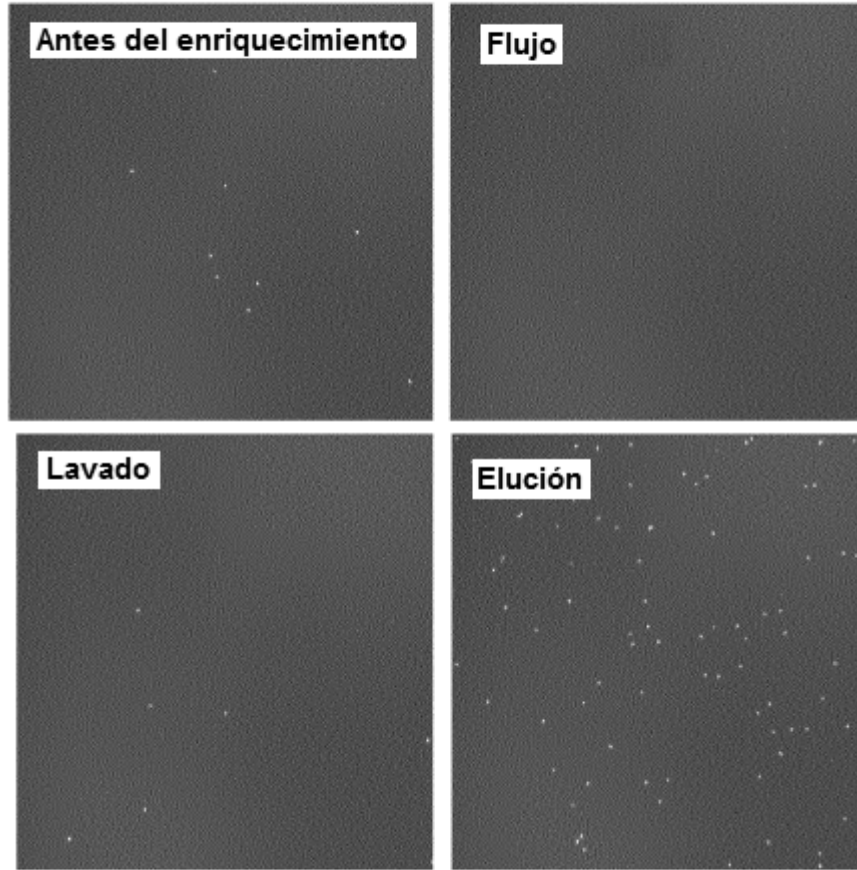


FIGURA 10

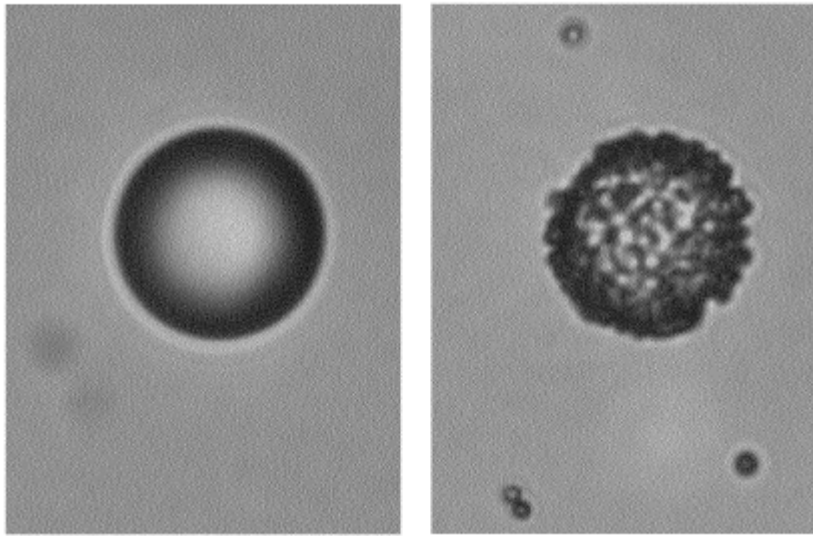


FIGURA 11

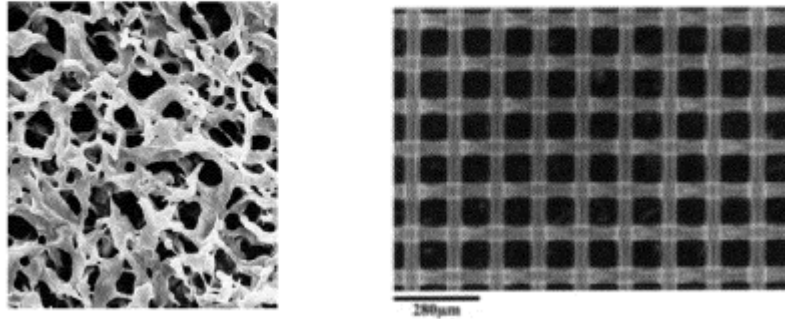


FIGURA 12

Muestra	Total de perlas	% recuperación
Qiacube centrif.	4.67E+08	65.20
Qiacube lavado	1.55E+08	
no unido	6.22E+08	
Qiacube eluido	6.54E+07	
total	6.87E+08	
Vortexer centrif.	4.46E+08	60.52
Vortexer lavado	1.12E+08	
no unido	5.58E+08	
Vortexer eluido	6.07E+07	
total	6.19E+08	

FIGURA 13

	Muestra	% vivas
Qiacube	antes de enriquecimiento	20.51
	centrif.	0.84
	lavado	17.56
	elución	82.98
Vortexer	antes de enriquecimiento	20.67
	centrif.	0.76
	lavado	21.62
	elución	82.92