

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 974**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2017 PCT/US2017/026169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17176896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2017 E 17718279 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3440220**

54 Título: **Métodos y sistemas para la construcción de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas**

30 Prioridad:

07.04.2016 US 201662319746 P
10.06.2016 US 201662348766 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2020

73 Titular/es:

ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US

72 Inventor/es:

ZHANG, ZHIHONG;
GAO, YANGBIN;
ECKHARDT, ALLEN, E. y
CAPEK, PETR

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 786 974 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 y sistemas para la construcción de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº de serie 62/319,746, presentada el 1 de abril de 2016 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº de serie 62/348,766, presentada el 10 de junio de 2016.

Campo

10 Esta descripción se refiere generalmente al campo de la producción y normalización de bibliotecas de ácidos nucleicos, y particularmente se refiere a dispositivos, sistemas y métodos para la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas adecuadas para diversas aplicaciones analíticas posteriores, tales como secuenciación de ácidos nucleicos, particularmente secuenciación de próxima generación.

Antecedentes

Los materiales descritos en esta sección no se admiten como técnica anterior por inclusión en esta sección.

15 Como práctica común, las muestras biológicas utilizadas para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos para análisis posteriores se procesan de manera homogénea de acuerdo con protocolos de ensayo estandarizados sin tener en cuenta procedimientos personalizados para cada muestra. Una medida importante de control de calidad (CC) es la concentración de ácido nucleico de las bibliotecas de ácidos nucleicos, ya que el rendimiento de muchas tecnologías modernas de análisis de ácidos nucleicos depende de la concentración de ácidos nucleicos de los ácidos nucleicos de entrada. Dado que dichos análisis posteriores normalmente usan reactivos caros e incurrir en gastos significativos para realizarlos, las muestras que no cumplen con los requisitos de concentración de ácidos nucleicos y/u otras mediciones de CC simplemente se descartan suponiendo que la preparación de la muestra era intrínsecamente inadecuada para la aplicación deseada.

20

25 Por ejemplo, en aplicaciones de secuenciación de próxima generación (NGS), también conocidas como secuenciación de alto rendimiento, a menudo es deseable pero logísticamente difícil preparar bibliotecas de ácidos nucleicos con concentraciones molares de ADN sustancialmente uniformes. Este problema a menudo surge en la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos construidas a partir de una pluralidad de muestras biológicas heterogéneas, particularmente cuando una muestra biológica fuente deseable está subrepresentada de manera desproporcionada. Este problema surge adicionalmente cuando una molécula de ácido nucleico objetivo es una especie de ácido nucleico relativamente más rara y/o más inestable en comparación con incluso otros ácidos nucleicos que derivan de la misma muestra biológica.

30

Compendio

Esta sección proporciona un resumen general de la descripción, y no abarca su alcance completo o todas sus características.

35 La presente descripción se refiere a sistemas y métodos para la amplificación y/o normalización de ácidos nucleicos que se pueden llevar a cabo en muestras o bibliotecas de ácidos nucleicos individuales con el fin de generar un conjunto principal de bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen concentraciones molares personalizadas de moléculas de ácido nucleico objetivo como se reivindica. Las realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes. También se describen en el presente documento métodos asociados para ayudar a comprender la invención, pero estos no forman parte de la invención reivindicada. Los ejemplos o realizaciones descritos en el presente documento que no están incluidos en la definición de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

40

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 ilustra una vista superior de un ejemplo de una disposición de electrodos de un accionador de gotas adecuado para usar en la realización de un protocolo de preparación de muestras de amplicones dirigido a multiplexado.

La figura 2 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. La hibridación entre moléculas de ácido nucleico objetivo y los primeros cebadores de amplificación o normalización tiene lugar sobre un soporte sólido. En este ejemplo, el soporte sólido es una pluralidad de perlas de captura. Alternativamente, el soporte sólido también puede ser una superficie de un sitio de reacción.

50

La figura 3 muestra de forma gráfica las etapas del método de la figura 2.

La figura 4 representa un diagrama de flujo de otro ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos

nucleicos como se describe en el presente documento, en donde la hibridación entre moléculas de ácido nucleico diana y los primeros cebadores de amplificación o normalización tiene lugar en fase de disolución.

La figura 5 muestra de forma gráfica las etapas del método de la figura 4.

5 La figura 6 ilustra un diagrama de flujo de otro ejemplo de un método de preparación de una muestra amplificada y/o una muestra normalizada para aplicaciones analíticas posteriores como, por ejemplo, secuenciación.

Las figuras 7A y 7B muestran de forma gráfica las etapas del método de la figura 6.

La figura 8 representa un diagrama de flujo de otro ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción.

Las figuras 9A y 9B muestran de forma gráfica las etapas del método de la figura 8.

10 La figura 10 muestra una gráfica de las distribuciones de tamaños de fragmentos en tres muestras de amplicones dirigidas preparadas usando tres protocolos diferentes, uno de los cuales es la reacción de amplificación en el accionador en dos etapas del método de la figura 6.

15 Las figuras 11A y 11B muestran una gráfica de barras de la eficiencia de la PCR por ciclo y una gráfica de barras de la uniformidad de los amplicones en cada biblioteca de la figura 10. Figura 11A: Eficiencia de la PCR por ciclo de PCR. Figura 11B: Mejoras de la uniformidad.

Las figuras 12A y 12B muestran una gráfica tridimensional del rendimiento previsto del producto intermedio extendido y una gráfica del rendimiento previsto frente al rendimiento real basado en el producto de la PCR y la entrada de sondas de captura.

20 La figura 13 muestra una gráfica de la producción relativa de bibliotecas en función de la entrada de producto de la PCR en las bibliotecas preparadas utilizando el método de la figura 6.

Las figuras 14A y 14B muestran una gráfica de uniformidad de la biblioteca y número de veces de amplificación en función de la entrada de producto de la PCR (dilución de entrada) y un gráfico de sesgo de amplificación, respectivamente, en bibliotecas preparadas usando el método de la figura 6.

25 Las figuras 15A y 15B muestran una gráfica tridimensional del rendimiento de ExAmp y una gráfica del rendimiento de ExAmp previsto frente al real en función de las concentraciones de cebador P5 y cebador P7-biotina.

La figura 16 muestra una gráfica de lecturas de muestra por objetivo obtenidas de muestras eluidas de perlas con estreptavidina usando desnaturalización por calor en un accionador de gotas y muestras que han sido desnaturalizadas adicionalmente por tratamiento con NaOH en laboratorio.

30 La figura 17 muestra una gráfica de la uniformidad de la biblioteca en función de la entrada de ADN genómico para 5 muestras diferentes.

Las figuras 18A y 18B muestran una gráfica de la precisión de detección de variantes TP (verdadero positivo) en las muestras NA20mix y una gráfica de la precisión de detección de variantes TP en la muestra HD200, respectivamente, de la figura 17.

35 La figura 19A muestra una gráfica de la frecuencia de variantes TP y FP (falso positivo) en función del cromosoma y la posición en bibliotecas genómicas preparadas usando un protocolo en laboratorio y en accionador usando el método de la figura 6.

La figura 19B muestra una gráfica del número promedio de detección de variantes FP en las muestras en laboratorio y las muestras en accionador de la figura 19A.

40 La figura 20 muestra una gráfica de la uniformidad de la biblioteca en función del ADN genómico y la complejidad del conjunto de cebadores.

Las figuras 21A, 21C, y 21B muestran una gráfica de cobertura de objetivo en la biblioteca del grupo 1 de 192-plex, una gráfica de cobertura de objetivo del grupo 1 de 192-plex en la biblioteca de mezcla de grupos 1-2 de 384-plex, y una gráfica de cobertura de objetivo del grupo 1 de 192-plex en la biblioteca de mezcla de grupos 1-3 de 580-plex descrita en Figura 20.

45 La figura 22 ilustra un diagrama de bloques funcional de un ejemplo de un sistema microfluídico que incluye un accionador de gotas, que es un ejemplo de un cartucho de fluidos.

La figura 23 ilustra gráficamente un ejemplo de un método de uso de reactivos de Ex-Amp para la amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con la descripción.

La figura 24 ilustra otro ejemplo de un método de uso de reactivos de Ex-Amp para la amplificación y normalización

de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. Dependiendo del flujo de trabajo específico, los cebadores extensibles utilizados en este método de ejemplo pueden ser cebadores de amplificación o cebadores de normalización. Los primeros cebadores de amplificación o normalización P7 inmovilizados en un soporte de fase sólida ofrecen la capacidad de normalizar las muestras de ácidos nucleicos y facilitar la purificación, mientras que los segundos cebadores de amplificación o normalización P5 en fase de disolución ofrecen una cinética rápida.

La figura 25 resume gráficamente los efectos netos de un ejemplo de un método de amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la descripción.

La figura 26 ilustra un ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, en el que la muestra de entrada contiene ácidos nucleicos bicatenarios. En este experimento, el ADN bicatenario (ADNbc) entra en el núcleo de la reacción por invasión de cadena, ya sea por el primer cebador P5 de amplificación o normalización en fase de disolución o por el segundo cebador P7 de amplificación o normalización inmovilizado en la superficie de la perla (indicado por una perla recuadrada).

La figura 27 ilustra un ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, en el que la muestra de ácido nucleico de entrada contiene ácidos nucleicos monocatenarios tales como, por ejemplo, ADN monocatenario (ADNmc). El ADN monocatenario entra por hibridación con el cebador P7 inmovilizado en la superficie de la perla o por conversión en ADNbc por el cebador P5 en fase de disolución (indicado por perlas recuadradas).

La figura 28 ilustra otro ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. La muestra de ácido nucleico de entrada, que contiene ácidos nucleicos ya fijados en perlas (recuadradas), ingresa en el núcleo de la reacción por hibridación con el cebador P5 en fase de disolución.

La figura 29 resume gráficamente los resultados de los experimentos realizados para ilustrar un ejemplo de un método de normalización de biblioteca de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. 29A: Factores de dilución en las bibliotecas de ácidos nucleicos de entrada, 29B: Rendimientos de la biblioteca obtenidos de un procedimiento de preparación de biblioteca estándar; 29C: rendimientos de la biblioteca obtenidos de un procedimiento de preparación de la biblioteca que se realizó de acuerdo con un ejemplo de un método de amplificación y normalización de ácidos nucleicos de la descripción.

Descripción detallada

La presente descripción se refiere a dispositivos, sistemas y métodos de amplificación de ácidos nucleicos que incluyen planteamientos novedosos adecuados para la construcción de muestras de ácidos nucleicos, incluyendo la construcción de bibliotecas y muestras de ácidos nucleicos amplificados/normalizados, opcionalmente de manera personalizada, para aplicaciones analíticas posteriores, que incluyen aplicaciones de secuenciación utilizando técnicas tales como la secuenciación de próxima generación (NGS) y metodologías relacionadas tales como el genotipado por secuenciación (GBS). El método incluye poner en contacto una pluralidad de muestras de ácido nucleico de entrada con una mezcla de reacción que incluye cebadores primeros y cebadores segundos, en donde los cebadores primeros y segundos pueden ser cebadores de amplificación o cebadores de normalización dependiendo de los flujos de trabajo específicos. Los primeros cebadores de amplificación o normalización se inmovilizan en un soporte sólido y los segundos cebadores de amplificación o normalización están en fase de disolución, y la amplificación o normalización de las muestras de ácido nucleico de entrada se realiza en condiciones tales que las cantidades de ácidos nucleicos en las muestras amplificadas/normalizadas resultantes están en concentraciones sustancialmente similares entre sí, independientemente de las cantidades de muestras de entrada. Sustancialmente, todos los primeros cebadores de amplificación o normalización se incorporan a los productos de amplificación. Por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, 100% o un intervalo definido por cualesquiera dos valores anteriores, de los primeros cebadores de amplificación o normalización se incorporan a los productos de amplificación. Se describen además sistemas y dispositivos de accionamiento de gotas que están configurados para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. También se proporcionan bibliotecas de ácidos nucleicos preparadas de acuerdo con los métodos descritos.

Se describen en el presente documento dispositivos accionadores de gotas y métodos de preparación de muestras o bibliotecas de amplicones específicas para aplicaciones analíticas posteriores, tales como, por ejemplo, aplicaciones de secuenciación. El uso de tecnología microfluídica digital, los dispositivos accionadores de gotas y los métodos de la descripción proporcionan el manejo automatizado de líquidos para la amplificación y selección de regiones específicas de ADN genómico para procesar en muestras o bibliotecas de amplicones para aplicaciones analíticas posteriores, p.ej. secuenciación. En varios ejemplos, los parámetros de construcción de la biblioteca, tales como la entrada de ADN (p.ej., 1 ng o menos), el rendimiento y la uniformidad de la biblioteca, el tiempo hasta el resultado y el consumo de reactivos se mejoran sustancialmente con respecto al estado actual de la técnica.

Algunos métodos descritos en el presente documento usan una reacción de amplificación de 2 etapas, en donde una primera reacción de amplificación es dirigida por cebadores específicos del objetivo y una segunda reacción de amplificación es dirigida por cebadores universales. La reacción de amplificación de 2 etapas permite la selección de

las condiciones de reacción (p.ej., temperaturas de reasociación y extensión, tiempos de incubación y número de ciclos de PCR) específicas para cada tipo de amplificación, p. ej., amplificación de cebador específico del objetivo o amplificación de cebador universal, y proporciona una amplificación dirigida más eficiente (p.ej., rendimiento y uniformidad de la biblioteca mejorados).

5 Los amplicones dirigidos en las muestras o bibliotecas de ácidos nucleicos resultantes después se enriquecen en una reacción de hibridación basada en disolución usando sondas de captura específicas del objetivo y después se inmovilizan en perlas de captura para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos de los métodos descritos en el presente documento, una reacción de hibridación basada en disolución en general es más favorable
10 cinéticamente en comparación con una reacción de hibridación en fase sólida, creando así un sistema más robusto y proporcionando una captura de objetivos mejorada, así como una uniformidad y especificidad mejoradas a lo largo de múltiples muestras y/o bibliotecas.

Algunos de los métodos descritos en el presente documento emplean al menos un conjunto de primeros cebadores de amplificación o normalización en fase de disolución y al menos otro conjunto de segundos cebadores de amplificación o normalización inmovilizados en un soporte de fase sólida durante la amplificación o normalización de la biblioteca de ácidos nucleicos. Esta característica de este aspecto de la descripción difiere ventajosamente de los procedimientos de preparación de bibliotecas actuales en los que ambos cebadores están en una fase de disolución o ambos cebadores están fijados en una fase sólida. Además, en algunas implementaciones particulares de los métodos descritos en el presente documento, el conjunto de primeros cebadores inmovilizados en el soporte sólido se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y el conjunto de segundos cebadores en disolución se proporciona en una cantidad que excede la cantidad de los primeros cebadores. Las ventajas obtenidas por esta configuración de cebadores específicos son dos: (1) Permite lavar convenientemente cualquier producto de amplificación que se encuentre en disolución después de la amplificación, lo que da como resultado una cantidad amplificada/normalizada de productos de amplificación que permanecen inmovilizados en el soporte sólido que posteriormente se puede aislar, de modo que se pueda generar una cantidad predefinida de productos de amplificación. En contraste, los métodos de preparación de bibliotecas existentes típicamente producen cantidades en exceso de productos de amplificación, que se miden y después se someten a una etapa de dilución para obtener las cantidades deseadas; (2) en algunas implementaciones particulares, los métodos descritos en el presente documento permiten la construcción de una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos en las que las cantidades de ADN producidas se normalizan a concentraciones sustancialmente uniformes a lo largo de las bibliotecas independientemente de las cantidades de muestras de ADN de entrada.

En un aspecto, los métodos de la descripción usan un procedimiento de amplificación de exclusión cinética, también denominado reacción de amplificación de exclusión (ExAmp) para igualar las cantidades de muestra y ajustar la concentración de ADN de amplicones para aplicaciones de secuenciación posteriores. En algunas realizaciones, la reacción de normalización de la biblioteca de ExAmp es una reacción de amplificación isotérmica que usa una primera secuencia de cebador (p.ej., cebador que incluye una secuencia de cebador P7) inmovilizado sobre las perlas de captura y una segunda secuencia de cebador (p.ej., cebador que incluye una secuencia de cebador P5) en disolución como cebadores de normalización para la normalización de la biblioteca. En general, un procedimiento de normalización de la biblioteca se puede llevar a cabo a lo largo de una amplia gama de entradas de productos de PCR (amplicón) (p.ej., los que tienen más de al menos dos órdenes de cambio de magnitud de entrada). Además, las condiciones de reacción (p.ej., tiempo de incubación, concentración de cebador P7 y/o P5, y componentes de reacción) se pueden seleccionar de modo que todos los cebadores disponibles inmovilizados sobre las perlas de captura se extiendan en amplicones, p.ej., la reacción se deja que proceda hasta la saturación.

En general, la flexibilidad y la capacidad de programación de un dispositivo accionador de gotas proporciona el control preciso sobre las diversas reacciones bioquímicas realizadas durante la construcción de una muestra o biblioteca de amplicones dirigida.

En una aplicación ilustrada, los accionadores de gotas y los métodos de la descripción se usan para la preparación de una muestra o biblioteca de amplicones dirigida para la identificación de variantes genéticas, p. ej., polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a las figuras adjuntas, que forman parte de la misma.

50 Algunas definiciones

A menos que se definan de otra forma, todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos o terminología científica utilizados en el presente documento pretenden tener el significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción cuando se lee a la luz de esta descripción. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y/o para una referencia rápida, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial frente a lo que generalmente se entiende en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en el presente documento los entienden bien y usan habitualmente los expertos en la técnica que usan metodología convencional.

Las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una molécula" incluye una o más moléculas, incluidas sus mezclas. Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" puede ser singular o inclusivo. Por ejemplo, "A y/o B" se usa en el presente documento para incluir todas las siguientes alternativas: "A", "B" y "A y B".

- 5 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, tiene su significado ordinario de aproximadamente. Si el grado de aproximación no está claro por el contexto, "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor proporcionado, o redondeado a la cifra significativa más cercana, en todos los casos, incluido el valor proporcionado. Cuando se proporcionan intervalos, incluyen los valores límite.

- 10 El término "activar", como se usa en el presente documento con referencia a uno o más electrodos, significa producir un cambio en el estado eléctrico de uno o más electrodos que, en presencia de una gota, da como resultado una operación de gotas. La activación de un electrodo se puede lograr utilizando corriente alterna (CA) o corriente continua (CC). Se puede usar cualquier voltaje adecuado. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando un voltaje que es mayor de aproximadamente 150 V, o mayor de aproximadamente 200 V, o mayor de aproximadamente 250 V, o de aproximadamente 275 V a aproximadamente 1000 V, o aproximadamente 300 V. Cuando se utiliza señal de CA, se puede emplear cualquier frecuencia adecuada. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando una señal de CA que tiene una frecuencia de aproximadamente 1 Hz a aproximadamente 10 MHz, o de aproximadamente 10 Hz a aproximadamente 60 Hz, o de aproximadamente 20 Hz a aproximadamente 40 Hz, o aproximadamente 30 Hz.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "gota" significa un volumen de líquido en un accionador de gotas. Típicamente, una gota está al menos parcialmente delimitada por un fluido de carga. Por ejemplo, una gota puede estar completamente rodeada por un fluido de carga o puede estar delimitada por fluido de carga y una o más superficies del accionador de gotas. Como otro ejemplo, una gota puede estar delimitada por el fluido de carga, una o más superficies del accionador de gotas y/o la atmósfera. Como otro ejemplo más, una gota puede estar delimitada por el fluido de carga y la atmósfera. Las gotas pueden, por ejemplo, ser acuosas o no acuosas o pueden ser mezclas o emulsiones que incluyen componentes acuosos y no acuosos. Las gotas pueden tomar una gran variedad de formas; los ejemplos no limitantes incluyen generalmente forma de disco, forma de bala, esfera truncada, elipsoide, esférica, esfera parcialmente comprimida, semiesférica, ovoide, cilíndrica, combinaciones de dichas formas y varias formas formadas durante las operaciones de gotas, tales como fusión o división, o formadas como resultado del contacto de dichas formas con una o más superficies de un accionador de gotas. Para ver ejemplos de fluidos de gotas que se pueden someter a operaciones de gotas usando el planteamiento de la presente descripción, véase Eckhardt et al., la publicación de patente internacional N° WO2007/120241, titulada "Droplet-Based Biochemistry", publicada el 25 de octubre de 2007.

- 20 Una gota puede incluir una muestra biológica, tal como sangre completa, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido seminal, excreción vaginal, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, transudados, exudados, fluido quístico, bilis, orina, fluido gástrico, fluido intestinal, muestras fecales, líquidos que contienen células simples o múltiples, líquidos que contienen orgánulos, tejidos fluidizados, organismos fluidizados, líquidos que contienen organismos multicelulares, frotis biológicos y lavados biológicos. Además, una gota puede incluir un reactivo, tal como agua, agua desionizada, disoluciones salinas, disoluciones ácidas, disoluciones básicas, disoluciones detergentes y/o tampones. Una gota puede incluir ácidos nucleicos, tales como ADN, ADN genómico, ARN, ARNm o análogos de los mismos; nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos, tales como análogos que tienen restos terminadores tales como los descritos en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008); Gormley et al. Publicación de patente internacional N° WO/2013/131962, titulada "Improved Methods of Nucleic Acid Sequencing", publicada el 12 de septiembre de 2013; Barnes et al., Patente de EE.UU. N° 7,057,026, titulada "Labelled Nucleotides", concedida el 6 de junio de 2006; Kozlov et al. Publicación de patente internacional N° WO/2008/042067, titulada "Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing", publicada el 10 de abril de 2008; Rigatti et al. Publicación de patente internacional N° WO/2013/117595, titulada "Targeted Enrichment and Amplification of Nucleic Acids on a Support", publicada el 15 de agosto de 2013; Hardin et al., Patente de EE.UU. N° 7,329,492, titulada "Methods for Real Time Single Molecule Sequence Determination", publicada el 12 de febrero de 2008; Hardin et al., Patente de EE.UU. N° 7,211,414, titulada "Enzymatic Nucleic Acid Synthesis: Compositions and Methods for Altering Monomer Incorporation Fidelity", publicada el 1 de mayo de 2007; Turner et al., Patente de EE.UU. N° 7,315,019, titulada "Arrays of Optical Confinements and Uses Thereof", publicada el 1 de enero de 2008; Xu et al., Patente de EE.UU. N° 7,405,281, titulada "Fluorescent nucleotide Analogs and Uses Therefor", publicada el 29 de julio de 2008; y Rank et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20080108082, titulada "Polymerase Enzymes and Reagents for Enhanced Nucleic Acid Sequencing", publicada el 8 de mayo de 2008; enzimas tales como polimerasas, ligasas, recombinasas o transposasas; parejas de unión tales como anticuerpos, epítomos, estreptavidina, avidina, biotina, lectinas o carbohidratos; u otras moléculas bioquímicamente activas. Otros ejemplos de contenidos de gotas incluyen reactivos, tales como un reactivo para un protocolo bioquímico, tal como un protocolo de amplificación de ácido nucleico, un protocolo de ensayo basado en afinidad, un protocolo de ensayo enzimático, un protocolo de secuenciación y/o un protocolo para análisis de fluidos biológicos. Según algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, una gota puede incluir una o más perlas dependiendo de los flujos de trabajo específicos y/o aplicaciones posteriores.

La expresión "accionador de gotas", como se usa en el presente documento, significa un dispositivo para manipular gotas. Para ejemplos de accionadores de gotas, véase Pamula et al., Patente de EE.UU. N° 6,911,132, titulada

"Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques", publicada el 28 de junio de 2005; Pamula et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20060194331, titulada "Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board", publicada el 31 de agosto de 2006; Pollack et al., Publicación de patente internacional Nº WO/2007/120241, titulada "Droplet-Based Biochemistry", publicada el 25 de octubre de 2007; Shenderov, Patente de EE.UU. Nº 6,773,566, titulada "Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same", concedida el 10 de agosto de 2004; Shenderov, Patente de EE.UU. Nº 6,565,727, titulada "Actuators for Microfluidics Without Moving Parts", concedida el 20 de mayo de 2003; Kim et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20030205632, titulada "Electrowetting-driven Micropumping", publicada el 6 de noviembre de 2003; Kim et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20060164490, titulada "Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle", publicada el 27 de julio de 2006; Kim et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20070023292, titulada "Small Object Moving on Printed Circuit Board", publicada el 1 de febrero de 2007; Shah et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20090283407, titulada "Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics", publicada el 19 de noviembre de 2009; Kim et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20100096266, titulada "Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip", publicada el 22 de abril de 2010; Velez, Patente de EE.UU. Nº 7,547,380, titulada "Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface", concedida el 16 de junio de 2009; Sterling et al., Patente de EE.UU. Nº 7,163,612, titulada "Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like", concedida el 16 de enero de 2007; Becker et al., Patente de EE.UU. Nº 7,641,779, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", concedida el 5 de enero de 2010; Becker et al., Patente de EE.UU. Nº 6,977,033, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", concedida el 20 de diciembre de 2005; Decre et al., Patente de EE.UU. Nº 7,328,979, titulada "System for Manipulation of a Body of Fluid", concedida el 12 de febrero de 2008; Yamakawa et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20060039823, titulada "Chemical Analysis Apparatus", publicada el 23 de febrero de 2006; Wu, Publicación de patente de EE.UU. Nº 20110048951, titulada "Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes", publicada el 3 de marzo de 2011; Fouillet et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20090192044, titulada "Electrode Addressing Method", publicada el 30 de julio de 2009; Fouillet et al., Patente de EE.UU. Nº 7,052,244, titulada "Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces", concedida el 30 de mayo de 2006; Marchand et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20080124252, titulada "Droplet Microreactor", publicada el 29 de mayo de 2008; Adachi et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20090321262, titulada "Liquid Transfer Device", publicada el 31 de diciembre de 2009; Roux et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20050179746, titulada "Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates", publicada el 18 de agosto de 2005; y Dhindsa et al., "Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality", Lab Chip, 10: 832-836 (2010). Se describe un sistema microfluídico para llevar a cabo la PCR en emulsión en p. ej. el documento WO2007/133710 A2.

De acuerdo con la descripción, ciertos accionadores de gotas incluirán uno o más sustratos dispuestos con un espacio de operaciones de gotas entre ellos y electrodos asociados con (p.ej., en capas, unidos y/o embebidos en) uno o más sustratos y dispuestos para realizar una o más operaciones de gotas. Por ejemplo, ciertos accionadores de gotas incluirán un sustrato base (o inferior), electrodos de operación de gotas asociados con el sustrato, una o más capas dieléctricas encima del sustrato y/o electrodos, y opcionalmente una o más capas hidrófobas encima del sustrato, capas dieléctricas y/o los electrodos que forman una superficie de operaciones de gotas. También se puede proporcionar un sustrato superior, que está separado de la superficie de operaciones de gotas por un espacio, comúnmente denominado espacio de operaciones de gotas. Se describen diversas disposiciones de electrodos en los sustratos superior y/o inferior en las patentes y solicitudes a las que se hace referencia en el presente documento y se describen ciertas disposiciones de electrodos novedosas en la descripción de la presente descripción. Durante las operaciones de gotas, se prefiere que las gotas permanezcan en contacto continuo o contacto frecuente con un electrodo de masa o de referencia. Se puede asociar un electrodo de masa o de referencia con el sustrato superior de cara al espacio, el sustrato inferior de cara al espacio, en el espacio. Cuando se proporcionan electrodos en ambos sustratos, los contactos eléctricos para acoplar los electrodos a un instrumento accionador de gotas para controlar o vigilar los electrodos pueden estar asociados con una o ambas placas. En algunos casos, los electrodos en un sustrato están acoplados eléctricamente al otro sustrato, de modo que solo un sustrato está en contacto con el accionador de gotas. En algunos ejemplos, un material conductor (p.ej., un compuesto epoxídico, tal como el Sistema de polímero EP79 MASTER BOND™, disponible en Master Bond, Inc., Hackensack, NJ) proporciona la conexión eléctrica entre los electrodos en un sustrato y las rutas eléctricas en los otros sustratos, p.ej., un electrodo de masa en un sustrato superior puede estar acoplado a una ruta eléctrica en un sustrato inferior por dicho material conductor. Cuando se usan múltiples sustratos, se puede proporcionar un espaciador entre los sustratos para determinar la altura del espacio entre ellos y definir depósitos dispensadores en el accionador. La altura del espaciador puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 5 µm, 100 µm, 200 µm, 250 µm, 275 µm o más. Alternativa o adicionalmente, la altura del espaciador puede ser como máximo de aproximadamente 600 µm, 400 µm, 350 µm, 300 µm o menos. El espaciador puede, por ejemplo, estar formado por una capa de proyecciones que forman los sustratos superior o inferior, y/o un material insertado entre los sustratos superior e inferior. Se pueden proporcionar una o más aberturas en el uno o más sustratos para formar una ruta de fluido a través de la cual se puede suministrar líquido en el espacio de operaciones de gotas. La una o más aberturas pueden estar alineadas en algunos casos para la interacción con uno o más electrodos, p.ej., alineadas de manera que el líquido que fluye a través de la abertura se acerque lo suficiente a uno o más electrodos de operaciones de gotas para permitir que los electrodos de operaciones de gotas realicen una operación de gotas usando el líquido. Los sustratos base (o fondo) y superior en algunos casos pueden estar formados

como un componente integral. Se pueden proporcionar uno o más electrodos de referencia en los sustratos base (o fondo) y/o superior y/o en el espacio. Se proporcionan ejemplos de disposiciones de electrodos de referencia en las patentes y solicitudes de patentes a las que se hace referencia en el presente documento. En diversas realizaciones, la manipulación de gotas por un accionador de gotas puede estar mediada por electrodo, p.ej., mediada por electrohumectación o mediada por dielectroforesis o mediada por fuerza de Coulomb.

Los ejemplos de otras técnicas para controlar las operaciones de gotas que pueden usarse en los accionadores de gotas de la presente descripción incluyen el uso de dispositivos que inducen presión fluidica hidrodinámica, tales como los que operan basados en principios mecánicos (p. ej., bombas de jeringa externas, bombas de membrana neumáticas, bombas de membrana vibratorias, dispositivos de vacío, fuerzas centrífugas, bombas piezoeléctricas/ultrasónicas y fuerzas acústicas); principios eléctricos o magnéticos (p. ej., flujo electroosmótico, bombas electrocinéticas, tapones ferrofluidicos, bombas electrohidrodinámicas, atracción o repulsión utilizando fuerzas magnéticas y bombas magnetohidrodinámicas); principios termodinámicos (p. ej., generación de burbujas de gas/expansión de volumen inducida por cambio de fase); otros tipos de principios de humectación superficial (p.ej., electrohumectación y optoelectrohumectación, así como gradientes de tensión superficial inducidos de forma química, térmica, estructural y radioactiva); gravedad; tensión superficial (p. ej., acción capilar); fuerzas electrostáticas (p. ej., flujo electroosmótico); flujo centrífugo (sustrato dispuesto en un disco compacto y rotado); fuerzas magnéticas (p. ej., los iones oscilantes causan flujo); fuerzas magnetohidrodinámicas; y vacío o presión diferencial. En ciertos casos, se pueden emplear combinaciones de dos o más de las técnicas anteriores para llevar a cabo una operación de gotas en un accionador de gotas de la presente descripción. Del mismo modo, uno o más de los anteriores pueden usarse para suministrar líquido en un espacio de operaciones de gotas, p. ej., desde un depósito en otro dispositivo o desde un depósito externo del accionador de gotas (p. ej., un depósito asociado con un sustrato del accionador de gotas y una ruta de flujo desde el depósito al espacio de operaciones de gotas).

Las superficies de operaciones de gotas de ciertos accionadores de gotas de la presente descripción pueden estar hechas de materiales hidrófobos o pueden estar recubiertas o tratadas para hacerlas hidrófobas. Por ejemplo, en algunos casos, una parte o la totalidad de las superficies de operaciones de gotas pueden derivatizarse con materiales o productos químicos de baja energía superficial, p. ej., por deposición o usando síntesis in situ usando compuestos tales como compuestos poli o per-fluorados en disolución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen TEFLON® AF (disponible de DuPont, Wilmington, DE), miembros de la familia de materiales Cytop, recubrimientos de la familia FLUOROPEL® de recubrimientos hidrófobos y superhidrófobos (disponibles en Cytonix Corporation, Beltsville, MD), recubrimientos de silano, recubrimientos de fluorosilano, derivados de fosfonato hidrófobos (p. ej., los vendidos por Aculon, Inc.) y los recubrimientos electrónicos NOVEC™ (disponibles de 3M Company, St. Paul, MN), otros monómeros fluorados para la deposición de vapor químico potenciado por plasma (PECVD) y organosiloxano (p. ej., SiOC) para PECVD. En algunos casos, la superficie de operaciones de gotas puede incluir un recubrimiento hidrófobo que tiene un espesor que varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1 000 nm. Además, en algunas realizaciones, el sustrato superior del accionador de gotas incluye un polímero orgánico conductor de electricidad, que luego se recubre con un recubrimiento hidrófobo o se trata de otro modo para hacer hidrófoba la superficie de operaciones de gotas. Por ejemplo, el polímero orgánico conductor de electricidad que se deposita sobre un sustrato plástico puede ser poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estirenosulfonato) (PEDOT:PSS). Se describen otros ejemplos de polímeros orgánicos conductores de electricidad y capas conductoras alternativas en Pollack et al. Publicación de patente internacional N° WO/2011/002957, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods", publicada el 6 de enero de 2011. Uno o ambos sustratos pueden fabricarse utilizando una placa de circuito impreso (PCB), vidrio, vidrio recubierto con óxido de indio y estaño (ITO) y/o materiales semiconductores como el sustrato. Cuando el sustrato es vidrio recubierto con ITO, el recubrimiento de ITO tiene, por ejemplo, un espesor de al menos aproximadamente 20 nm, 50 nm, 75 nm, 100 nm o más. Alternativa o adicionalmente, el espesor puede ser como máximo de aproximadamente 200 nm, 150 nm, 125 nm o menos. En algunos casos, el sustrato superior y/o inferior incluye un sustrato de PCB que está recubierto con un dieléctrico, tal como un dieléctrico de polimida, que en algunos casos también puede estar recubierto o tratado de otro modo para hacer hidrófobas las superficies de operaciones de gotas. Cuando el sustrato incluye una PCB, los siguientes materiales son ejemplos de materiales adecuados: MITSUI™ BN-300 (disponible de MITSUI Chemicals America, Inc., San Jose, CA); ARLON™ 11N (disponible de Arlon, Inc., Santa Ana, CA); NELCO® N4000-6 y N5000-30/32 (disponible de Park Electrochemical Corp., Melville, NY); ISOLA™ FR406 (disponible de Isola Group, Chandler, AZ), especialmente IS620; familia de fluoropolímeros (adecuada para la detección de fluorescencia ya que tiene baja fluorescencia de fondo); familia de poliimidias; poliéster; poli(naftalato de etileno); policarbonato; polieteretercetona; polímero de cristal líquido; copolímero de cicloolefina (COC); polímero de cicloolefina (COP); aramida; refuerzo de aramida no tejido THERMOUNT® (disponible de DuPont, Wilmington, DE); fibra de marca NOMEX® (disponible de DuPont, Wilmington, DE); y papel. Varios materiales también son adecuados para su uso como el componente dieléctrico del sustrato. Los ejemplos incluyen: dieléctrico depositado por vapor, tal como PARYLENE™ C (especialmente sobre vidrio), PARYLENE™ N y PARYLENE™ HT (para alta temperatura, ~300°C) (disponible de Parylene Coating Services, Inc., Katy, TX); recubrimientos TEFLON® AF; Cytop; máscaras de soldadura, tales como máscaras de soldadura líquidas fotogenerador de imágenes (p. ej., en PCB) como las series TAIYO™ PSR4000, TAIYO™ PSR y AUS (disponibles en Taiyo America, Inc. Carson City, NV) (buenas características térmicas para aplicaciones que implican control térmico), y PROBIMER™ 8165 (buenas características térmicas para aplicaciones que implican control térmico (disponible de Huntsman Advanced Materials Americas Inc., Los Ángeles, CA); máscara de soldadura de película seca, tal como las de la línea de máscaras de soldadura de película seca VACREL® (disponible en DuPont, Wilmington, DE); dieléctricos de película, tales como la película de poliimida (p. ej.,

5 película de poliimida KAPTON®, disponible en DuPont, Wilmington, DE), polietileno y fluoropolímeros (p. ej., FEP), politetrafluoroetileno; poliéster; poli(naftalato de etileno); copolímero de cicloolefina (COC); polímero de cicloolefina (COP); cualquier otro material de sustrato de PCB mencionado anteriormente; resina de matriz negra; polipropileno; y materiales negros de circuito flexible, tales como DuPont™ Pyralux® HXC y DuPont™ Kapton® MBC (disponible en DuPont, Wilmington, DE).

10 El voltaje y la frecuencia del transporte de gotas se pueden seleccionar para el funcionamiento con reactivos utilizados en protocolos de ensayo específicos. Los parámetros de diseño pueden variar, p.ej., el número y la ubicación de los depósitos en el accionador, número de conexiones de electrodos independientes, tamaño (volumen) de los diferentes depósitos, la colocación de zonas de lavado de imanes/perlas, tamaño del electrodo, espaciado entre electrodos y altura del espacio (entre los sustratos superior e inferior) se pueden variar para usar con reactivos, protocolos, volúmenes de gotas específicos, etc. En algunos casos, un sustrato de la presente descripción se puede derivatizar con materiales o productos químicos de baja energía superficial, p.ej., usando deposición o síntesis in situ usando compuestos poli o perfluorados en disolución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen recubrimientos TEFLON® AF y recubrimientos FLUOROPEL® para recubrimiento por inmersión o pulverización, otros monómeros fluorados para deposición química de vapor asistida por plasma (PECVD) y organosiloxano (p.ej., SiOC) para PECVD. Además, en algunos casos, una parte o la totalidad de la superficie de operaciones de gotas puede estar recubierta con una sustancia para reducir el ruido de fondo, tal como la fluorescencia de fondo de un sustrato de PCB. Por ejemplo, el recubrimiento reductor de ruido puede incluir una resina de matriz negra, tales como las resinas de matriz negra disponibles de Toray industries, Inc., Japón.

20 Los electrodos de un accionador de gotas son controlados típicamente por un controlador o un procesador, que se proporciona como parte de un sistema, que puede incluir funciones de procesamiento, así como almacenamiento de datos y software y prestaciones de entrada y salida. Se pueden proporcionar reactivos en el accionador de gotas en el espacio de operaciones de gotas o en un depósito acoplado de forma fluida al espacio de operaciones de gotas. Los reactivos pueden estar en forma líquida, p. ej., gotas, o se pueden proporcionar en una forma reconstituible en el espacio de operaciones de gotas o en un depósito acoplado de forma fluida con el espacio de operaciones de gotas. Los reactivos reconstituibles pueden combinarse típicamente con líquidos para la reconstitución. Un ejemplo de reactivos reconstituibles adecuados para usar con los métodos y aparatos expuestos en el presente documento incluye los descritos en Meathrel et al., patente de EE.UU. Nº 7,727,466, titulada "Disintegratable Films for Diagnostic Devices", concedida el 1 de junio de 2010.

30 "Operación de gotas", como se usa en el presente documento, significa cualquier manipulación de una gota en un accionador de gotas. Una operación de gotas puede, por ejemplo, incluir: cargar una gota en el accionador de gotas; dispensar una o más gotas de una gota fuente; escindir, separar o dividir una gota en dos o más gotas; transportar una gota de un lugar a otro en cualquier dirección; fusionar o combinar dos o más gotas en una sola gota; diluir una gota; mezclar una gota; agitar una gota; deformar una gota; retener una gota en posición; incubar una gota; calentar una gota; vaporizar una gota; enfriar una gota; desechar una gota; transportar una gota fuera de un accionador de gotas; otras operaciones de gotas descritas en el presente documento; y/o cualquier combinación de lo anterior. Los términos "fusiona", "fusionar", "combina", "combinar" y similares se usan para describir la creación de una gota a partir de dos o más gotas. Debe entenderse que cuando dicho término se usa en referencia a dos o más gotas, puede usarse cualquier combinación de operaciones de gotas que sea suficiente para dar como resultado la combinación de las dos o más gotas en una gota. Por ejemplo, la "fusión de la gota A con la gota B" se puede lograr transportando la gota A en contacto con una gota B estacionaria, transportando la gota B en contacto con una gota A estacionaria o transportando las gotas A y B en contacto entre sí. Los términos "escisión", "separación" y "división" no pretenden implicar ningún resultado particular con respecto al volumen de las gotas resultantes (es decir, el volumen de las gotas resultantes puede ser igual o diferente) o el número de gotas resultantes (el número de gotas resultantes puede ser 2, 3, 4, 5 o más). El término "mezclar" se refiere a operaciones de gotas que dan como resultado una distribución más homogénea de uno o más componentes dentro de una gota. Ejemplos de operaciones de gotas de "carga" incluyen carga de microdiálisis, carga asistida por presión, carga robótica, carga pasiva y carga de pipeta. Las operaciones de gotas pueden estar mediadas por electrodos. En algunos casos, las operaciones de gotas se ven facilitadas aún más por el uso de regiones hidrófilas y/o hidrófobas en las superficies y/o por obstáculos físicos. Para ver ejemplos de operaciones de gotas, véanse las patentes y solicitudes de patentes citadas anteriormente bajo la definición de "accionador de gotas". A veces se pueden usar técnicas de detección o de formación de imágenes de impedancia o capacitancia para determinar o confirmar el resultado de una operación de gotas. Ejemplos de dichas técnicas se describen en Sturmer et al., Publicación de patente de EE.UU. Nº 20100194408, titulada "Capacitance Detection in a Droplet Actuator", publicada el 5 de agosto de 2010. En términos generales, las técnicas de detección o formación de imágenes se pueden usar para confirmar la presencia o ausencia de una gota en un electrodo específico. Por ejemplo, la presencia de una gota dispensada en el electrodo de destino después de una operación de dispensación de gotas confirma que la operación de dispensación de gotas fue efectiva. De manera similar, la presencia de una gota en un punto de detección en una etapa adecuada en un protocolo de ensayo puede confirmar que un conjunto previo de operaciones de gotas ha producido con éxito una gota para la detección. El tiempo de transporte de gotas puede ser bastante rápido. Por ejemplo, el transporte de una gota de un electrodo al siguiente puede superar aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente 0.1 s, o aproximadamente 0.01 s, o aproximadamente 0.001 s. En algunos casos, el electrodo funciona en modo CA pero se cambia al modo CC para obtener imágenes. Es útil para llevar a cabo operaciones de gotas que el área de la huella de la gota sea similar al área de electrohumectación; en otras palabras,

la operación con 1x-, 2x- 3x-gotas es controlada de manera útil utilizando 1, 2 y 3 electrodos, respectivamente. Si la huella de la gota es mayor que el número de electrodos disponibles para llevar a cabo una operación de gotas en un momento dado, la diferencia entre el tamaño de la gota y el número de electrodos no debería ser mayor que 1; en otras palabras, una gota 2x se controla de forma útil usando 1 electrodo y una gota 3x se controla de forma útil usando 2 electrodos. Cuando las gotas incluyen perlas, es útil que el tamaño de la gota sea igual al número de electrodos que controlan la gota, p. ej., que transportan la gota.

"Fluido de carga" significa un fluido asociado con un sustrato de operaciones de gotas de un accionador de gotas, cuyo fluido es suficientemente inmiscible con una fase de gotas para hacer que la fase de gotas se someta a operaciones de gotas mediadas por electrodos. Por ejemplo, el espacio de operaciones de gotas de un accionador de gotas se llena típicamente con un fluido de carga. El fluido de carga puede, por ejemplo, ser o incluir un aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de carga de hexadecano. El fluido de carga puede ser o incluir un aceite halogenado, tal como un aceite fluorado o perfluorado. El fluido de carga puede llenar todo el espacio del accionador de gotas o puede cubrir una o más superficies del accionador de gotas. Los fluidos de carga pueden ser conductores o no conductores. Se pueden seleccionar fluidos de carga para mejorar las operaciones de gotas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias objetivo de las gotas, mejorar la formación de microgotas, reducir la contaminación cruzada entre gotas, reducir la contaminación de las superficies del accionador de gotas, reducir la degradación de los materiales del accionador de gotas, etc. Por ejemplo, los fluidos de carga pueden seleccionarse para la compatibilidad con los materiales del accionador de gotas. Como ejemplo, se pueden usar fluidos de carga fluorados de manera útil con recubrimientos de superficie fluorados. Los fluidos de carga fluorados son útiles para reducir la pérdida de compuestos lipófilos, tales como sustratos de umbeliferona como los sustratos de 6-hexadecanoilamido-4-metilumbeliferona (p.ej., para usar en ensayos de Krabbe, Niemann-Pick u otros); otros sustratos de umbeliferona se describen en Winger et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20110118132, titulada "Enzymatic Assays Using Umbelliferone Substrates with Cyclodextrins in Droplets of Oil", publicado el 19 de mayo de 2011. Entre los ejemplos de aceites fluorados adecuados se incluyen los de la línea Galden, tales como Galden HT170 (p.e. = 170°C, viscosidad = 1.8 cSt, densidad = 1.77), Galden HT200 (p.e. = 200°C, viscosidad = 2.4 cSt, d = 1.79), Galden HT230 (p.e. = 230°C, viscosidad = 4.4 cSt, d = 1.82) (todos de Solvay Solexis); los de la línea Novec, tales como Novec 7500 (p.e. = 128°C, viscosidad = 0.8 cSt, d = 1.61), Fluorinert FC-40 (p.e. = 155°C, viscosidad = 1.8 cSt, d = 1.85), Fluorinert FC-43 (p.e. = 174 °C, viscosidad = 2.5 cSt, d = 1.86) (ambos de 3M). En general, la selección de fluidos de carga perfluorados se basa en la viscosidad cinemática (se prefiere <7 cSt, pero no se requiere), y en el punto de ebullición (se prefiere, pero no se requiere, >150°C para su uso en aplicaciones basadas en ADN/ARN (PCR, etc.)). Los fluidos de carga se pueden, por ejemplo, dopar con tensioactivos u otros aditivos. Por ejemplo, se pueden seleccionar aditivos para mejorar las operaciones de gotas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias objetivo de las gotas, formación de microgotas, contaminación cruzada entre gotas, contaminación de superficies del accionador de gotas, degradación de los materiales del accionador de gotas, etc. La composición del fluido de carga, incluido el dopaje con tensioactivo, se puede seleccionar por el funcionamiento con los reactivos utilizados en los protocolos de ensayo específicos y la interacción efectiva o que no haya interacción con los materiales del accionador de gotas. Se proporcionan ejemplos de fluidos de carga y formulaciones de fluidos de carga adecuados para usar con los métodos y aparatos expuestos en el presente documento en Srinivasan et al, publicación de patente internacional N° WO/2010/027894, titulada "Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods", publicada el 3 de junio de 2010; Srinivasan y col., publicación de patente internacional N° WO/2009/021173, titulada "Use of Additives for Enhancing Droplet Operations", publicada el 12 de febrero de 2009; Sista et al. publicación de patente internacional N° WO/2008/098236, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads", publicada el 15 de enero de 2009; y Monroe et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20080283414, titulada "Electrowetting Devices", publicada el 20 de noviembre de 2008. Los aceites fluorados en algunos casos se pueden dopar con tensioactivos fluorados, p.ej., Zonyl FSO-100 (Sigma-Aldrich) y/u otros. Un fluido de carga es típicamente un líquido. En algunas realizaciones, se puede usar un gas de carga en lugar de un líquido.

El término "hibridación", como se usa en el presente documento, se refiere en general a la capacidad de las moléculas de ácido nucleico para unirse por emparejamiento de cadenas de bases complementarias. Dicha hibridación puede ocurrir cuando las moléculas de ácido nucleico se ponen en contacto en condiciones y/o circunstancias apropiadas. Como se usa en el presente documento, se dice que dos moléculas de ácido nucleico son capaces de hibridarse específicamente entre sí si las dos moléculas son capaces de formar una estructura de ácido nucleico de doble cadena antiparalela. Se dice que una molécula de ácido nucleico es el "complemento" de otra molécula de ácido nucleico si presentan complementariedad completa. Como se usa en el presente documento, se dice que las moléculas de ácido nucleico presentan "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las moléculas es complementario de su nucleótido pareja en el apareamiento de bases de la otra. Se dice que dos moléculas son "mínimamente complementarias" si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en condiciones al menos convencionales de "baja rigurosidad". En algunos casos, se dice que las moléculas son "complementarias" si pueden hibridarse entre sí con suficiente estabilidad para permitir que permanezcan reasociadas entre sí en condiciones convencionales de "alta rigurosidad". Moléculas de ácido nucleico que se hibridan con otras moléculas de ácido nucleico, p.ej., al menos en condiciones de baja rigurosidad se dice que son "cognados hibridables" de las otras moléculas de ácido nucleico. Las condiciones de rigurosidad convencionales las describen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), y Haymes et al. En: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad, y para la

divulgación descrita en la presente memoria. Por lo tanto, se permiten desviaciones de la complementariedad completa en algunas realizaciones, siempre que dichas desviaciones no impidan completamente la capacidad de las moléculas para formar una estructura bicatenaria. Por lo tanto, con el fin de que una molécula de ácido nucleico o un fragmento de la misma de la presente descripción sirva como cebador o sonda en algunas realizaciones, solo necesita tener una

5 secuencia suficientemente complementaria para poder formar una estructura bicatenaria estable en el disolvente particular y las concentraciones de sal empleadas. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son totalmente complementarios de sus objetivos.

El término "inmovilizar", como se usa en el presente documento con respecto a perlas magnéticamente sensibles, significa que las perlas están sustancialmente restringidas en la posición en una gota o en fluido de carga en un accionador de gotas. Por ejemplo, las perlas inmovilizadas están lo suficientemente restringidas en la posición en una gota para permitir la ejecución de una operación de escisión de gotas, que produce una gota con prácticamente todas las perlas y una gota que carece sustancialmente de las perlas. En referencia a la molécula de ácido nucleico, p.ej. un cebador u oligonucleótido, el término "inmovilizar" y sus derivados, como se usan en el presente documento, se refiere a la unión de una molécula de ácido nucleico directamente a un soporte sólido a través de al menos un componente intermedio tal como, por ejemplo, biotina. Como se usa en el presente documento, los términos "unir" y "fijar" y sus respectivos derivados incluyen adsorción, tal como fisisorción o quimisorción, interacción ligando/receptor, enlace covalente, enlace de hidrógeno o enlace iónico de una sustancia polimérica o una molécula de ácido nucleico a un soporte sólido. Los cebadores inmovilizados se describen en los documentos US2005/191686 A1, WO2009/115335 A1.

Como se usa en el presente documento, la expresión "magnéticamente sensibles" significa que responden a un campo magnético. Las "perlas magnéticamente sensibles" incluyen o están compuestas de materiales magnéticamente sensibles. Los ejemplos de materiales magnéticamente sensibles incluyen materiales paramagnéticos, materiales ferromagnéticos, materiales ferrimagnéticos y materiales metamagnéticos. Ejemplos de materiales paramagnéticos adecuados incluyen hierro, níquel y cobalto, así como óxidos metálicos, tales como Fe_3O_4 , $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, CoO , NiO , Mn_2O_3 , Cr_2O_3 y CoMnP .

Las expresiones "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren tanto a moléculas de ARN como de ADN, incluidas moléculas de ácido nucleico que comprenden ADNc, ADN genómico, ADN sintético y moléculas de ADN o ARN que contienen análogos de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener cualquier estructura tridimensional. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria (p. ej., una cadena codificante o una cadena antiparalela). Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNip, microARN, ARNtracr, ARNcr, ARN guía, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, sondas de ácido nucleico y cebadores de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico puede contener nucleótidos no convencionales o modificados. Las expresiones "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de ácido nucleico" tal como se usan en el presente documento se refieren indistintamente a la secuencia de una molécula de polinucleótido. Se usa la nomenclatura para bases de nucleótidos como se establece en 37 CFR §1.822 en este documento.

"Depósito" significa un recinto o recinto parcial configurado para contener, almacenar o suministrar líquido. En algunas realizaciones, un sistema accionador de gotas de la presente descripción puede incluir depósitos en el cartucho y/o depósitos fuera del cartucho. Los depósitos en el cartucho pueden ser (1) depósitos en el accionador, que son depósitos en el espacio de operaciones de gotas o en la superficie de operaciones de gotas; (2) depósitos fuera del accionador, que son depósitos en el cartucho del accionador de gotas, pero fuera del espacio de operaciones de gotas, y no en contacto con la superficie de operaciones de gotas; o (3) depósitos híbridos que tienen regiones en el accionador y regiones fuera del accionador. Un ejemplo de un depósito fuera del accionador es un depósito en el sustrato superior. Un depósito fuera del accionador está típicamente en comunicación fluida con una abertura o trayectoria de flujo dispuesta para hacer fluir líquido desde el depósito fuera del accionador hacia el espacio de operaciones de gotas, tal como en un depósito en el accionador. Un depósito fuera del cartucho puede ser un depósito que no es parte en absoluto del cartucho del accionador de gotas, pero que hace fluir líquido a alguna parte del cartucho del accionador de gotas. Por ejemplo, un depósito fuera del cartucho puede ser parte de un sistema o estación de acoplamiento al que se acopla el cartucho del accionador de gotas durante el funcionamiento. De manera similar, un depósito fuera del cartucho puede ser un recipiente de almacenamiento de reactivos o una jeringa que se usa para forzar el fluido dentro de un depósito en el cartucho o en un espacio de operaciones de gotas. En algunas realizaciones, un sistema que usa un depósito fuera del cartucho incluirá típicamente un medio de paso de fluido mediante el cual el líquido puede transferirse desde el depósito fuera del cartucho a un depósito en el cartucho o a un espacio de operaciones de gotas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de ácido nucleico" se refiere a una colección de moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico es de una sola fuente biológica, p. ej. una muestra de individuo o una de tejido, y en otras realizaciones, la muestra de ácido nucleico es una muestra combinada, p. ej., que contiene ácidos nucleicos de más de un organismo, individuo o tejido.

La expresión muestra de ácido nucleico abarca "biblioteca de ácidos nucleicos" que, como se usa en el presente documento, incluye una biblioteca de ácidos nucleicos que se ha preparado por cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, proporcionar la biblioteca de ácidos nucleicos incluye las etapas necesarias para

preparar la biblioteca, por ejemplo, incluyendo el proceso de incorporar una o más muestras de ácido nucleico en una colección basada en vectores, tal como mediante ligadura en un vector y transformación de un hospedante. En algunas realizaciones, proporcionar una biblioteca de ácidos nucleicos incluye el proceso de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como mediante ligadura a adaptadores. En algunas realizaciones, los adaptadores se pueden reasociar con cebadores de PCR para facilitar la amplificación por PCR o pueden ser regiones de cebadores universales tales como, por ejemplo, adaptadores de cola de secuenciación. En algunas realizaciones, los adaptadores pueden ser adaptadores de secuenciación universal.

El término "sustancialmente" como se usa en el presente documento tiene su significado ordinario tal como se lee a la luz de la memoria descriptiva, y puede significar, por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96 %, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%.

"Transportar al campo magnético de un imán" y "transportar hacia un imán", como se usan en el presente documento para referirse a gotas y/o perlas magnéticamente sensibles dentro de las gotas, pretenden referirse al transporte a una región de un campo magnético capaz de atraer sustancialmente perlas magnéticamente sensibles en la gota. De manera similar, "transportar lejos de un imán o campo magnético" y "transportar fuera del campo magnético de un imán", como se usa en el presente documento para referirse a gotas y/o perlas magnéticamente sensibles dentro de las gotas, pretenden referirse a transportar lejos desde una región de un campo magnético capaz de atraer sustancialmente perlas magnéticamente sensibles en la gota, sea retirada completamente o no la gota o las perlas magnéticamente sensibles del campo magnético. Se apreciará que, en cualquiera de dichos casos descritos en el presente documento, la gota se puede transportar hacia o alejarse de la región deseada del campo magnético, y/o la región deseada del campo magnético se puede mover hacia o alejarse de la gota. La referencia a un electrodo, una gota o perlas magnéticamente sensibles que se encuentran "dentro" o "en" un campo magnético, tiene la intención de describir una situación en la que el electrodo está situado de una manera que permite que el electrodo transporte una gota dentro y/o o lejos de una región deseada de un campo magnético, o la gota o las perlas magnéticamente sensibles esté/estén situadas en una región deseada del campo magnético, en cada caso donde el campo magnético en la región deseada es capaz de atraer sustancialmente cualquier perla magnéticamente sensible en la gota. De manera similar, la referencia a un electrodo, una gota o perlas magnéticamente sensibles que están "fuera de" o "lejos de" un campo magnético, tiene la intención de describir una situación en la que el electrodo está situado de una manera que permite que el electrodo transporte una gota lejos de una determinada región de un campo magnético, o la gota o las perlas magnéticamente sensibles este/estén situadas lejos de una determinada región del campo magnético, en cada caso donde el campo magnético en dicha región no es capaz de atraer sustancialmente ninguna perla magnéticamente sensible en la gota o en las cuales cualquier atracción restante no elimina la efectividad de las operaciones de gotas realizadas en la región. En varios aspectos de la presente descripción, un sistema, un accionador de gotas u otro componente de un sistema puede incluir un imán, tal como uno o más imanes permanentes (p.ej., un solo imán cilíndrico o de barra o un conjunto de imanes de este tipo, tal como un conjunto de Halbach) o un electroimán o conjunto de electroimanes, para formar un campo magnético para interactuar con perlas magnéticamente sensibles u otros componentes en el chip. Dichas interacciones pueden, por ejemplo, incluir inmovilizar o restringir sustancialmente el movimiento o flujo de perlas magnéticamente sensibles durante el almacenamiento o en una gota durante una operación de gotas o sacar perlas magnéticamente sensibles de una gota.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia universal" se refiere a una región de secuencia que es común a dos o más moléculas de ácido nucleico donde las moléculas también tienen regiones de secuencia que difieren entre sí. Una secuencia universal que está presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la captura de múltiples ácidos nucleicos diferentes utilizando una población de ácidos nucleicos de captura universales que son complementarios de la secuencia universal. De manera similar, una secuencia universal presente en diferentes miembros de una colección de moléculas puede permitir la replicación o amplificación de múltiples ácidos nucleicos diferentes usando una población de cebadores universales que son complementarios de la secuencia universal. Por lo tanto, un ácido nucleico de captura universal o un cebador universal, tal como un adaptador de cola de secuencia universal incluye una secuencia que puede hibridarse específicamente con una secuencia universal. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico objetivo pueden modificarse para unir adaptadores universales, por ejemplo, en uno o ambos extremos de las diferentes secuencias objetivo, por ejemplo, mediante ligadura o mediante amplificación usando amplificación dirigida por cebador.

"Lavado" con respecto al lavado de una perla significa reducir la cantidad y/o concentración de una o más sustancias en contacto con la perla o expuestas a la perla de una gota en contacto con la perla. La reducción en la cantidad y/o concentración de la sustancia puede ser parcial, sustancialmente completa o incluso completa. La sustancia puede ser cualquiera de una amplia variedad de sustancias; los ejemplos incluyen sustancias objetivo para su posterior análisis, y sustancias no deseadas, tales como componentes de una muestra, contaminantes y/o reactivo en exceso. En algunos ejemplos, una operación de lavado comienza con una gota inicial en contacto con una perla magnéticamente sensible, donde la gota incluye una cantidad inicial y una concentración inicial de una sustancia. La operación de lavado puede continuar usando una variedad de operaciones de gotas. La operación de lavado puede producir una gota que incluye la perla magnéticamente sensible, donde la gota tiene una cantidad y/o concentración total de la sustancia que es menor que la cantidad y/o concentración inicial de la sustancia. Se describen ejemplos de técnicas de lavado adecuadas en Pamula et al., Patente de EE.UU. Nº 7,439,014, titulada "Droplet-Based Surface Modification and Washing", concedida el 21 de octubre de 2008.

Los términos "superior", "inferior", "encima", "debajo" y "en" se usan en toda la descripción con referencia a las posiciones relativas de los componentes del accionador de gotas, tales como las posiciones relativas de los sustratos superior e inferior del accionador de gotas. Se apreciará que el accionador de gotas es funcional independientemente de su orientación en el espacio.

5 Cuando un líquido en cualquier forma (p.ej., una gota o un cuerpo continuo, ya sea móvil o estacionario) se describe como "sobre", "en" o "encima" de un electrodo, conjunto, matriz o superficie, dicho líquido podría estar en contacto directo con el electrodo/conjunto/matriz/superficie, o podría estar en contacto con una o más capas o películas que se interponen entre el líquido y el electrodo/conjunto/matriz/superficie. En un ejemplo, el fluido de carga se puede considerar como una película entre dicho líquido y el electrodo/conjunto/matriz/superficie.

10 Cuando se describe que una gota está "en" o "cargada en" un accionador de gotas, debe entenderse que la gota está dispuesta en el accionador de gotas de una manera que facilita el uso del accionador de gotas para llevar a cabo una o más operaciones de gotas en el gota, la gota está dispuesta en el accionador de gotas de una manera que facilita la detección de una propiedad o una señal de la gota, y/o la gota se ha sometido a una operación de gotas en el accionador de gotas.

15 Las expresiones "cartucho de fluidos", "cartucho fluídico digital", "accionador de gotas" y "cartucho del accionador de gotas", tal como se utilizan en toda la descripción, pueden ser sinónimos.

Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, tal como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo mencionado puede reconocerse fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos iguales, etc. Como ejemplo no limitante, cada intervalo descrito en el presente documento se puede dividir fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también comprenderá un experto en la materia, todo lenguaje tal como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y similares incluye el número citado y se refiere a intervalos que pueden ser posteriormente desglosados en subintervalos como se descrito anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 artículos. De manera similar, un grupo que tiene 1-5 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 artículos, y así sucesivamente.

En los métodos o procedimientos descritos en el presente documento, las etapas se pueden llevar a cabo en cualquier orden, excepto cuando se menciona explícitamente una secuencia temporal u operativa. Además, las etapas especificadas pueden llevarse a cabo simultáneamente, a menos que el lenguaje explícito de reivindicación indique que se llevarán a cabo por separado. Por ejemplo, una etapa reivindicada de hacer X y una etapa reivindicada de hacer Y se pueden realizar simultáneamente dentro de una sola operación, y el procedimiento resultante estará dentro del alcance literal del procedimiento reivindicado.

Como se usa en el presente documento, "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "que se caracteriza por", y es inclusivo o de extremos abiertos y no excluye elementos adicionales no citados o etapas del método. Como se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la composición o método reivindicado. Como se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la composición o método reivindicado. Se entiende que cualquier mención en el presente documento del término "que comprende", particularmente en una descripción de componentes de una composición o en una descripción de etapas de un método, comprende aquellas composiciones y métodos que consisten esencialmente y consisten en los componentes o etapas mencionados.

Los encabezados, p.ej., (a), (b), (i) etc. se presentan simplemente para facilitar la lectura de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, y no limitan de ninguna manera el alcance de la descripción o sus alternativas. El uso de encabezados en la memoria descriptiva o en las reivindicaciones no requiere que las etapas o elementos se realicen en orden alfabético o numérico o el orden en que se presentan.

I. Métodos para normalizar muestras de ácidos nucleicos

La descripción se refiere a sistemas y métodos para la construcción de muestras de ácidos nucleicos, incluida la construcción de muestras de ácidos nucleicos amplificados/normalizados y bibliotecas de ácidos nucleicos para aplicaciones analíticas posteriores. En un aspecto, algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento emplean al menos un conjunto de primeros cebadores de amplificación o normalización inmovilizados en un soporte de fase sólida y al menos otro conjunto de segundos cebadores de amplificación o normalización en fase de disolución durante la normalización de las muestras de ácidos nucleicos o bibliotecas de ácidos nucleicos. Como se discutió anteriormente, esta característica bifásica de los métodos descritos difiere de los procedimientos actuales de preparación de bibliotecas en los que ambos cebadores están en una fase de disolución o ambos cebadores están fijados en una fase sólida. Los primeros cebadores de amplificación o normalización en fase de disolución ofrecen una cinética rápida, mientras que los segundos cebadores de amplificación o normalización inmovilizados en un soporte

en fase sólida ofrecen la capacidad de normalizar las muestras de ácidos nucleicos y facilitar la purificación. Además, en algunas implementaciones particulares de los métodos descritos en el presente documento, el conjunto de primeros cebadores inmovilizados en el soporte sólido se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y el conjunto de segundos cebadores en disolución se proporciona en una cantidad que supera la cantidad de los primeros cebadores. En algunas realizaciones, la configuración del cebador puede proporcionar una o más de las siguientes ventajas: (1) lavado conveniente de cualquier producto de amplificación que se encuentre en disolución después de la amplificación, dando como resultado una cantidad amplificada/normalizada de productos de amplificación que permanecen inmovilizados en el soporte sólido que posteriormente se puede aislar, de modo que se pueda generar una cantidad predefinida de productos de amplificación; (2) construcción de una pluralidad de muestras de ácido nucleico o bibliotecas de ácidos nucleicos en las que las cantidades de ADN se normalizan a concentraciones sustancialmente uniformes a lo largo de las bibliotecas de ácidos nucleicos independientemente de las cantidades de ADN de entrada en las muestras originales. El documento WO2007/147063 A2 proporciona métodos para la normalización de una reacción de amplificación.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para la amplificación de ácidos nucleicos que incluye proporcionar una muestra de ácido nucleico que incluye moléculas de ácido nucleico objetivo; poner en contacto la muestra de ácido nucleico con una mezcla de reacción que comprende una fase sólida y una fase líquida, la fase sólida incluye una pluralidad de primeros cebadores de amplificación inmovilizados en un soporte sólido, siendo los primeros cebadores de amplificación capaces de hibridarse específicamente con una primera secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo, y la fase líquida incluye una pluralidad de segundos cebadores de amplificación en disolución, siendo la pluralidad de segundos cebadores capaces de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo; y amplificar las moléculas de ácido nucleico objetivo en condiciones isotérmicas de modo que sustancialmente todos los primeros cebadores de amplificación se incorporen en productos de amplificación, en donde la pluralidad de primeros cebadores se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y la pluralidad de segundos cebadores de amplificación se proporciona en una cantidad que supera la cantidad de los primeros cebadores de amplificación.

La figura 2 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método para amplificar y/o normalizar una muestra de ácido nucleico de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, en el que la cantidad de moléculas de ácido nucleico objetivo en una muestra de ácido nucleico se amplifica/normaliza en una mezcla de reacción que incluye una fase sólida y una fase líquida. Dependiendo de los flujos de trabajo específicos y las aplicaciones posteriores, los cebadores extensibles utilizados en este y otros métodos de ejemplo de la presente descripción pueden ser cebadores de amplificación o cebadores de normalización. El método **200** puede incluir las siguientes etapas.

En una etapa **210**, se proporciona una muestra de ácido nucleico de entrada tal como, por ejemplo, una muestra de ADN genómico, que comprende moléculas de ácido nucleico objetivo. Esta etapa se puede lograr, por ejemplo, cargando la muestra de ácido nucleico en un depósito de muestra de un accionador de gotas. En una etapa **230**, las moléculas de ácido nucleico objetivo se ponen en contacto con una mezcla de reacción que comprende una fase sólida y una fase líquida. La fase sólida de la mezcla de reacción incluye una pluralidad de primeros cebadores de amplificación o normalización (p. ej., cebadores que incluyen una secuencia de cebadores P7) capaces de hibridarse específicamente con una primera secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo donde los primeros cebadores de amplificación o normalización se inmovilizan en un soporte sólido tal como, por ejemplo, perlas de captura. La fase líquida de la mezcla de reacción incluye una pluralidad de segundos cebadores de amplificación o normalización en disolución, siendo la pluralidad de segundos cebadores capaces de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo (p.ej., cebadores que incluyen una secuencia de cebadores P5). En una etapa **235**, el primer cebador de amplificación o normalización hibridado con secuencias de ácido nucleico objetivo se extiende para formar una cadena de ADN complementaria inmovilizada y, en una etapa **245**, las moléculas de ácido nucleico objetivo extendidas se amplifican en condiciones isotérmicas de manera que sustancialmente todos los primeros cebadores de amplificación o normalización se incorporan en productos de amplificación. En algunas realizaciones de los métodos descritos, la pluralidad de primeros cebadores inmovilizados se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y la pluralidad de segundos cebadores de amplificación o normalización se proporciona en una cantidad que excede la cantidad de los primeros cebadores de amplificación o normalización. En una etapa opcional **250**, las muestras de ácido nucleico amplificadas/normalizadas se eluyen de las perlas de captura para aplicaciones analíticas posteriores como, por ejemplo, secuenciación de alto rendimiento.

La figura 3 muestra gráficamente las etapas del método **200** de la figura 2. A saber, una muestra de ácido nucleico de entrada (no mostrada) incluye una molécula de ácido nucleico objetivo **310**. El primer cebador de amplificación o normalización (p. ej., cebador inverso) incluye una región específica del objetivo **340**. El segundo cebador de amplificación o normalización (p. ej., cebador directo) incluye una región específica del objetivo **330**. En algunas realizaciones, las regiones específicas del objetivo **330** y **340** flanquean una región de interés en la molécula de ácido nucleico objetivo **310**. En algunas realizaciones, las regiones específicas del objetivo pueden tener complementariedad de secuencia con adaptadores o secuencias de cebadores universales en los ácidos nucleicos objetivo, que se pueden añadir a los ácidos nucleicos objetivo de una manera específica de secuencia. En algunas realizaciones, como se describe con más detalle a continuación, se pueden añadir adaptadores o secuencias de cebadores universales en los ácidos nucleicos objetivo a los ácidos nucleicos objetivo de una manera independiente de la secuencia. Después

se sintetiza un amplicón **350** usando el cebador directo y el cebador inverso. En la reacción, el primer cebador de amplificación o normalización (p. ej., cebador inverso) se inmoviliza sobre el soporte sólido. Por ejemplo, el cebador inverso de amplificación o normalización se conjuga con un marcador de biotina **380** y se inmoviliza en una perla de captura recubierta con estreptavidina (SA) **385**.

5 En algunas realizaciones de los métodos de acuerdo con este y otros aspectos de la descripción, la pluralidad de los primeros cebadores de amplificación o normalización (p.ej., cebadores inversos) se hibrida con las moléculas de ácido nucleico objetivo antes de ser inmovilizados sobre el soporte sólido. Un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de acuerdo con estas realizaciones de la descripción se muestra en las figuras 4 y 5. En una etapa **425**, los primeros cebadores de amplificación o normalización **340** se hibridan con una molécula de ácido nucleico objetivo **310** de la muestra de ácidos nucleicos para formar dúplex de molécula objetivo\cebador de normalización. Esta etapa de hibridación se lleva a cabo en fase de disolución. En una etapa **430**, las perlas de captura tales como, por ejemplo, perlas de captura recubiertas con estreptavidina, se añaden a la reacción de hibridación para la captura de dúplex de molécula objetivo\cebador hibridados. Los dúplex de molécula/cebadores de normalización hibridados y los cebadores no hibridados se inmovilizan en las perlas de captura mediante la formación de un complejo de unión biotina-estreptavidina. Las etapas restantes **435**, **445** y **450** se llevan a cabo de manera similar a las etapas correspondientes **235**, **245** y **250** de los métodos de ejemplo descritos en las figuras **2** y **3**.

De acuerdo con algunos de los métodos descritos en el presente documento, una muestra o una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo puede tener una longitud promedio de cadena que se desea o es apropiada para una aplicación particular de los métodos o composiciones expuestos en el presente documento. Por ejemplo, la longitud promedio de la cadena puede ser inferior a aproximadamente 100 000 nucleótidos, 50 000 nucleótidos, 10 000 nucleótidos, 5 000 nucleótidos, 1 000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos. Alternativa o adicionalmente, la longitud promedio de la cadena puede ser mayor que aproximadamente 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1 000 nucleótidos, 5 000 nucleótidos, 10 000 nucleótidos, 50 000 nucleótidos o 100 000 nucleótidos. La longitud promedio de la cadena para poblaciones de ácidos nucleicos objetivo como se describe en el presente documento puede estar en un intervalo entre un valor máximo y mínimo establecido anteriormente.

Soporte sólido

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de amplificación y/o normalización de los métodos descritos en la presente memoria incluye uno o más soportes sólidos. Los soportes sólidos adecuados para los métodos descritos en el presente documento pueden ser en general de cualquier tamaño conveniente y estar fabricados con cualquier de una serie de materiales conocidos. Preferiblemente, el soporte sólido usado en los métodos descritos en la presente memoria puede ser de cualquier tipo adecuado que proporcione una capacidad de unión conocida, dando como resultado una cantidad sustancialmente sin fluctuaciones de ácidos nucleicos unidos por cantidad fija de soporte sólido. Ejemplos de dichos materiales incluyen: productos inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los ejemplos específicos de estos materiales incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, gelatina, poliestireno, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similares, poliacrilamidas, geles de látex, silicio, plásticos, nitrocelulosa, poliestireno, dextrano, caucho, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poro controlado, metales, dextranos reticulados (p. ej., Sephadex™) gel de agarosa (Sepharose™) y otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, los soportes de fase sólida pueden incluir soportes de polímeros sintéticos, tales como poliestireno, polipropileno, poliestireno sustituido (p. ej., poliestireno carboxilado o aminado), poliamidas, poliacrilamidas, poli(cloruro de vinilo) y similares, o cualquier material útil en la cromatografía de afinidad de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, el soporte sólido puede incluir perlas. El término "perla", como se usa en el presente documento con respecto a las perlas en un accionador de gotas, significa cualquier perla o partícula que sea capaz de interactuar con una gota en o cerca de un accionador de gotas. Las perlas pueden tener cualquiera de una amplia variedad de formas, tales como formas esféricas, generalmente esféricas, en forma de huevo, en forma de disco, cúbicas, amorfas y otras formas tridimensionales. La perla puede, por ejemplo, ser capaz de someterse a una operación de gotas en una gota en un accionador de gotas o configurarse de otra manera con respecto a un accionador de gotas de una manera que permita que una gota en el accionador de gotas se ponga en contacto con la perla en el accionador de gotas y/o fuera del accionador de gotas. Las perlas se pueden proporcionar en una gota, en un espacio de operaciones de gotas o en una superficie de operaciones de gotas. Las perlas se pueden proporcionar en un depósito que es externo a un espacio de operaciones de gotas o situado aparte de una superficie de operaciones de gotas, y el depósito puede estar asociado con una trayectoria de flujo que permite que una gota que incluye las perlas se lleve a un espacio de operaciones de gotas o en contacto con una superficie de operaciones de gotas. Las perlas se pueden fabricar utilizando una amplia variedad de materiales, que incluyen, por ejemplo, resinas y polímeros. Las perlas pueden ser de cualquier tamaño adecuado, incluyendo, por ejemplo, micropérlas, micropartículas, nanopérlas y nanopartículas. En algunos casos, las perlas son magnéticamente sensibles; en otros casos, las perlas no son significativamente sensibles magnéticamente. Para perlas magnéticamente sensibles, el material magnéticamente sensible puede constituir sustancialmente toda una perla, una parte de una perla o solo un componente de una perla. El resto de la perla puede incluir, entre otras cosas, material polimérico, recubrimientos y restos que permiten la unión de un reactivo de ensayo. Ejemplos de perlas adecuadas

incluyen microperlas de citometría de flujo, micropartículas y nanopartículas de poliestireno, micropartículas y nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, micropartículas y nanopartículas de poliestireno recubiertas, microperlas de sílice, microesferas y nanoesferas fluorescentes, microesferas y nanoesferas fluorescentes funcionalizadas, microesferas y nanoesferas fluorescentes recubiertas, micropartículas y nanopartículas teñidas con color, micropartículas y nanopartículas magnéticas, micropartículas y nanopartículas superparamagnéticas (p. ej., partículas DYNABEADS®, disponibles en Invitrogen Group, Carlsbad, CA), micropartículas y nanopartículas fluorescentes, micropartículas y nanopartículas magnéticas recubiertas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas recubiertas, y las descritas en Watkins et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20050260686, titulada "Multiplex Flow Assays Preferably with Magnetic Particles as Solid Phase", publicada el 24 de noviembre de 2005; Chandler., publicación de patente de EE.UU. N° 20030132538, titulada "Encapsulation of Discrete Quanta of Fluorescent Particles", publicada el 17 de julio de 2003; Chandler et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20050118574, titulada "Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method", publicada el 2 de junio de 2005; Chandler et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20050277197, titulada "Microparticles with Multiple Fluorescent Signal and Methods of Using Same", publicada el 15 de diciembre de 2005; y Chandler et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20060159962, titulada "Magnetic Microspheres for use in Fluorescence based Applications", publicada el 20 de julio de 2006. Las perlas se pueden acoplar previamente con una biomolécula u otra sustancia que pueda unirse y formar un complejo con una biomolécula. Las perlas se pueden acoplar previamente con un anticuerpo, proteína o antígeno, sonda de ADN/ARN o cualquier otra molécula con afinidad por un objetivo deseado. Los ejemplos de técnicas de accionadores de gotas para inmovilizar perlas magnéticamente sensibles y/o perlas que no sensibles magnéticamente y/o realizar protocolos de operaciones de gotas usando perlas se describen en Pollack et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20080053205, titulada "Droplet-Based Particle Sorting", publicada el 6 de marzo de 2008; solicitud de patente de EE.UU. N° 61/039,183, titulada "Multiplexing Bead Detection in a Single Droplet", presentada el 25 de marzo de 2008; Pamula et al., solicitud de patente de EE.UU. N° 61/047,789, titulada "Droplet Actuator Devices and Droplet Operations Using Beads", presentada el 25 de abril de 2008; solicitud de patente de EE.UU. N° 61/086,183, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods for Manipulating Beads", presentada el 5 de agosto de 2008; Eckhardt et al., publicación de patente internacional N° WO/2008/098236, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads", publicada el 14 de agosto de 2008; Grichko et al., publicación de patente internacional N° WO/2008/134153, titulada "Bead-based Multiplexed Analytical Methods and Instrumentation", publicada el 6 de noviembre de 2008; Eckhardt et al., Publicación de patente internacional N° WO/2008/116221, "Bead Sorting on a Droplet Actuator", publicada el 25 de septiembre de 2008; y Eckhardt et al., publicación de patente internacional N° WO/2007/120241, titulada "Droplet-based Biochemistry", publicada el 25 de octubre de 2007, cuyas descripciones completas se incorporan en el presente documento por referencia. Las características de las perlas pueden emplearse en los aspectos de multiplexación de la presente descripción. Se pueden encontrar ejemplos de perlas que tienen características adecuadas para el multiplexado, así como métodos de detección y análisis de señales emitidas por dichas perlas, en Whitman et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20080305481, titulada "Systems and Methods for Multiplex Analysis of PCR in Real Time", publicada el 11 de diciembre de 2008; Roth, publicación de patente de EE.UU. N° 20080151240, "Methods and Systems for Dynamic Range Expansion", publicada el 26 de junio de 2008; Sorensen et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20070207513, titulada "Methods, Products, and Kits for Identifying an Analyte in a Sample", publicado el 6 de septiembre de 2007; Roth, publicación de patente de EE.UU. N° 20070064990, titulada "Methods and Systems for Image Data Processing", publicada el 22 de marzo de 2007; Chandler et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20060159962, titulada "Magnetic Microspheres for use in Fluorescence-based Applications", publicada el 20 de julio de 2006; Chandler et al., publicación de patente de EE.UU. N° 20050277197, titulada "Microparticles with Multiple Fluorescent Signals and Methods of Using Same", publicada el 15 de diciembre de 2005; y Chandler et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20050118574, titulada "Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method", publicada el 2 de junio de 2005.

Por consiguiente, las perlas adecuadas para los métodos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de cualquier serie de materiales conocidos. En algunas realizaciones, la perla puede ser, por ejemplo, perlas magnéticas, perlas paramagnéticas, perlas de plástico, perlas de poliestireno, perlas de vidrio, perlas de agarosa y combinaciones de las mismas. Las perlas tienen aproximadamente de 2 a 100 µm de diámetro, o de 10 a 80 µm de diámetro, o de 20 a 40 µm de diámetro. En algunas realizaciones, las perlas se pueden proporcionar en disolución. En algunas realizaciones, las perlas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, las perlas se pueden proporcionar tanto en disolución como en un estado inmovilizado sobre un soporte sólido.

En alguna realización preferida, el soporte sólido puede incluir estreptavidina. En algunas realizaciones, el soporte sólido es, o puede incluir, perlas recubiertas con estreptavidina. En algunas realizaciones, el soporte sólido es o puede incluir perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. En algunas realizaciones donde el soporte en fase sólida incluye estreptavidina, las moléculas de ácidos nucleicos se pueden biotinilar para facilitar la unión de los ácidos nucleicos al soporte sólido.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el soporte de fase sólida incluye una superficie de un sitio de reacción. Por ejemplo, un lado de vidrio se puede tratar para que tenga ácidos nucleicos unidos en ubicaciones específicas en el soporte sólido, p. ej., como una matriz de alta densidad. En algunas realizaciones, el sitio de reacción puede incluir una porción inferior de una superficie interna de un pocillo, ranura,

celda de flujo, cámara o canal de reacción. En algunas realizaciones, el sitio puede incluir una cámara o pocillo de reacción. En algunas realizaciones, el sitio de reacción puede ser parte de una matriz de sitios similares o idénticos. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser el fondo y/o los lados de un pocillo en una placa de microvaloración.

5 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las perlas o los sitios de reacción están en una fase acuosa tal como, por ejemplo, en un tampón de reacción acuoso. En algunas realizaciones, las perlas o sitios de reacción están en fase acuosa continua. En algunas realizaciones, la amplificación se realiza sin sellar las perlas o los sitios de reacción entre sí. Por ejemplo, las perlas o los sitios de reacción pueden permanecer en comunicación fluida entre sí durante la amplificación. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las perlas o los sitios de reacción están en comunicación fluida entre sí durante la amplificación. En otras realizaciones, el soporte sólido o las perlas pueden situarse en ubicaciones discretas que están separadas entre sí y no en comunicación fluida, p. ej., pocillos de una placa de microvaloración, o perlas ubicadas en pocillos de una placa de microvaloración.

15 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de amplificación o normalización de los métodos descritos en el presente documento incluye uno o más soportes sólidos con cebadores de amplificación o normalización fijados sobre los mismos. Los cebadores de amplificación o normalización se pueden unir al soporte sólido por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Al menos uno de los soportes puede incluir uno o más casos de un primer cebador que incluye una primera secuencia de cebador. En algunas realizaciones, al menos un molde de polinucleótidos en la mezcla de reacción (p. ej., un miembro de una muestra de ácido nucleico o biblioteca de ácidos nucleicos) incluye una primera secuencia de unión de cebador. La primera secuencia de unión de cebador puede ser total o sustancialmente idéntica, o total o sustancialmente complementaria, de la primera secuencia del cebador. En algunas realizaciones, al menos uno, algunos o todos los soportes sólidos incluyen una pluralidad de primeros cebadores que son idénticos entre sí. En algunas realizaciones, todos los cebadores en los soportes sólidos son idénticos entre sí, o todos incluyen una primera secuencia de cebador idéntica. En una realización preferida, el soporte sólido es una pluralidad de perlas, en el que cada perla en la pluralidad tiene una pluralidad de cebadores idénticos unidos.

25 En diversas realizaciones de la descripción, se proporciona un segundo cebador de amplificación o normalización en fase de disolución, que puede exponerse opcionalmente al primer cebador de amplificación o normalización inmovilizado. En algunas realizaciones, la cantidad de los segundos cebadores de amplificación o normalización en fase de disolución es mayor que la cantidad de los primeros cebadores de amplificación o normalización inmovilizados en un soporte de fase sólida. Al proporcionar una cantidad en exceso del segundo cebador en disolución, la cantidad de primer cebador inmovilizado en el soporte sólido determinará la cantidad de producto de amplificación producido en el soporte sólido. En consecuencia, la amplificación da como resultado una cantidad sustancialmente constante de productos de amplificación por cantidad fija de soporte de fase sólida. En algunas realizaciones, la pluralidad de segundos cebadores de amplificación o normalización se proporciona en una cantidad dentro de un orden de magnitud de la cantidad del primer cebador de amplificación o normalización. En algunos casos, la pluralidad de segundos cebadores de amplificación o normalización se proporciona en una cantidad que excede la cantidad de los primeros cebadores de amplificación o normalización en al menos, o al menos aproximadamente, 100%. En otros, la cantidad del segundo cebador excede la cantidad del primer cebador en al menos, o al menos aproximadamente, 150%, al menos, o al menos aproximadamente 200%, al menos, o al menos aproximadamente 300%, o al menos aproximadamente 400%, o al menos, o al menos aproximadamente 1000%, o un intervalo de cualquiera de los dos valores anteriores, por ejemplo, de aproximadamente 100% a aproximadamente 1000%.

Muestras y bibliotecas amplificadas/normalizadas producidas

45 La cantidad de productos de amplificación obtenidos de cada muestra de ácido nucleico se puede representar de manera sustancialmente uniforme en una biblioteca de ácido nucleico agrupada. Las cantidades de productos de amplificación obtenidos de las muestras de ácido nucleico de entrada pueden estar presentes en una biblioteca agrupada en diferentes concentraciones predeterminadas al obtener los productos de amplificación a partir de diferentes cantidades predeterminadas de soporte sólido o agrupando diferentes cantidades de los productos de amplificación.

50 Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento permiten generar bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen cantidades normalizadas y cuyas cantidades son sustancialmente uniformes a través de múltiples muestras y/o bibliotecas de ácidos nucleicos. En algunos ejemplos, las cantidades de ácidos nucleicos en las bibliotecas de ácidos nucleicos normalizadas varían en menos del 10%, 5%, 3%, 2% o 1%. En algunos ejemplos, los métodos descritos en el presente documento permiten generar bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas en las que la cantidad de ácidos nucleicos constituyentes en las bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas resultantes son cantidades sustancialmente similares independientemente de la cantidad de muestras de ADN de entrada. En algunos ejemplos, las cantidades de ácidos nucleicos constituyentes en las bibliotecas de ácidos nucleicos agrupadas varían en menos del 10%, 5%, 3%, 2% o 1%.

60 Las bibliotecas de ácidos nucleicos o las bibliotecas agrupadas generadas por los métodos descritos en el presente documento pueden ser adecuadas para aplicaciones analíticas posteriores, que incluyen las aplicaciones de secuenciación que utilizan técnicas como la secuenciación de próxima generación (NGS) y metodologías relacionadas

como el genotipado por secuenciación (GBS).

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden automatizarse y/o pueden realizarse en un formato multiplexado, por ejemplo, los métodos pueden realizarse mediante un accionador de gotas o un robot de manipulación de líquidos.

- 5 En los métodos y sistemas descritos, las perlas tal como se describen en el presente documento pueden ser monoclonales, es decir, pueden incluir una sola población de cebadores de amplificación o normalización que son idénticos entre sí.

10 Las perlas pueden ser policlonales, es decir, pueden incluir un conjunto de una pluralidad de perlas monoclonales, en donde las perlas monoclonales agrupadas incluyen cebadores de amplificación o normalización que comprenden más de una porción de captura que tiene similitud de secuencia con una región relacionada de un ácido nucleico objetivo. Las perlas pueden incluir perlas policlonales individuales, es decir, pueden incluir cebadores de amplificación o normalización que comprenden más de una porción de captura por perla.

15 Al menos un soporte sólido incluye dos o más cebadores diferentes fijados al mismo. El al menos un soporte puede incluir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cebadores de amplificación o normalización diferentes que tienen diferentes secuencias de ácido nucleico. En algunos casos, el soporte sólido tiene una pluralidad de ubicaciones discretas, cada ubicación tiene una pluralidad de cebadores que tienen la misma secuencia. En algunas realizaciones, las secuencias en cada una de la pluralidad de ubicaciones son las mismas, en otras realizaciones, las secuencias en una o más de la pluralidad de ubicaciones difieren de la de una o más ubicaciones diferentes.

20 Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos descritos en el presente documento incluyen además una etapa de separación de los productos de amplificación del soporte sólido. Generalmente, se puede usar cualquier método adecuado para separar ácidos nucleicos del soporte sólido. En algunos casos, los productos de amplificación se separan del soporte sólido por elución. En algunos casos, los productos de amplificación se eluyen en un tampón calentado. Cuando se incluye estreptavidina en el soporte de fase sólida y los ácidos nucleicos se biotinilan para facilitar la unión de los ácidos nucleicos al soporte sólido, los productos de amplificación de ácidos nucleicos pueden separarse del soporte sólido mediante escisión de avidina-biotina por calor.

Muestras de ácido nucleico de entrada

30 En algunas realizaciones de los métodos y sistemas descritos en el presente documento, la muestra de ácido nucleico de entrada incluye moléculas de ácido nucleico monocatenario. En algunas realizaciones, al menos una de las moléculas de ácido nucleico objetivo en la muestra de ácido nucleico de entrada es bicatenaria o se vuelve al menos parcialmente bicatenaria usando procedimientos apropiados antes de la amplificación. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico de entrada incluye una mezcla de moléculas de ácido nucleico monocatenario y moléculas de ácido nucleico bicatenario. Las moléculas de ácido nucleico objetivo pueden ser lineales. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico objetivo pueden ser circulares o incluir una combinación de regiones lineales y circulares.

35 Las moléculas de ácido nucleico objetivo bicatenarias pueden incluir una cadena directa. Las moléculas de ácido nucleico objetivo bicatenarias pueden incluir además una cadena inversa. La cadena directa puede incluir un primer sitio de unión de cebador. La cadena inversa puede incluir un segundo sitio de unión de cebador.

40 La cantidad de ácido nucleico de entrada puede ser de aproximadamente 0.01 ng a 100 ng. En algunos ejemplos, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 0.1 ng, 0.2 ng, 0.3 ng, 0.4 ng, 0.5 ng, 0.6 ng, 0.7 ng, 0.8 ng, 0.9 ng, 1 ng, 1.1 ng, 1.2 ng, 1.3 ng, 1.5 ng, 2.0 ng, 2.5 ng, 3.0 ng, 3.5 ng, 4.0 ng, 4.5 ng, 5.0 ng, o dentro de un intervalo definido por cualquiera de los dos valores antes mencionados. En algunos ejemplos, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 5.5 ng, 6.0 ng, 6.5 ng, 7.0 ng, 7.5 ng, 8.0 ng, 8.5 ng, 9.0 ng, 9.5 ng, 10.0 ng, 11.0 ng, 11.5 ng, 12.0 ng, 12.5 ng, 13.0 ng, 13.5 ng, 14.0 ng, 15.0 ng, 15.5 ng, 16.0 ng, 16.5 ng, 17.0 ng, 18.0 ng, 18.5 ng, 19.0 ng, 19.5 ng, 20.0 ng, o dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los valores mencionados anteriormente. En algunos ejemplos, la cantidad de ácido nucleico de entrada es aproximadamente 21.0 ng, 22.0 ng, 22.5 ng, 23.0 ng, 23.5 ng, 24.0 ng, 24.5 ng, 25.0 ng, 26.0 ng, 27.0 ng, 28.0 ng, 29.0 ng, 30.0 ng, 32.5 ng, 35.0 ng, 37.5 ng, 40.0 ng, 42.5 ng, 45.0 ng, 47.5 ng, 50.0 ng, 52.5 ng, 55.0 ng, 60.0 ng, 65.0 ng, 70.0 ng, 75.0 ng, 80.0 ng, 85.0 ng, 90.0 ng, o dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los valores mencionados anteriormente. En algunos ejemplos, la cantidad de ácido nucleico de entrada es de aproximadamente 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 o 50.0 ng.

50 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico objetivo ya incluyen un primer y/o segundo sitio de unión de cebador antes de la etapa o etapas de amplificación. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico objetivo no incluyen originalmente un sitio de unión de cebador, y los métodos descritos opcionalmente incluyen unir o introducir un sitio de unión de cebador en las moléculas de ácido nucleico objetivo antes de la amplificación. Por ejemplo, los métodos descritos pueden incluir opcionalmente ligar o introducir de otro modo (p. ej., por amplificación dirigida por cebador, que incluye PCR) un adaptador que contiene un sitio de unión de cebador en, o dentro de, las moléculas de ácido nucleico objetivo. El adaptador puede ligarse o introducirse de otro modo en un extremo de una molécula de ácido nucleico lineal objetivo, o dentro del cuerpo de una molécula de ácido nucleico lineal o circular. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico objetivo se puede hacer circular después de que el adaptador se haya ligado o introducido. En algunas realizaciones, un primer

adaptador puede ligarse o introducirse en un primer extremo de una molécula de ácido nucleico objetivo lineal, y un segundo adaptador puede ligarse o introducirse en un segundo extremo de la molécula de ácido nucleico objetivo.

5 En algunas realizaciones, los primeros cebadores de amplificación o normalización y los segundos cebadores de amplificación o normalización son complementarios de los sitios de unión con secuencias de nucleótidos conocidas dentro de las moléculas de ácido nucleico objetivo. En algunas realizaciones, los sitios de unión de cebador con secuencias de nucleótidos conocidas corresponden a los primeros extremos y segundos extremos de las moléculas de ácido nucleico objetivo.

10 En algunas realizaciones de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos descritos en el presente documento, los primeros extremos y segundos extremos de las moléculas de ácido nucleico objetivo incluyen regiones de cebadores universales tales como, por ejemplo, adaptadores de cola de secuenciación universal, que se han añadido a las moléculas de ácido nucleico objetivo.

15 En algunas realizaciones, al menos uno de los primeros y/o segundos cebadores de amplificación o normalización incluye además una porción de indexación. La porción de indexación se puede usar para identificar la fuente de los ácidos nucleicos objetivo, p. ej., la muestra individual o biológica, de modo que, si los productos de amplificación se agrupan, la fuente de los ácidos nucleicos objetivo puede determinarse más tarde. Alternativamente, la porción de indexación se puede añadir a los ácidos nucleicos objetivo antes de la etapa de normalización, por ejemplo, cuando se añaden adaptadores o secuencias de cebadores universales a los ácidos nucleicos objetivo.

20 En algunas realizaciones, al menos una porción de los primeros cebadores de amplificación o normalización incluye además una porción de captura que tiene complementariedad de secuencia con una región relacionada de las moléculas de ácido nucleico objetivo además de con secuencias conocidas de las moléculas de ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, si se añaden adaptadores y/o cebadores universales a las moléculas de ácido nucleico de la muestra de entrada, los adaptadores y/o cebadores universales pueden constituir las "secuencias conocidas", mientras que la "porción de captura" es complementaria a una secuencia natural de los ácidos nucleicos en la biblioteca. De esta manera, solo aquellas porciones de la biblioteca que tienen la secuencia de captura se amplificarán, incluso aunque los adaptadores y/o cebadores universales estén presentes en la mayoría o en todos los ácidos nucleicos de la biblioteca. En una realización preferida, el uso de una porción de captura permite la amplificación selectiva de ácidos nucleicos en la muestra de ácido nucleico, p. ej., la biblioteca de ácido nucleico. Las realizaciones que utilizan sondas de captura se ilustran en las figuras 6-9, descritas con más detalle a continuación.

30 En algunas realizaciones, la porción de captura se genera hibridando un oligonucleótido de captura con un primer cebador de amplificación o normalización inmovilizado sobre el soporte sólido y extendiendo el cebador de amplificación o normalización inmovilizado para generar un cebador de amplificación o normalización extendido que tiene complementariedad de secuencia con el oligonucleótido de captura.

35 Los autores de la invención han demostrado que el método descrito en el presente documento puede aplicarse ventajosamente a una única muestra de ácido nucleico o a una pluralidad de muestras de ácidos nucleicos utilizando una pluralidad de soportes de fase sólida. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la etapa de amplificación se lleva a cabo en una pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los productos de amplificación de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan para formar una biblioteca de ácidos nucleicos combinados agrupada. En algunas realizaciones, los productos de amplificación derivados de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan después de ser retirados del soporte de fase sólida. En algunas realizaciones, los productos de amplificación de la pluralidad de bibliotecas de ácidos nucleicos se combinan antes de retirarse del soporte de fase sólida. En algunas realizaciones, la pluralidad de muestras de ácidos nucleicos de entrada se combina antes de la etapa de amplificación. En algunas realizaciones, la cantidad de cada muestra de ácido nucleico de entrada no se normaliza en toda la pluralidad de muestras de ácidos nucleicos.

45 En algunos ejemplos, la pluralidad de muestras de ácidos nucleicos de entrada comprende al menos 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 200, 384, 400, 500, 100, 1500, o un número de muestras de ácidos nucleicos de entrada dentro de un intervalo definido por cualesquiera dos de los números antes mencionados.

50 La representación relativa de cada población de productos de amplificación constituyentes puede ajustarse ventajosamente en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. Por "ajustar ventajosamente", como se usa en el presente documento, se entiende que la cantidad de cada uno de los productos de amplificación constituyentes en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada se puede controlar o predeterminar. En algunos ejemplos preferidos, la cantidad de cada uno de los productos de amplificación constituyentes está representada sustancialmente de manera uniforme en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. Alternativamente, la pluralidad de productos de amplificación constituyentes puede estar presente en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada en diferentes concentraciones predeterminadas. Esto se puede lograr mediante el ensamblaje de diferentes cantidades de los soportes de fase sólida con productos de amplificación que permanecen fijados sobre ellos o agrupando diferentes cantidades de la pluralidad de productos de amplificación constituyentes después de ser recuperados del soporte de fase sólida. Dicho de otra manera, el ajuste ventajoso puede incluir ajustar selectivamente tanto la representación proporcional como el número de población de productos de amplificación constituyentes en la biblioteca de ácidos nucleicos agrupada. En otros

ejemplos adicionales, un ajuste ventajoso puede incluir someter una muestra de productos de amplificación constituyentes a al menos una etapa de procesamiento además de recuperar productos de amplificación del soporte de fase sólida.

Etapa de normalización

5 En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la amplificación de ácidos nucleicos se realiza bajo condiciones sustancialmente isotérmicas. La temperatura óptima para la amplificación varía y puede depender, por ejemplo, de las características del cebador, tales como la longitud de la secuencia, la temperatura de fusión como se describe en otra parte en el presente documento y la elección de la polimerasa. La temperatura de amplificación es inferior a 60 grados Celsius, inferior a 50 grados Celsius, inferior a 45 grados Celsius o inferior a 42, 38, 35, 30, 25 o 20 grados Celsius. Preferiblemente, la temperatura de amplificación es de 38 grados Celsius.

10 Los métodos de la descripción incluyen amplificación isotérmica que puede realizarse usando, por ejemplo, amplificación de exclusión cinética (KEA), también denominada amplificación de exclusión (Ex-Amp). En algunos ejemplos, los métodos de la descripción usan una reacción de normalización de ExAmp para igualar las cantidades de muestra y ajustar la concentración de ADN de amplicones para aplicaciones de secuenciación posteriores. En algunos ejemplos, la reacción de normalización de ExAmp de la biblioteca es una reacción de amplificación isotérmica que usa una primera secuencia de cebador de normalización (p. ej., secuencia de cebador P7) inmovilizada en las perlas de captura y una segunda secuencia de cebador de normalización (p. ej., secuencia de cebador P5) en disolución como cebadores de normalización para la normalización de la biblioteca. La normalización de la biblioteca se puede realizar en una amplia gama de entrada de productos de PCR (amplicón) (p. ej., en al menos dos órdenes de cambio de magnitud de entrada). Las condiciones de reacción (p. ej., tiempo de incubación, concentración de cebador P7 y/o P5, y componentes de reacción) pueden seleccionarse de tal manera que todos los cebadores disponibles en las perlas de captura se extiendan en amplicones, p. ej., la reacción se lleva a la saturación.

15 Por consiguiente, una biblioteca de ácidos nucleicos amplificados/normalizados de la presente descripción se puede construir usando un método que incluye una etapa de hacer reaccionar un reactivo de amplificación para producir una pluralidad de sitios de amplificación que incluyen una población de amplicones sustancialmente clonal de un ácido nucleico objetivo individual que ha sembrado el sitio. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación continúa hasta que se genera un número suficiente de amplicones para llenar la capacidad del sitio de amplificación respectivo. Llenar un sitio ya sembrado hasta su capacidad de esta manera, impide que los ácidos nucleicos objetivo terminen y se amplifiquen en el sitio, produciendo así una población clonal de amplicones en el sitio. En algunas realizaciones, se puede lograr la clonalidad aparente incluso si un sitio de amplificación no se llena hasta su capacidad antes de que un segundo ácido nucleico objetivo llegue al sitio. En algunas condiciones, la amplificación de un primer ácido nucleico objetivo puede avanzar hasta un punto en el que se hace un número suficiente de copias para superar o colmar efectivamente la producción de copias de un segundo ácido nucleico objetivo que se transporta al sitio. Por ejemplo, en una realización que usa un proceso de amplificación de puente en una característica circular (p. ej., perla) que es menor que 500 nm de diámetro, se ha determinado que después de 14 ciclos de amplificación exponencial para un primer ácido nucleico objetivo, la contaminación de un segundo ácido nucleico objetivo en el mismo sitio producirá un número insuficiente de amplicones contaminantes para tener un impacto adverso en el análisis de secuenciación por síntesis en una plataforma de secuenciación de Illumina.

20 La exclusión cinética puede ocurrir cuando un proceso ocurre a una velocidad suficientemente rápida para excluir efectivamente que ocurra otro evento o proceso. Tomemos, por ejemplo, una disolución de perlas que tienen cebadores universales donde las perlas se siembran aleatoriamente con ácidos nucleicos objetivo en una disolución y se generan copias del ácido nucleico objetivo en un proceso de amplificación para llenar cada una de las perlas hasta su capacidad. De acuerdo con los métodos de exclusión cinética de la presente descripción, los procesos de siembra y amplificación pueden proceder simultáneamente en condiciones en las que la velocidad de amplificación excede la velocidad de siembra. Como tal, la velocidad relativamente rápida a la que se hacen copias en una perla particular que se ha sembrado con un primer ácido nucleico objetivo excluirá efectivamente la siembra de un segundo ácido nucleico en esa perla particular para amplificación. Los métodos de amplificación de exclusión cinética se pueden llevar a cabo como se describe en detalle en la descripción de Publicación de la solicitud de EE.UU. N° 2013/0338042, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

25 La exclusión cinética puede explotar una velocidad relativamente lenta para iniciar la amplificación (p. ej., una velocidad lenta de hacer una primera copia de un ácido nucleico objetivo) frente a una velocidad relativamente rápida para hacer copias posteriores del ácido nucleico objetivo (o de la primera copia del ácido nucleico objetivo). En el ejemplo del párrafo anterior, la exclusión cinética ocurre debido a la velocidad relativamente lenta de siembra del ácido nucleico objetivo (p. ej., difusión o transporte relativamente lento) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se produce la amplificación para llenar el sitio (p. ej., la perla u otro sitio en un sustrato sólido (p. ej., sitio de reacción o pocillo)) con copias de la semilla de ácido nucleico. En otra realización de ejemplo, la exclusión cinética puede ocurrir debido a un retraso en la formación de una primera copia de un ácido nucleico objetivo que se ha sembrado en un sitio (p. ej., activación retardada o lenta) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se realizan copias posteriores para llenar el sitio. En este ejemplo, un sitio individual se puede haber sembrado con varios ácidos nucleicos objetivo diferentes (p. ej., varios ácidos nucleicos objetivo pueden estar presentes en cada sitio antes de la amplificación). Sin embargo, la formación de la primera copia para cualquier ácido nucleico objetivo dado puede

activarse aleatoriamente, de modo que la velocidad promedio de formación de la primera copia es relativamente lenta en comparación con la velocidad a la que se generan las copias posteriores. En este caso, aunque un sitio individual (p. ej., perla) se puede haber sembrado con varios ácidos nucleicos objetivo diferentes, la exclusión cinética permitirá que solo uno de esos ácidos nucleicos objetivo se amplifique. Más específicamente, una vez que se ha activado un primer ácido nucleico objetivo para la amplificación, el sitio se llenará rápidamente hasta su capacidad con sus copias, evitando así que se produzcan copias de un segundo ácido nucleico objetivo en el sitio.

Un reactivo de amplificación puede incluir componentes adicionales que facilitan la formación de amplicones y, en algunos casos, aumentar la velocidad de formación de amplicones. Un ejemplo es una recombinasa. La recombinasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir la invasión/extensión repetida. Más específicamente, la recombinasa puede facilitar la invasión de un ácido nucleico objetivo por la polimerasa y la extensión de un cebador por la polimerasa usando el ácido nucleico objetivo como molde para la formación de amplicones. Este proceso puede repetirse como una reacción en cadena donde los amplicones producidos de cada ronda de invasión/extensión sirven como moldes en una ronda posterior. El proceso puede ocurrir más rápidamente que la PCR estándar puesto que no se requiere un ciclo de desnaturalización (p. ej., desnaturalización por calentamiento o química). Como tal, la amplificación facilitada por recombinasa se puede llevar a cabo isotérmicamente. Generalmente es deseable incluir ATP u otros nucleótidos (o en algunos casos análogos no hidrolizables de los mismos) en un reactivo de amplificación facilitado por recombinasa para facilitar la amplificación. Una mezcla de recombinasa y proteína de unión a cadena monocatenaria (SSB) es particularmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Las formulaciones de ejemplo para la amplificación facilitada por recombinasa incluyen las vendidas comercialmente como kits TwistAmp por TwistDx (Cambridge, Reino Unido). Los componentes útiles del reactivo de amplificación facilitado por recombinasa y las condiciones de reacción se exponen en los documentos US 5,223,414 y US 7,399,590.

Otro ejemplo de un componente que puede incluirse en un reactivo de amplificación para facilitar la formación de amplicones y, en algunos casos, para aumentar la velocidad de formación de amplicones es una helicasa. La helicasa puede facilitar la formación de amplicones al permitir una reacción en cadena de formación de amplicones. El proceso puede ocurrir más rápidamente que la PCR estándar puesto que no se requiere un ciclo de desnaturalización (p. ej., desnaturalización por calentamiento o química). Como tal, la amplificación facilitada por helicasa se puede llevar a cabo isotérmicamente. Una mezcla de helicasa y proteína de unión a cadena monocatenaria (SSB) es particularmente útil ya que la SSB puede facilitar aún más la amplificación. Las formulaciones de ejemplo para la amplificación facilitada por helicasa incluyen las vendidas comercialmente como kits IsoAmp de Biohelix (Beverly, MA). Además, se describen ejemplos de formulaciones útiles que incluyen una proteína helicasa en los documentos US 7,399,590 y US 7,829,284.

En algunos de los métodos descritos en el presente documento, los reactivos de amplificación utilizados en los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además una o más proteínas de unión al origen. Sin estar sujeto a ninguna teoría en particular, la inclusión de una proteína de unión al origen en la reacción de amplificación facilita la formación de amplicones y, en algunos casos, aumenta la velocidad de formación de amplicones.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, los reactivos de amplificación usados en los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además una o más polimerasas. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una polimerasa de desplazamiento de cadena tal como una polimerasa Bst, una polimerasa polD, una polimerasa 9°N o una polimerasa phi29. En algunas realizaciones, la polimerasa es una polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, el molde es ARN y la polimerasa puede ser una transcriptasa inversa.

El mantenimiento de la representación (o especificidad) de la muestra es de importancia crítica para muchos métodos de preparación de bibliotecas porque las bibliotecas utilizadas en varias aplicaciones analíticas posteriores, tales como la secuenciación de próxima generación, deben cumplir varios requisitos. Por ejemplo, para muchas aplicaciones de bibliotecas de ADNc (p. ej., buscar genes expresados diferencialmente), es esencial minimizar la distorsión de la representación del ADNc en una biblioteca con respecto al ARNm inicial. Dicho de otra manera, el contenido de ADNc individuales en la biblioteca, en algunas aplicaciones posteriores, debe ser proporcional al número de copias de los ARN iniciales. En contraste, para algunas otras aplicaciones, las concentraciones de diferentes ADNc individuales en una biblioteca deben ser equilibradas. Los autores de la invención han demostrado que, mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento, la complejidad de la biblioteca de ADN de entrada podría mantenerse fielmente, incluida la relación de especie a especie de ADN y posibles llamadas de frecuencia de alelos menores, sin otra diferencia observada más que la cantidad de biblioteca que se está amplificando y normalizando. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 13 y 14 a continuación.

II. Métodos para la preparación multiplexada de bibliotecas de amplicones objetivo

Los protocolos en laboratorio para la amplificación de genes objetivo y la construcción de una biblioteca de amplicones genómicos para la secuenciación se pueden adaptar y describir como protocolos discretos basados en gotas por etapas. Las etapas del protocolo se llevan a cabo en gotas acuosas dentro de un espacio de operaciones de gotas cargado de aceite de un accionador de gotas. Las muestras y los reactivos de ensayo se manipulan como gotas discretas sobre una disposición de electrodos (p. ej., disposición de electrodos **100** de la Figura 1). Las gotas de muestra y las gotas de reactivo para usar para llevar a cabo las diversas etapas del protocolo se pueden dispensar y/o combinar de acuerdo con protocolos de ensayo apropiados usando operaciones de gotas en un accionador de

gotas. La incubación y el lavado de las gotas de ensayo, incluidos los ajustes de temperatura según sea necesario, también se pueden realizar en un accionador de gotas.

Ciertas etapas del protocolo pueden realizarse fuera de un accionador de gotas y ciertas etapas del protocolo pueden realizarse en un accionador de gotas. Por ejemplo, las muestras y los reactivos se pueden preparar fuera del accionador de gotas y combinar e incubar en el accionador de gotas. La preparación de reactivos (p. ej., tampones, disoluciones de mezcla madre de PCR y disoluciones de normalización) también se pueden preparar utilizando protocolos en el laboratorio antes de cargar en un accionador de gotas. En otro ejemplo, el reactivo y/o las muestras pueden prepararse en depósitos asociados con el accionador de gotas y luego fluir a diferentes espacios de operaciones, y/o prepararse en el espacio de operaciones de gotas.

La Figura 6 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método **600** de preparación de una biblioteca de amplicones objetivo, por ejemplo, en un accionador de gotas, para aplicaciones analíticas posteriores tales como, por ejemplo, secuenciación de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. El método **600** puede incluir las siguientes etapas.

En una etapa **610**, se proporciona una muestra de ácido nucleico tal como, por ejemplo, una muestra de ADN genómico (p. ej., de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10 ng), por ejemplo, mediante carga en un depósito de muestra de un accionador de gotas. En algunos casos, se utiliza un protocolo basado en perlas realizado en el accionador de gotas para concentrar y purificar una muestra de ADN genómico antes de las etapas de procesamiento de muestras posteriores. En un ejemplo, el protocolo basado en perlas utiliza perlas SPRI magnéticamente sensibles (p. ej., perlas de inmovilización reversible de fase sólida, Agencourt AMPureXP disponible en Beckman Coulter) para concentrar y purificar la muestra de ADN genómico. Por ejemplo, el ADN genómico se inmoviliza en perlas magnéticamente sensibles (p. ej., perlas SPRI) y se usa un imán y una serie de lavados para concentrar y purificar el ADN antes de las etapas de procesamiento posteriores.

En una etapa **615**, las secuencias de ácido nucleico objetivo se amplifican en una reacción de amplificación por PCR multiplexada usando pares de cebadores específicos del objetivo que flanquean las regiones de interés. Los pares de cebadores específicos del objetivo incluyen, por ejemplo, (1) un cebador directo que comprende una región específica del objetivo y opcionalmente una secuencia de cebador de secuenciación por síntesis (SBS), y (2) un cebador inverso que comprende una secuencia específica del objetivo y opcionalmente una secuencia universal. Los cebadores directo e inverso en cada par de cebadores flanquean una región de interés en la molécula de ácido nucleico objetivo. En general, se puede usar cualquier número de pares de cebadores. En algunos ejemplos, se usan 200 pares de cebadores en un formato de amplificación multiplexada (p. ej., 200-plex) para dirigirse a 200 secuencias de ADN de interés. El número de ciclos de PCR generalmente puede ser cualquier número de ciclos y puede ser, por ejemplo, de 2 a aproximadamente 100 ciclos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunos ejemplos de los métodos descritos en el presente documento, el número de ciclos de PCR puede ser de 4 a aproximadamente 10 ciclos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunos casos, se pueden usar de 4 a 6 ciclos de PCR para amplificar las secuencias de ADN a las que se dirige.

En una etapa **620**, se lleva a cabo una segunda reacción de amplificación utilizando un par de cebadores universales. El par de cebadores universales incluye un cebador directo y opcionalmente un cebador inverso. En algunos casos, el cebador directo incluye una secuencia complementaria de SBS, opcionalmente una secuencia de índice única y una secuencia de cebador, por ejemplo, la secuencia de cebador P5. El cebador inverso incluye una secuencia de cebador universal complementaria. El número de ciclos de PCR generalmente puede ser cualquier número de ciclos y puede ser, por ejemplo, de 4 a aproximadamente 10 ciclos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En un ejemplo, se usan 14 ciclos de PCR en la segunda reacción de amplificación.

En una etapa **625**, los amplicones se hibridan con sondas de captura en una reacción de hibridación basada en disolución. La sonda de captura incluye, por ejemplo, una secuencia de captura específica del objetivo, una secuencia de cebador (p. ej., secuencia de cebador P7) y un marcador de biotina. La secuencia de captura específica del objetivo tiene complementariedad de secuencia con una secuencia en una región objetivo de interés en la muestra de ácido nucleico. En un ejemplo, se usan 200 sondas de captura con diferentes secuencias de captura en una reacción de hibridación para dirigirse a 200 secuencias de ADN.

En una etapa **630**, se añaden perlas de captura tales como, por ejemplo, perlas de captura recubiertas de estreptavidina magnéticamente sensibles (perlas de captura SA) a la reacción de hibridación para la captura de dúplex de amplicón\sonda de captura hibridados. Los dúplex de amplicón\sonda de captura hibridados y las sondas de captura no hibridadas se inmovilizan en las perlas de captura SA por formación de un complejo de unión de biotina-estreptavidina.

En una etapa **635**, la secuencia de captura específica del objetivo de las sondas de captura hibridadas con secuencias de ADN objetivo se extiende para formar una cadena de ADN complementaria inmovilizada.

En una etapa **640**, una cantidad de sondas de captura tales como, por ejemplo, cebadores P7-biotina se capturan sobre las perlas de captura con SA con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos sobre las mismas. Los cebadores P7-biotina incluyen una secuencia de cebador P7 y un marcador de biotina. En este ejemplo, los cebadores P7-biotina se inmovilizan en las perlas de captura con SA mediante la formación de un complejo de unión de biotina-estreptavidina. Las perlas de captura con SA con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos en las mismas, incluyen ahora una cantidad de cebadores de P7-biotina inmovilizados. Los cebadores de P7-biotina se usan en la reacción de amplificación de exclusión posterior para la normalización de la biblioteca en la etapa **645** como se describe a continuación.

En una etapa **645**, la muestra de ácido nucleico se normaliza usando una reacción de amplificación de exclusión (ExAmp). La normalización de la muestra (ExAmp) se realiza para igualar las cantidades de muestras y ajustar la concentración de ADN para la secuenciación posterior. En algunas realizaciones, la preparación de la disolución de la reacción de ExAmp para la normalización de la biblioteca se prepara en el accionador. En algunas realizaciones, la disolución de la reacción de ExAmp para la normalización de la biblioteca se prepara en el laboratorio y posteriormente se carga en un depósito dispensador de reactivo de un accionador de gotas. La disolución de la reacción de ExAmp incluye reactivos de reacción y cebadores de normalización (p. ej., secuencias de cebadores P5). La reacción de normalización de la biblioteca de ExAmp es una reacción de amplificación isotérmica que utiliza un primer conjunto de cebadores de normalización (p. ej., cebadores de P7-biotina) inmovilizados en las perlas con SA y un segundo conjunto de cebadores de normalización (p. ej., cebadores P5) en disolución como cebadores de normalización para la normalización de la biblioteca. Las condiciones de reacción (p. ej., el tiempo de incubación, la concentración de cebador P7 y/o P5 y los componentes de reacción) se pueden seleccionar de manera que se conviertan todos los sitios del cebador P7 en las perlas con SA, p. ej., la reacción se lleva a la saturación.

En una etapa **650**, los amplicones de la biblioteca se eluyen de las perlas de captura para la secuenciación. En un ejemplo, ilustrado en la Figura 7B, los amplicones **390** se eluyen de las perlas con SA **385** y se desnaturalizan calentando a 95°C durante 4 minutos.

Las figuras 7A y 7B muestra gráficamente las etapas del método **600** de la Figura 6. A saber, una muestra de ADN genómico (no se muestra) incluye una molécula de ácido nucleico objetivo **310**. La molécula de ácido nucleico objetivo **310** incluye una región de captura **315**. En la etapa **615**, la molécula de ácido nucleico objetivo **310** se amplifica en una primera reacción de amplificación de enriquecimiento, que se lleva a cabo opcionalmente en formato multiplexado utilizando un par de cebadores específicos del objetivo. El par de cebadores específicos del objetivo incluye, por ejemplo, un cebador directo específico del objetivo **320** y un cebador inverso específico del objetivo **325**. El cebador directo **320** incluye una región específica del objetivo **330** y opcionalmente una secuencia universal. En algunas realizaciones, la secuencia universal incluye una secuencia de cebador de SBS **335** (p. ej., SBS3). El cebador inverso **325** incluye una región específica del objetivo **340** y opcionalmente una región de cebador universal **345**. Las regiones específicas del objetivo **330** y **340** flanquean una región de interés en la molécula de ácido nucleico objetivo **310**. En general, se puede usar cualquier número de pares de cebadores específicos del objetivo. En algunos ejemplos, se pueden usar 200 pares de cebadores específicos del objetivo en un formato de amplificación multiplexada (p. ej., 200-plex) para dirigirse a 200 secuencias de ADN de interés. El número de ciclos de PCR generalmente puede ser cualquier número de ciclos y puede ser, por ejemplo, de 2 a aproximadamente 100 ciclos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunos ejemplos de los métodos descritos en el presente documento, el número de ciclos de PCR puede ser de 4 a aproximadamente 10 ciclos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunas realizaciones, se pueden usar de 4 a 6 ciclos de PCR para amplificar las secuencias de ADN que son objetivo. En algunas realizaciones, se pueden usar 4 ciclos de PCR para amplificar las secuencias de ADN que son objetivo. Un amplicón **350** sintetizado usando el cebador directo **320** y el cebador inverso **325** ahora incluye la región de cebador de SBS **335** y región de cebador universal **345**.

En la etapa **620**, se lleva a cabo una segunda reacción de amplificación de enriquecimiento opcional (p. ej., 14 ciclos de PCR) utilizando un par de cebadores universales. El par de cebadores universales incluye, por ejemplo, un cebador directo universal **355** y un cebador inverso universal **345a**. En algunas realizaciones, el cebador directo universal **355** incluye una región que tiene complementariedad de secuencia con la secuencia universal del cebador directo específico del objetivo **320** en la etapa **615**. En algunas realizaciones, el cebador directo universal **355** incluye una región complementaria de SBS **335a** que es complementaria de la región de cebador de SBS **335**. En algunas realizaciones, el cebador directo universal **355** incluye una región de índice **360**, y opcionalmente una región de cebador tal como, por ejemplo, una región de cebador P5 **365**. El cebador inverso universal **345a** incluye una secuencia que tiene complementariedad de secuencia con la región de cebador universal **345** del cebador inverso específico del objetivo **325** descrito en la etapa **615** antes. En general, se puede usar cualquier número de pares de cebadores universales. El número de ciclos de PCR generalmente puede ser cualquier número de ciclos y puede ser, por ejemplo, de 2 a aproximadamente 100 ciclos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunos ejemplos de los métodos descritos en el presente documento, el número de ciclos de PCR puede ser de 4 a aproximadamente 10 ciclos, de aproximadamente 6 a aproximadamente 20, de aproximadamente 8 a aproximadamente 15, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ciclos de PCR. En algunas realizaciones, se pueden usar de 10 a 20 ciclos de PCR para amplificar las secuencias de ADN que son objetivo. En algunas realizaciones, se pueden usar 14

ciclos de PCR para amplificar las secuencias de ADN que son objetivo. El amplicón **350** ahora incluye la región de cebador P5 **365**, región de indexación **360**, región de cebador de SBS **335** y región de cebador universal **345**.

5 En la etapa **625**, el amplicón **350** se hibrida con una sonda de captura **370** en una reacción de hibridación basada en disolución. En algunas realizaciones, la sonda de captura **370** incluye una región complementaria de captura **315a** que es complementaria a la región de captura **315** en el amplicón **350**. En algunas realizaciones, la sonda de captura **370** incluye además una región de cebador tal como, por ejemplo, una región de cebador P7 **375**, y opcionalmente un reactivo de marcaje tal como, por ejemplo, un marcador de biotina **380**.

10 En la etapa **630**, se añade una cantidad de perlas de captura tal como, por ejemplo, perlas de captura con SA **385** a la reacción de hibridación para la captura de los dúplex de amplicón **350** /sonda de captura **370** hibridados y opcionalmente las sondas de captura **370** no hibridadas. Los dúplex de amplicón /sonda de captura hibridados y las sondas de captura no hibridadas se inmovilizan en las perlas de captura con SA mediante la formación de un complejo de unión biotina-estreptavidina.

15 En la etapa **635**, la región complementaria de captura **315a** de la sonda de captura **370** se extiende para formar una cadena de ADN **390** inmovilizada. La cadena de ADN **390** inmovilizado en la perla de captura **385** ahora incluye marcador de biotina **380**, región de cebador P7 **375**, región de cebador de SBS **335**, región de índice **360**, y región de cebador P5 **365**.

20 En la etapa opcional **640**, se añade una cantidad de sonda de captura modificada **395**, que es esencialmente la sonda de captura **370** desprovista de la región de captura la región de captura **315**, a la reacción de la perla de captura con SA. En esta realización de ejemplo, la sonda de captura modificada **395** incluye región de cebador P7 **375** unida al marcador de biotina **380**. Las sonda de captura modificadas **395** (p. ej., cebadores de P7-biotina) se inmovilizan en perlas de captura con SA **385** por formación de un complejo de unión de biotina-estreptavidina. Las perlas de captura con SA **385** con dúplex de amplicón **390**/sonda de captura **370** en las mismas ahora incluyen una cantidad de cebadores de P7-biotina inmovilizados **395**.

25 En la etapa **645**, se lleva a cabo una amplificación de normalización, por ejemplo, en un procedimiento de amplificación isotérmica tal como, por ejemplo, en una reacción de ExAmp usando cebador de P7-biotina inmovilizado **395** y cebadores P5 en la disolución de la reacción (no mostrada) como cebadores de normalización. Las condiciones de reacción (p. ej., el tiempo de incubación, la concentración del cebador P7 y/o P5 y los componentes de reacción) se pueden seleccionar de manera que se conviertan todos los sitios de cebador P7 en las perlas con SA, p. ej., la reacción se lleva hasta la saturación. La cantidad de cebadores P7 inmovilizados en el sustrato sólido se usa para controlar la
30 cantidad de producto de amplificación, de modo que normaliza las cantidades de productos finales en todas las múltiples muestras de ácidos nucleicos o bibliotecas.

En la etapa opcional **650**, los amplicones **390** se eluyen de las perlas con SA **385** para la secuenciación. En un ejemplo, los amplicones **390** se eluyen de las perlas con SA **385** y se desnaturalizan por calentamiento a 95°C durante 4 minutos.

35 Además, o alternativamente, la hibridación de las sondas de captura **370** con amplicón **350** se puede llevar a cabo en fase sólida, p. ej., en perlas de captura. Como se ilustra en los diagramas de flujo que se muestran en las Figuras 8 y 9A-9B, en la etapa **830**, se añade una cantidad de perlas de captura **385** con sondas de captura **370** unidas a las mismas, a la reacción de hibridación para capturar los amplicones **350**. Después se lleva a cabo la etapa de hibridación **825**, en la que las sondas de captura inmovilizadas en las perlas de captura se hibridan con los amplicones **350** para
40 formar dúplex de amplicón **350**/sonda de captura **370** que están inmovilizados en la fase sólida, p. ej., perlas de captura. Las etapas restantes **830**, **835**, **840**, **845** y **850** se llevan a cabo de manera similar a las etapas correspondientes **630**, **635**, **640**, **645** y **650** de los métodos alternativos descritos en las Figuras 6 y 7A-7B.

III. Accionador de gotas configurado para la entrada de ADN genómico para producir muestras de amplicones objetivo

45 En un aspecto, algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a ciertas técnicas moleculares accionadas por gotas. En algunas realizaciones, un accionador de gotas puede, por ejemplo, incluir un sustrato inferior y un sustrato superior que están separados por un espacio de operaciones de gotas. El espacio de operaciones de gotas contiene fluido de carga, tal como aceite de silicona o fluido de carga de hexadecano. El sustrato inferior puede ser, por ejemplo, una placa de circuito impreso (PCB) que puede incluir una disposición de electrodos de operaciones de gotas (p. ej., electrodos de electrohumectación). El sustrato superior puede ser, por ejemplo, un sustrato de plástico
50 o vidrio. El sustrato superior puede incluir un plano o electrodo de referencia de masa.

En un ejemplo, un accionador de gotas se puede adaptar para usar para llevar a cabo un protocolo de preparación de muestras de amplicones objetivo multiplexado. Por ejemplo, la composición del fluido de carga puede seleccionarse para el funcionamiento con reactivos usados en un protocolo particular. El voltaje de transporte de gotas (p. ej., voltaje de electrohumectación) y la frecuencia también se pueden seleccionar para el funcionamiento con reactivos utilizados
55 en un protocolo particular. Los parámetros de diseño pueden variar, p. ej., número y ubicación de depósitos en el accionador, número de conexiones de electrodos independientes, tamaño (volumen) de diferentes depósitos, ubicación de imanes/zonas de lavado de perlas, tamaño de electrodo, espaciado entre electrodos y altura (entre sustratos superior e inferior) del espacio de operaciones de gotas.

El accionador de gotas puede estar diseñado para encajar en una plataforma de instrumentos que alberga características adicionales del accionador de gotas, tales como uno o más imanes para la inmovilización de perlas magnéticamente sensibles y uno o más conjuntos de calentadores para controlar la temperatura dentro de ciertas zonas de reacción y/o lavado.

5 La manipulación de gotas en un accionador de gotas incluye operaciones de gotas tales como dispensación, transporte, fusión, incubación, división y mezcla. El tamaño de una gota puede variar dependiendo de la operación de gotas utilizada en una etapa del protocolo. En un ejemplo, una gota de tamaño unitario, p. ej., "unidad de gota" (DU), es de aproximadamente 0,34 µl y puede describirse como una gota 1x. Las reacciones de protocolo típicas usan un intervalo de tamaños de gotas de aproximadamente 1 DU (p. ej., una gota 1x) a aproximadamente una gota de 6 DU (p. ej., una gota 6x).

10 La Figura 1 ilustra una vista superior de un ejemplo de una disposición de electrodos **100** de un accionador de gotas adecuado para usar para llevar a cabo un protocolo de preparación de biblioteca de amplicones objetivo multiplexada de acuerdo con algunas realizaciones de ejemplo de la descripción. La disposición de electrodos **100** está configurada para el procesamiento multiplexado de múltiples muestras de ADN genómico para la construcción de una o más bibliotecas de amplicones objetivo. Las operaciones de gotas se realizan encima de la disposición de electrodos **100** en una superficie de operaciones de gotas. En este ejemplo, la disposición de electrodos **100** está configurada para procesar hasta 8 muestras diferentes en paralelo en regiones de reacción especializadas para la construcción de 8 bibliotecas de secuenciación de amplicones objetivo diferentes.

15 La disposición de electrodos **100** incluye 8 electrodos de depósito de muestra **110** (en lo sucesivo denominados electrodos de depósito de muestra **110a** a **110h**) para introducir y dispensar disoluciones de muestra (p. ej., una muestra de ADN genómico). La disposición de electrodos **100** también incluye 8 zonas de PCR/reacción bioquímica **115** (en lo sucesivo denominadas zonas de PCR/reacción bioquímica **115a** a **115h**) para realizar ciertas etapas de procesamiento para la construcción de cada biblioteca de amplicones objetivo. Cada una de las zonas de PCR/reacción bioquímica **115** incluye un grupo o disposición de electrodos múltiples para realizar operaciones de gotas. Las etapas de procesamiento incluyen, por ejemplo, amplificación por PCR, hibridación de sonda de captura, captura de perlas, extensión de cebador, normalización de biblioteca y elución de biblioteca. La disposición de electrodos **100** también incluye 8 electrodos de depósito de indexación **120** (en lo sucesivo llamados electrodos de depósito de indexación **120a** a **120h**) para dispensar 8 disoluciones de oligonucleótidos de indexación únicos para indexar cada biblioteca de amplicones objetivo. La disposición de electrodos **100** también incluye 14 electrodos de depósito de reactivos **125** (en lo sucesivo llamados electrodos de depósito de reactivo **125a** a **125n**) configurados para dispensar diferentes líquidos reactivos (p. ej., tampones de lavado, disoluciones de mezcla madre de PCR, perlas de captura magnéticamente sensibles, reactivos de extensión de cebador, reactivos de normalización de biblioteca y disoluciones de tampón de elución/desnaturalización). En algunas implementaciones, los electrodos de depósito **110** y electrodos de depósito de índice **120** se utilizan como depósito de residuos. En algunas implementaciones, los electrodos del depósito de reactivos **125** no se utilizan para residuos.

20 Generalmente, los electrodos del depósito de muestra **110**, las zonas de PCR/bioquímicas **115**, los electrodos de depósito de indexación **120**, y los electrodos de depósito de reactivos **125** están interconectados a través de una disposición, tal como una trayectoria o matriz, de electrodos de operaciones de gotas **130**.

25 En la disposición de electrodos **100**, el electrodo de depósito de muestra **110a** corresponde a la zona de PCR/reacción bioquímica **115a**, que corresponde al electrodo de depósito de indexación **120a**; el electrodo del depósito de muestra **110b** corresponde a la zona de PCR/reacción bioquímica **115b**, que corresponde al electrodo del depósito de indexación **120b**; y así sucesivamente a través del electrodo del depósito de muestra **110h** que corresponde a la zona de PCR/reacción bioquímica **115h**, que corresponde al electrodo de depósito de indexación **120h**. Las 8 disposiciones de los correspondientes electrodos de depósito de muestra **110**, zonas de PCR/reacción bioquímica **115**, y electrodos de depósito de indexación **120** forman 8 carriles de reacción especializados **135** (en lo sucesivo llamados carriles de reacción **135a** a **135h**) para procesar cada entrada de muestra. El uso de carriles especializados para las gotas de muestra minimiza la contaminación cruzada entre diferentes ADN genómicos.

30 Uno o más imanes (no mostrados) pueden estar ubicados cerca de ciertos electrodos de operaciones de gotas **130** para retener una cantidad de perlas magnéticamente sensibles. El imán puede, por ejemplo, ser un imán permanente o un electroimán. En un ejemplo, el imán puede ser un imán móvil que puede moverse cerca y alejarse de su respectivo electrodo de operaciones de gotas **130**. Cada imán está situado de una manera que asegura la inmovilización espacial de las perlas unidas a ácido nucleico durante ciertas etapas de procesamiento (p. ej., lavado de perlas, captura de biblioteca, reacciones enzimáticas y eliminación de perlas después de elución/desnaturalización del ADN genómico procesado).

35 La disposición de electrodos **100** puede incluir una o más zonas de control de temperatura **140**. En un ejemplo, se pueden usar tres zonas de control de temperatura **140** (p. ej., zonas de control de temperatura **140a**, **140b** y **140c**). Los elementos de control de temperatura (no se muestran) controlan la temperatura del fluido de carga (no se muestra) cerca de las zonas de control de temperatura **140**. Cada zona de control de temperatura **140** puede controlarse independientemente a una determinada temperatura(s) suficiente para las diferentes etapas de procesamiento en un protocolo de construcción de bibliotecas. Por ejemplo, la zona de control de temperatura **140a** puede calentarse a

aproximadamente 98°C, que es una temperatura suficiente para la desnaturalización del ADN, mientras que la zona de control de temperatura **140b** puede calentarse de aproximadamente 60°C a aproximadamente 72°C, que es un intervalo de temperatura adecuado para reacciones de reasociación y extensión. Aunque se muestran tres zonas de control de temperatura **140**, puede estar asociado cualquier número de zonas de control de temperatura **140** con la disposición de electrodos **100**.

La disposición de electrodos **100** es un ejemplo de una disposición de electrodos en un accionador de gotas que puede usarse para facilitar los métodos de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción; en concreto, para facilitar la manipulación automática de líquidos para la amplificación y selección de regiones objetivo de ADN genómico para el procesamiento en bibliotecas de amplicones para secuenciación, como se describe en el presente documento.

IV. Protocolo microfluídico digital general para la preparación de una biblioteca de amplicones objetivo

En otro ejemplo, los métodos **200**, **400**, **600** y **800** de las Figuras 2, 4, 6 y 8, respectivamente, se pueden describir como protocolos por etapas basados en gotas para la preparación de una biblioteca de amplicones objetivo. Un ejemplo de un protocolo basado en gotas para la preparación de una biblioteca de amplicones objetivo incluye, pero no se limita a los siguientes movimientos de gotas.

En otro ejemplo de la etapa **610** del método **600** de la Figura 6, una muestra de ADN genómico que comprende una cantidad de perlas SPRI magnéticamente sensibles, se carga en un depósito de muestra de un accionador de gotas. En un ejemplo, la muestra de ADN genómico incluye aproximadamente 1 ng de ADN genómico, una disolución tampón de unión al ADN y una cantidad de perlas SPRI magnéticamente sensibles (p. ej., de aproximadamente 20 µl a aproximadamente 50 µl). La muestra de ADN genómico con perlas SPRI en ella se incuba durante un período de tiempo suficiente para la unión del ADN a las perlas. La disolución de muestra con perlas SPRI es transportada usando operaciones de gotas a una zona del depósito de muestra dentro del campo magnético de un imán. En algunos ejemplos, se usa el volumen completo de la muestra (20-50 µl) en lugar de usar algunas DU. Las perlas SPRI magnéticamente sensibles con ADN genómico en ellas son inmovilizadas por el campo magnético del imán. En un ejemplo, el imán es un imán móvil que puede moverse cerca del electrodo de ciertas operaciones de gotas y lejos del electrodo de ciertas operaciones de gotas. Se retira un líquido sobrenadante de las perlas inmovilizadas y se devuelve usando operaciones de gotas al depósito de muestra para su eliminación. En algunos ejemplos, se retira todo el volumen del líquido sobrenadante (20-50 µl). Se dispensa una gota 2x de tampón de lavado de perlas desde un depósito de reactivos y se transporta usando operaciones de gotas a las perlas SPRI inmovilizadas con ADN genómico en ellas para formar una gota 2x de tampón de lavado/perlas SPRI. Las perlas SPRI con ADN genómico en ellas se resuspenden y se lavan usando un protocolo de lavado de perlas. El imán se sitúa cerca de la gota 2x de tampón de lavado/SPRI de manera que las perlas SPRI magnéticamente sensibles son inmovilizadas por el campo magnético del imán. Se extrae una gota 2x de líquido sobrenadante y se transporta usando operaciones de gotas al depósito de muestra para su eliminación. Una gota 1x de tampón de elución es transportada desde un depósito de reactivo a las perlas SPRI inmovilizadas magnéticamente sensibles con ADN genómico en ellas para formar una gota 1x de tampón de elución/SPRI. La gota 1x de tampón de elución/perla SPRI se incuba a aproximadamente 55°C durante aproximadamente 2 minutos para eluir el ADN de las perlas SPRI. Las perlas SPRI magnéticamente sensibles después son inmovilizadas por el campo magnético del imán y una gota 1x de muestra de ADN se transporta usando operaciones de gotas fuera de las perlas inmovilizadas magnéticamente sensibles a una zona de reacción bioquímica/PCR especializada. Una gota 1x de tampón de lavado de perlas es transportada desde un depósito dispensador de reactivos y se fusiona con las perlas SPRI inmovilizadas magnéticamente sensibles (ahora desprovistas de ADN genómico) para formar una gota 1x de perla SPRI/tampón de lavado. La gota 1x de perla SPRI/tampón de lavado es transportada usando operaciones de gotas al depósito de muestra para su eliminación.

En otro ejemplo de la etapa **615** del método **600** de la Figura 6, se dispensa una gota 1x de reactivo de PCR desde un depósito dispensador de reactivos. La gota 1x de reactivo de PCR incluye, por ejemplo, tampón, polimerasa y dNTP. La gota 1x de reactivo de PCR se combina usando operaciones de gotas con la gota 1x de muestra de ADN para producir una gota 2x de amplificación. Se dispensa una gota 1x de cebador específico del objetivo desde un depósito dispensador de reactivos y se combina usando operaciones de gotas con la gota 2x de amplificación para producir una gota 3x de amplificación específica del objetivo. En un ejemplo, la gota 1x de cebador específico del objetivo incluye pares de cebador directo (p. ej., cebador directo **320** de las Figuras 7A-7B) e inverso (cebador inverso **325** de las Figuras 7A-7B) para una reacción de amplificación de 200-plex. Los ciclos de la PCR (p. ej., 4 ciclos) se realizan en un formato de flujo continuo en el que, para cada ciclo, la gota 3x de amplificación específica del objetivo es transportada cíclicamente utilizando operaciones de gotas entre diferentes zonas de control de temperatura en el accionador de gotas. En un ejemplo, la reacción de amplificación es una incubación inicial a 98°C durante 2 minutos, luego 4 ciclos de PCR de la siguiente secuencia: 98°C durante 20 segundos, 70°C durante 20 segundos, 56°C durante 60 segundos, 72°C durante 75 s; seguido de una incubación final a 72°C durante 60 segundos.

En otro ejemplo de la etapa **620** del método **600** de la Figura 6, una gota 2x de cebador de indexación (p. ej., cebador directo **355** de las Figuras 7A-7B) y una gota 1x de reactivo de PCR se dispensan desde depósitos dispensadores de reactivos y se combinan usando operaciones de gotas para producir una gota 3x de cebador universal. La gota 1x de reactivo de PCR incluye, por ejemplo, tampón, polimerasa, dNTP y un cebador inverso universal (p. ej., cebador inverso **345a** de la Figura 7A). En un ejemplo, el cebador inverso universal es parte de la gota 2x de cebador de indexación. La gota 3x de cebador universal se escinde utilizando operaciones de gotas para producir dos gotas 1.5x

de cebador universal. Una gota 1.5x de cebador universal se combina usando operaciones de gotas con la gota 3x de amplificación específica del objetivo para producir una gota 4.5x de amplificación universal. La segunda gota 1.5x de cebador universal es transportada usando operaciones de gotas a un depósito de recogida de residuos. En un ejemplo, el depósito de recogida de residuos es el puerto de muestra utilizado para residuos en este punto del flujo de trabajo.

5 Los ciclos de la PCR (p. ej., 14 ciclos) se realizan en un formato de flujo continuo donde para cada ciclo la gota 4.5x de amplificación universal es transportada cíclicamente utilizando operaciones de gotas entre diferentes zonas de control de temperatura en el accionador de gotas. En un ejemplo, la reacción de amplificación es una incubación inicial a 98°C durante 30 segundos, luego 14 ciclos de PCR de la siguiente secuencia: 98°C durante 20 segundos, 70°C durante 20 segundos, 60°C durante 60 segundos, 72°C durante 60 s; seguido de una incubación final a 72°C durante

10 120 segundos.

En otro ejemplo de la etapa **625** del método **600** de la Figura 6, se dispensan una gota de sondas de captura 1x (p. ej., una pluralidad de diferentes sondas de captura **370** de las Figuras 7A-7B) y dos gotas de tampón de captura (p. ej., una gota de tampón de captura 2x y una 1x que comprenden SSC 20x) desde depósitos de dispensación de reactivos y se combinan usando operaciones de gotas para producir una gota de sondas de captura 4x. La gota de sondas de captura 4x se escinde usando operaciones de gotas en dos gotas de sondas de captura 2x. Una gota de sondas de captura 2x se combina usando operaciones de gotas con la gota de reacción de amplificación universal 4.5x para producir una gota de amplicón/sonda de captura 6.5x. La segunda gota de sondas de captura 2x es transportada usando operaciones de gotas a un depósito de recogida de residuos. En un ejemplo, la hibridación de la sonda de captura se realiza incubando la gota de hibridación de sonda de captura/amplicón a 98°C durante 3 minutos,

15 20 luego a 75°C durante 30 segundos, luego a 60°C durante 10 minutos y luego a 40°C durante 5 minutos.

En otro ejemplo de la etapa **630** de método **600** de la Figura 6, se preparan perlas magnéticamente sensibles recubiertas con estreptavidina (SA) para la captura de los dúplex de amplicón/sonda hibridados. Por ejemplo, se dispensa una gota de perlas con SA 1x desde un depósito dispensador de reactivos y es transportada usando operaciones de gotas a un electrodo de operaciones de gotas determinado dentro del campo magnético de un imán.

25 Las perlas magnéticamente sensibles dentro de la gota de perla con SA 1x son inmovilizadas por el campo magnético del imán y una gota de líquido sobrenadante 1x se divide y transporta usando operaciones de gotas a un depósito de residuos. Se dispensa una gota de tampón de lavado PR2 2x desde un depósito de reactivos y es transportada usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas para formar una gota de lavado PR2 de perlas con SA 2x. Las perlas se resuspenden y se lavan a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto usando un protocolo de lavado de perlas. Se coloca un imán cerca de la gota de lavado PR2 de perlas con SA 2x de modo que las perlas con SA magnéticamente sensibles son inmovilizadas por el campo magnético del imán. Se extrae una gota de líquido sobrenadante 2x y se transporta mediante operaciones de gotas a un depósito de residuos para su eliminación. El protocolo de lavado de perlas se repite una vez usando una gota de tampón de lavado HT1 2x. Al final del protocolo de lavado de perlas, se dispensa una gota de resuspensión HT1 1x y se transporta mediante operaciones de gotas a

30 35 las perlas con SA inmovilizadas y las perlas se resuspenden para formar una gota de perlas con SA lavadas 1x. La gota de perlas con SA lavadas 1x se transporta usando operaciones de gotas y se fusiona con la gota de amplicón/sonda de captura 6.5x para producir una gota de captura de biblioteca 7.5x. La gota de captura de biblioteca 7.5x se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 min para la captura de dúplex de amplicón/sonda de captura sobre las perlas con SA mediante la formación de un complejo de unión de biotina-estreptavidina. Al final del período de incubación, las perlas con SA magnéticamente sensibles con dúplex de amplicón/sonda de captura son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 7.5x se transporta usando operaciones de gotas fuera del campo magnético a un depósito de recogida de residuos. Se dispensa una gota de tampón de lavado PR2 2x desde un depósito de reactivo y se transporta usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con dúplex de amplicón/sonda de captura en las mismas para formar una gota de lavado de perla/amplicón 2x. Las perlas se resuspenden y se lavan a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto usando un protocolo de lavado de perlas. Al final del período de incubación, las perlas con SA magnéticamente sensibles con dúplex de amplicón/sonda de captura son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 2x se transporta usando operaciones de gotas fuera del campo magnético a un depósito de recogida de residuos.

En otro ejemplo de la etapa **635** del método **600** de la Figura 6, se dispensan dos gotas de tampón de extensión 2x desde un depósito de dispensación de reactivos y se transportan usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con dúplex de amplicón/sonda de captura en las mismas para formar una gota de reacción de extensión 4x. El tampón de extensión incluye, por ejemplo, tampón, polimerasa y dNTP para la síntesis de una cadena de ADN complementaria. La gota de reacción de extensión 4x se incuba a aproximadamente 60°C durante aproximadamente

50 55 5 minutos para la extensión de la secuencia de captura específica del objetivo de las sondas de captura hibridadas con secuencias de ADN objetivo. Al final del período de incubación, las perlas con SA magnéticamente sensibles con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 4x se transporta usando operaciones de gotas fuera del campo magnético a un depósito de recogida de residuos. Se dispensa una gota de tampón de lavado PR2 2x desde un depósito de reactivo y se transporta usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos en las mismas para formar una gota de lavado de perla/amplicón 2x. Las perlas se resuspenden y se lavan a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto usando un protocolo de lavado de perlas. Al final del período de incubación, las perlas con SA magnéticamente sensibles con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos en

60

las mismas son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 2x se transporta usando operaciones de gotas fuera del campo magnético a un depósito de recogida de residuos.

En otro ejemplo de la etapa **640** del método **600** de la Figura 6, se dispensa una gota de cebador de P7-biotina 2x desde un depósito dispensador de reactivos y se transporta usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos en las mismas para formar una gota de normalización de biblioteca 2x. Las perlas con SA con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos en las mismas se resuspenden e incuban a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 minutos para capturar cebadores P7-biotina sobre las perlas de captura con SA. Al final del período de incubación, las perlas con SA magnéticamente sensibles con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos y cebadores P7-biotina son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 2x se transporta usando operaciones de gotas alejándose del campo magnético a un depósito de recogida de residuos.

En otro ejemplo de la etapa **645** del método **600** de la Figura 6, la biblioteca se normaliza usando una reacción de amplificación de exclusión (ExAmp). Para preparar una disolución de reacción de ExAmp, se dispensan dos gotas de reactivo de ExAmp1 2x, una gota de reactivo de ExAmp2 1x, dos gotas de reactivo de ExAmp3-P5 2x y una gota de reactivo de ExAmp3-P5 desde depósitos dispensadores de reactivos y se combinan usando operaciones de gotas para producir una gota de disolución de reacción de ExAmp 10x. La gota de disolución de reacción de ExAmp 10x se divide usando operaciones de gotas en cinco gotas de disolución de reacción de ExAmp 2x. Se transportan tres gotas de disolución de reacción de ExAmp 2x usando operaciones de gotas a un depósito de recogida de residuos. Se transportan dos gotas de disolución de reacción de ExAmp 2x usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con dúplex de amplicón/sonda de captura extendidos y cebadores P7-biotina en las mismas para formar una gota de reacción de normalización 4x. La gota de reacción de normalización 4x se incuba a 38°C durante aproximadamente 20 minutos. Al final del período de incubación, las perlas de SA magnéticamente sensibles con una biblioteca de amplicones normalizada en las mismas son inmovilizadas por el campo magnético de un imán y una gota de líquido sobrenadante 4x se transporta usando operaciones de gotas fuera del campo magnético a un depósito de recogida de residuos.

En otro ejemplo de la etapa **650** del método **600** de la Figura 6, se dispensan dos gotas de tampón de elución 2x (p. ej., las gotas de tampón TE) desde un depósito dispensador de reactivos y se transportan usando operaciones de gotas a las perlas con SA inmovilizadas con amplicones de biblioteca en las mismas para formar una gota de elución de biblioteca 4x. La gota de elución de la biblioteca 4x se incuba a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 4 para la elución y desnaturalización de amplicones de las perlas con SA. Al final del período de incubación, las perlas con SA se inmovilizan mediante el campo magnético del imán y se transporta una gota de biblioteca de amplicones 4x usando operaciones de gotas fuera de las perlas con SA magnéticamente sensibles inmovilizadas para la recogida y posterior secuenciación.

Ejemplos

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Eficiencia de la reacción y uniformidad de la biblioteca

Para evaluar la eficiencia de la reacción y la uniformidad de los amplicones preparados con el método **600** de la Figura 6, se prepararon tres bibliotecas de amplicones objetivo diferentes. Se preparó una primera biblioteca de amplicones objetivo utilizando un protocolo de amplificación en laboratorio, en donde se combinan pares de cebadores específicos del objetivo y un par de cebadores universales en una única reacción de PCR (p. ej., una reacción en una etapa). Se preparó una segunda biblioteca de amplicones objetivo en un accionador de gotas usando un protocolo fluídico digital en una etapa, en donde se combinan pares de cebadores específicos del objetivo y un par de cebadores universales en una única reacción de PCR. Se preparó una tercera biblioteca de amplicones objetivo en un accionador de gotas usando la amplificación en dos etapas (p. ej., etapas **615** y **620**) del método **600** de la Figura 6. Para cada biblioteca, los amplicones se prepararon usando 1 ng de ADN genómico y un grupo de cebadores específicos del objetivo de 161-plex.

La Figura 10 muestra un gráfico **1000** de las distribuciones de tamaños de fragmentos en tres bibliotecas de amplicones dirigidos preparadas usando tres protocolos diferentes de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. En concreto, una biblioteca de amplicones objetivo preparada usando una reacción de amplificación en laboratorio en una etapa, otra biblioteca de amplicones objetivo preparada usando una reacción de amplificación en accionador en una etapa, y otra biblioteca más de amplicones objetivo preparada usando la reacción de amplificación en accionador en dos etapas del método **600** de la Figura 6. La gráfica **1000** muestra (1) una línea **1010** de la distribución de tamaños de fragmentos en la biblioteca de amplicones preparada en laboratorio usando una reacción de PCR en una etapa, (2) una línea **1015** de la distribución de tamaños de fragmentos en la biblioteca de amplicones preparada en el accionador usando una reacción de PCR en una etapa, y (3) una línea **1020** de la distribución de tamaños de fragmentos en la biblioteca de amplicones preparada en el accionador utilizando el método de amplificación en dos etapas **600** de la Figura 6. Los datos presentados en la Figura 10 muestran que en las tres

bibliotecas de amplicones (líneas **1010**, **1015** y **1020**) había una distribución bimodal de productos de PCR deseables (indicados por flechas) y un pico de subproducto no deseado (p. ej., dímeros de cebadores). En la biblioteca de amplicones de laboratorio preparada usando una reacción de PCR en una etapa (línea **1010**), había un pico sustancial de dímeros de cebadores (un subproducto de reacción) y un rendimiento relativamente bajo del producto deseable. En la biblioteca de amplicones preparada usando una reacción de PCR en una etapa en accionador (línea **1015**), había una reducción sustancial en la cantidad de dímeros de cebadores y un aumento en la cantidad del producto de PCR deseable; es decir, la relación de subproducto a producto se desplaza hacia el producto deseable y la formación de subproducto (p. ej., dímeros de cebadores) se minimiza. Finalmente, en la biblioteca de amplicones preparada usando la reacción de amplificación en accionador en dos etapas (línea **1020**) del método **600** de la Figura 6, se eliminó esencialmente la formación de dímeros de cebadores y aumentó aún más la cantidad del producto de PCR deseable. Además, la reacción de amplificación en accionador en dos etapas generalmente ofrece ciclos más rápidos en la segunda etapa (lo que ahorra tiempo) y un sistema más modular (que es mejor para el desarrollo).

Las Figuras 11A y 11B respectivamente muestran un gráfico de barras **1100** que ilustra la eficiencia de la PCR por ciclo y un gráfico de barras **1110** que ilustra la uniformidad de los amplicones en cada biblioteca de la Figura 10. Refiriéndose ahora a la Figura 11A, los datos muestran que la eficiencia de la reacción de PCR realizada en el accionador (aproximadamente 92% por ciclo de PCR) mejora sustancialmente usando la reacción de amplificación en dos etapas del método **600** de la Figura 6 ("Etapa DF 2") en comparación con la eficiencia (aproximadamente 85% por ciclo de PCR) de la reacción de amplificación en una etapa ("etapa DF 1") realizada en un accionador de gotas. Con respecto a las dos muestras etiquetadas "Etapa 1 digitalizada" y "Etapa 2 digitalizada", el término "digitalizado" se refiere a un tipo de experimento en el que las reacciones se realizaron en el laboratorio, pero en condiciones "simulando" DF. Estas condiciones se diseñaron para que coincidan con los diferentes aspectos de DF lo más cerca posible, pero utilizando equipos de laboratorio normales. En experimentos específicos mostrados en la Fig.11A así como en la Fig. 11B descritos a continuación, las reacciones de PCR se realizaron con las mismas relaciones de reactivos que en las reacciones de DF correspondientes, p. ej. "Etapa DF 1" y "Etapa DF 2" (esas condiciones digitalizadas eran diferentes a las condiciones de "laboratorio original") y en aceite DF para simular condiciones DF. Sin embargo, estas reacciones digitalizadas se realizaron en termociclador normal.

Refiriéndose ahora a la Figura 11B, los datos muestran que la distribución (o variabilidad) de amplicones (aproximadamente 89.5%) dentro de la biblioteca generada usando la reacción de amplificación en dos etapas del método **600** de la Figura 6 ("Etapa DF 2") mejora sustancialmente en comparación con la uniformidad de los amplicones (aproximadamente 83%) dentro de la biblioteca generada usando la reacción de amplificación en una etapa ("etapa DF 1") realizada en un accionador de gotas. La uniformidad se define como la distribución/variabilidad de los amplicones dentro de la biblioteca. Una mayor uniformidad significa una distribución más uniforme de amplicones en la biblioteca y proporciona una cobertura de la biblioteca más eficiente en la secuenciación.

La Tabla 1 a continuación muestra un resumen de un ejemplo de cambios que se realizaron para adaptar un protocolo de amplificación dirigida en laboratorio a un formato fluido digital.

Tabla 1

Comparación de los protocolos de amplificación dirigidos en laboratorio y fluido digital			
Cambios	En laboratorio	Fluido digital	Efecto observado
Protocolo	PCR en una etapa	PCR en dos etapas	Mejoras de rendimiento y uniformidad.
Volumen de reacción	50 µl	2 µl	Ahorro de reactivos y mejora del rendimiento
Concentración de ADNg	0.02 ng/µl	0.5 ng/µl	Mejora de rendimiento
Polimerasa Phusion	0.04 U/µl	0.12 U/µl	Mejoras de rendimiento y robustez
Cebadores específicos del objetivo	10 nM de cada	20 nM de cada	Mejoras de uniformidad y rendimiento
Cebador inverso universal	0.2 µM	1.5 µM	Mejoras de rendimiento
Reasociación	60°C	56°C	Mejoras de uniformidad
Perfil térmico	0.2°C/s frío	< 0.4°C/s frío	Ciclos más lentos

Ejemplo 2

Hibridación basada en disolución y uniformidad de biblioteca

Este ejemplo resume los resultados de los experimentos realizados para evaluar el efecto de una reacción de hibridación basada en disolución (etapa **625** del método **600** de la Figura 6) sobre la uniformidad. Para este fin, se prepararon tres bibliotecas diferentes. Una biblioteca, denominada aquí "biblioteca de hibridación basada en perlas",

se preparó en laboratorio usando un procedimiento tradicional en el que las sondas de captura de la biblioteca se inmovilizan primero en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina a través de la interacción de biotina y estreptavidina y después el amplicón de la PCR se hibrida para capturar las sondas. En otra biblioteca, denominada aquí "biblioteca de hibridación basada en disolución y producida en laboratorio", el amplicón de la PCR se hibridó primero en disolución con sondas de captura biotiniladas y luego se inmovilizó a través de la interacción de biotina y estreptavidina en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Finalmente, se preparó una tercera biblioteca denominada "biblioteca DF de hibridación basada en disolución" utilizando la misma secuencia de etapas que la biblioteca de hibridación basada en disolución, pero se realizó en el accionador.

La Tabla 2 a continuación muestra la uniformidad de las bibliotecas preparadas por estos tres protocolos diferentes. En algunos experimentos, se preparó una cuarta biblioteca basada en una hibridación basada en perlas realizada en el accionador (DF). Se observó que la uniformidad de la biblioteca de hibridación basada en disolución mejoraba sustancialmente con respecto a la biblioteca de hibridación basada en perlas tradicional. Se encontró que la uniformidad de la hibridación basada en disolución en la biblioteca DF preparada en el accionador mejoraba aún más.

Tabla 2

Comparación de reacciones de hibridación basadas en perlas y en disolución	
Condiciones	Uniformidad
Hibridación basada en perlas	82.5%
Hibridación basada en disolución	87.5%
Hibridación basada en disolución en DF	90.0%

Ejemplo 3

Modelo matemático para predecir la producción de la biblioteca

Este ejemplo resume los resultados experimentales que ilustran que la flexibilidad y la capacidad de programación de un dispositivo accionador de gotas proporciona un control fino sobre las diversas reacciones bioquímicas realizadas durante la construcción de una biblioteca de amplicones dirigida. Debido al control preciso de las reacciones bioquímicas realizadas en un accionador de gotas, se pueden usar modelos matemáticos para predecir ciertos resultados del procedimiento. Por ejemplo, el rendimiento del producto de hibridación de amplicones y la extensión de las sondas de captura se puede predecir a partir de la entrada del producto de la PCR (entrada de amplicones) y la entrada de sondas de captura utilizadas en las etapas de hibridación y extensión del método 600 de la Figura 6 usando la siguiente ecuación:

$$\text{Log}(\text{rendimiento}[\text{pM}]) = -0.703 + 0.846 * \text{log}(\text{conc. sondas} [\text{pM cada una}]) \div 0.741 * \text{log}(\text{conc. entrada} [\text{pM cada uno}])$$

La Figura 12A muestra una gráfica tridimensional 1200 del rendimiento del producto de hibridación y extensión. La Figura 12B muestra una gráfica 1210 del rendimiento previsto frente al rendimiento real basado en el producto de la PCR y la entrada de la sonda de captura. Refiriéndose ahora a la Figura 12A, los datos muestran la dependencia del rendimiento del producto de hibridación y extensión en las sondas de captura y la concentración de entrada de amplicones de la PCR. Refiriéndose ahora a la Figura 12B, la gráfica muestra la correlación entre el rendimiento real (eje Y) y el rendimiento previsto por la ecuación matemática descrita anteriormente. La buena correlación entre los dos rendimientos como se muestra en la Figura 12B es representativa de la buena calidad del modelo matemático e indicativa de la naturaleza predecible y reproducible de los procesos bioquímicos implicados.

Ejemplo 4

Normalización de bibliotecas (ExAmp)

Este ejemplo resume los resultados experimentales que ilustran que el proceso de normalización de la biblioteca (etapa 645 del método 600 de la Figura 6) se puede realizar en un amplio intervalo de entradas de producto de PCR (amplicón) usando un procedimiento de amplificación adecuado, tal como la amplificación de exclusión cinética (KEA), también conocida como amplificación de exclusión (Ex-Amp). En este ejemplo, se usó una reacción de normalización de ExAmp para igualar sustancialmente las cantidades de muestra y ajustar la concentración de entrada del producto de PCR (amplicón) para aplicaciones de secuenciación posteriores.

La Figura 13 muestra una gráfica 1300 de la producción relativa de la biblioteca en función de la entrada del producto de PCR en bibliotecas preparadas usando el método 600 de la Figura 6. Los datos muestran que el cambio en la producción de la biblioteca es relativamente pequeño en comparación con el cambio en la entrada de producto de PCR, p. ej., hay un cambio de aproximadamente 2 veces en la producción de la biblioteca en un amplio intervalo de concentraciones de entrada de producto de PCR (p. ej., aproximadamente un cambio de 128 veces en la entrada de producto de PCR). Los datos también muestran que incluso más allá del cambio de 128 veces en la entrada de producto PCR, esta disminución en el resultado de la biblioteca es relativamente pequeño en relación con el cambio

en la entrada del producto PCR (p. ej., aproximadamente una disminución de 10 veces en la producción de la biblioteca con una dilución de aproximadamente 100 000 veces en la entrada del producto de PCR).

Las Figuras 14A y 14B muestran una gráfica **1400** de uniformidad de biblioteca y número de veces de amplificación en función de la entrada de producto de PCR (dilución de entrada) y una gráfica **1410** de sesgo de amplificación, respectivamente, en bibliotecas preparadas usando el método **600** de la Figura 6. Refiriéndose a la gráfica **1400** de la Figura 14A, los datos muestran que a medida que disminuye la entrada de producto de PCR, hay una ligera disminución en la uniformidad de la biblioteca (gráfica de barras). Los datos también muestran que a medida que aumenta el número de veces de amplificación (línea), disminuye la uniformidad de la biblioteca. Al minimizar el número de veces de amplificación durante la normalización de la biblioteca (p. ej., dirigiéndose a una amplificación de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces), el efecto sobre la uniformidad de la biblioteca puede evitarse sustancialmente.

Refiriéndose a la gráfica **1410** de la Figura 14B, los datos muestran la correlación de la cobertura de los miembros de la biblioteca para dos cantidades diferentes de entrada de ADN. Varios miembros de la biblioteca que se desvían de la correlación diagonal se resaltan en una elipse discontinua. Esto es indicativo de sesgo de amplificación cuando estos miembros de la biblioteca en particular no se amplifican de manera eficiente. La información superpuesta del contenido de GC de los amplicones, definido como la fracción de la secuencia de ADN del amplicón que consiste en bases dG o dC y que se muestra como sombreado de puntos, muestra que todos los miembros resaltados de la biblioteca con sesgo de amplificación tienen un alto contenido de GC en el amplicón.

Las Figuras 15A y 15B muestra una gráfica tridimensional **1500** del rendimiento de la ExAmp y una gráfica **1510** del rendimiento de la ExAmp previsto frente al real en función de las concentraciones de cebador P5 y cebador P7-biotina. Refiriéndose a Figura 15A, la gráfica **1500** muestra la dependencia del rendimiento del producto de amplificación ExAmp de la concentración de cebadores P5 y biotina-P7. Los datos muestran que el rendimiento se puede modular cambiando las concentraciones tanto de P5 como de biotina-P7.

Refiriéndose a la Figura 15B, la gráfica **1510** muestra la correlación entre el rendimiento real de normalización por ExAmp y el rendimiento previsto por la ecuación matemática derivada de los datos en la gráfica **1500**. El rendimiento de normalización por ExAmp previsto se puede describir en función de las concentraciones de cebador P5 y P7-biotina mediante la siguiente ecuación:

$$\log(\text{rendimiento}[\mu\text{M}]) = 3.7974 + 1.0340 \cdot \log(\text{conc. P5 } [\mu\text{M}]) + 1.0014 \cdot \log(\text{conc. P7-biotina } [\mu\text{M}])$$

Ejemplo 5

30 Eficiencia de elución de la biblioteca

La Tabla 3 a continuación muestra el efecto de la composición del tampón, temperatura y tiempo de incubación sobre la eficiencia de la elución de la biblioteca de las perlas con estreptavidina (etapa **650** del método **600** de la Figura 6). La mayor eficiencia de elución se logró utilizando un tampón de elución de TE + Tween a una temperatura de 95°C y un tiempo de incubación de 3 minutos. Los datos presentados en la Tabla 3 también muestran que la elución era robusta tanto en tiempos inferiores a 3 min como a temperaturas inferiores a 95°C.

Tabla 3

Eficiencia de elución con biotina de perlas con estreptavidina					
TE con Tween	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
95C	106%	105%	110%	102%	99%
90.2C	97%	98%	101%	94%	93%
84.4C	91%	93%	95%	90%	89%
79.1C	84%	86%	89%	85%	85%
75.1C	76%	82%	84%	81%	82%
70C	67%	71%	76%	76%	77%
Agua	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
95C	100%	103%	102%	99%	90%
90.2C	97%	101%	101%	97%	90%
84.4C	94%	99%	98%	96%	90%
79.1C	89%	96%	94%	92%	89%
75.1C	80%	91%	90%	90%	86%
70C	70%	77%	82%	84%	81%

HT1	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
95C	99%	105%	101%	98%	75%
90.2C	73%	86%	84%	86%	69%
84.4C	38%	53%	54%	57%	47%
79.1C	11%	16%	21%	21%	18%
75.1C	4%	5%	9%	7%	9%
70C	2%	2%	4%	3%	4%

La Figura 16 muestra una gráfica **1600** de correlación entre la cobertura de biblioteca por objetivo obtenida de bibliotecas eluidas de perlas con estreptavidina usando desnaturalización por calor en un accionador de gotas y las mismas bibliotecas posteriormente desnaturalizadas por tratamiento con NaOH estándar. La gráfica **1600** muestra una buena correlación, lo que demuestra que la desnaturalización posterior con NaOH no era necesaria y que la biblioteca era desnaturalizada de manera completa y eficiente por el accionador de cabeza.

Ejemplo 6

Uniformidad de biblioteca frente a entrada genómica

Para evaluar la uniformidad de la biblioteca en función de la entrada de ADN genómico, se prepararon 5 bibliotecas utilizando el método **600** de la Figura 6 y 5 muestras de ADN genómico diferentes.

La Figura 17 muestra una gráfica **1700** de la uniformidad de la biblioteca en función de la entrada de ADN genómico para 5 bibliotecas diferentes preparadas de acuerdo con algunas realizaciones de la descripción. Las bibliotecas se prepararon usando 0.2, 1 y 10 ng de 5 muestras diferentes de ADN genómico (muestras de ADN genómico HD200, HD701, HD729, NA12878 y NA20Mix) y un grupo de cebadores específicos del objetivo MJ191-plex. Típicamente, la entrada de muestra de ADN genómico de 1 ng corresponde a aproximadamente 300 genomas, 0.2 ng corresponde a aproximadamente 60 genomas y 10 ng corresponde a aproximadamente 3000 genomas. Los datos presentados en la Figura 17 muestran buena uniformidad (>90% para la mayoría de las bibliotecas) en todas las muestras de ADN genómico y los intervalos de entrada examinados. La especificidad en todas las muestras de ADN genómico fue >95%. En este experimento, la especificidad se definió como el porcentaje de lecturas filtradas correspondientes a los objetivos previstos.

Ejemplo 7

Precisión de la detección de variantes

Para evaluar la precisión de la detección de variantes en bibliotecas preparadas usando el método **600** de la Figura 6, se determinó la correlación entre las frecuencias de variantes esperadas y observadas para ciertos alelos para las bibliotecas NA20mix y HD200 de la Figura 17.

Las Figuras 18A y 18B muestran una gráfica **1800** de precisión de detección de variantes TP (verdaderos positivos) en la biblioteca NA20mix descrita en la Figura 17 y una gráfica **1810** de precisión de detección de variantes TP en la biblioteca HD200 descrita en la Figura 17, respectivamente. Los datos muestran, por ejemplo, que para 1 ng (p. ej., entrada de aproximadamente 300 equivalentes de genoma), existe una buena correlación entre la frecuencia de variantes esperada y la frecuencia de variantes observada para la detección de variantes TP tanto en las bibliotecas NA20mix como HD200. Con referencia a las Figuras 18A y 18B, las áreas encuadradas representan aproximadamente menos de 30 copias del genoma por 1 ng de entrada de ADNg (p. ej., menos de 30 copias de esas variantes/mutaciones específicas). Algunas de las variantes encuadradas corresponden a tan poco como 7 o 3 copias de genoma por 1 ng de entrada de ADNg y demuestran la sensibilidad del sistema fluido digital y el método para la detección precisa de variantes utilizando una entrada de ADN genómico relativamente baja. El área en un círculo en la Figura 18A corresponde a una variante particular que se detectó con una frecuencia superior a la esperada. Esto se atribuye a la baja cobertura de lecturas en este objetivo en particular, lo que resulta en un aumento del ruido.

La Figura 19A muestra una gráfica **1900** de la frecuencia de variantes TP y FP (falso positivo) en función del cromosoma y la posición en bibliotecas genómicas preparadas utilizando un protocolo en laboratorio y en accionador usando el método **600** de la Figura 6. Se prepararon bibliotecas (p. ej., 19 muestras fluidicas digitales (en el accionador) y 9 muestras en laboratorio) utilizando 1 ng de ADN genómico NA12878 de entrada y el conjunto de cebadores específicos del objetivo MJ191-plex. En el genoma NA12878, hay 7 variantes positivas verdaderas. Los datos muestran que todas las variantes TP se detectaron con precisión tanto en las muestras en laboratorio como en el accionador. Los datos también muestran la frecuencia de variantes FP aleatorias y persistentes (indicadas por un asterisco) que se detectaron en todas las muestras en laboratorio o en todas las muestras en el accionador. La frecuencia de las detecciones de variantes FP es sustancialmente menor que la frecuencia de las detecciones de variantes TP. Además, la calidad de la secuenciación de bases es a menudo, pero no siempre, sustancialmente menor para las variantes FP en relación con las variantes TP indicativo de ruido de secuenciación. Las variantes FP se pueden eliminar, por ejemplo, durante el análisis mediante el filtrado utilizando estos dos criterios. Es evidente que el método en el accionador da como resultado menos variantes FP que el método en laboratorio.

La Figura 19B muestra una gráfica **1910** del número promedio de detecciones de variantes FP en las muestras de laboratorio y las muestras del accionador de la gráfica **1900** de la figura 19A. Los datos muestran que, en promedio, había aproximadamente 12 variantes FP en las muestras de laboratorio en comparación con aproximadamente 2 variantes FP en las muestras del accionador. La tasa de detección de variantes FP más baja en las muestras preparadas en el accionador en comparación con las muestras preparadas en laboratorio puede deberse, en parte, a las diferencias en la(s) etapa(s) de PCR de los protocolos de preparación de la biblioteca. Por ejemplo, el protocolo de preparación de la biblioteca en laboratorio utilizaba una reacción de PCR combinada específica del objetivo y universal de aproximadamente 30 ciclos para la amplificación del ADN genómico de entrada. El protocolo de preparación de la biblioteca en el accionador utilizaba una primera amplificación específica del objetivo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 ciclos (etapa **615** del método **600** de la Figura 6) y una segunda amplificación universal (etapa **620** del método **600** de la Figura 6) de aproximadamente 14 ciclos para la amplificación del ADN genómico de entrada (p. ej., PCR total de aproximadamente 20 ciclos o menos). Es posible lograr un menor número total de ciclos de PCR en el protocolo en el accionador debido a la eficiencia mejorada de la PCR y bioquímica.

Ejemplo 8

Escalabilidad de amplicones

Para evaluar la uniformidad de la biblioteca en función de la complejidad de los grupos de cebadores específicos del objetivo, se prepararon bibliotecas de amplicones objetivo utilizando el método **600** de la Figura 6 y 5 grupos de cebadores multiplexados diferentes. Las bibliotecas se prepararon usando 1 y 5 ng de ADN genómico NA12878 y NA20Mix y un grupo de cebadores de 192-plex (Grupo 1; 192 objetivos), o un segundo grupo de cebadores de 192-plex (Grupo 2; 192 objetivos), o un grupo de cebadores 196-plex (Grupo 3; 193 objetivos), o un grupo de cebadores combinados 384-plex (Mezcla de grupos 1 a 2; 384 objetivos), o un grupo de cebadores combinados 580-plex (Mezcla de grupos 1 a 3; 580 objetivos).

La Figura 20_ muestra una gráfica **2000** de uniformidad de la biblioteca en función del ADN genómico y la complejidad del grupo de cebadores. En la gráfica **2000**, los datos muestran una buena uniformidad (la mayoría de las bibliotecas >90%) tanto para muestras de ADN genómico como para las cantidades de entrada. Los datos también muestran que a medida que la complejidad del grupo de cebadores aumentaba desde una menor complejidad (p. ej., 192- o 196-plex) a una mayor complejidad (p. ej., 384- o 580-plex), había relativamente pocos cambios en la uniformidad.

La uniformidad para las muestras preparadas en laboratorio (datos no mostrados) era de aproximadamente 70% para la mezcla de grupos 1 a 3. La mayor uniformidad en las bibliotecas preparadas en el accionador (aproximadamente 90%) en comparación con la uniformidad en laboratorio (aproximadamente 70%) proporciona cobertura de la biblioteca más eficiente en la secuenciación (p. ej., disminuye la profundidad de la secuenciación en aproximadamente un orden de magnitud). La especificidad para todas las muestras de ADN genómico y los grupos de cebadores era de aproximadamente 95%.

Las Figuras 21A, 21B y 21C muestran una gráfica **2100** de cobertura de objetivos en la biblioteca del grupo 1 de 192-plex, una gráfica **2110** de la cobertura de objetivos del grupo 1 de 192-plex en la biblioteca de la mezcla de grupos 1-2 de 384-plex, y un gráfica **2120** de la cobertura de objetivos del grupo 1 de 192-plex en la biblioteca de mezcla de grupos 1-3 de 580-plex descrita en la gráfica **2000** de la Figura 20.

Los datos muestran que cuando la complejidad de una biblioteca aumenta (p. ej., aumento de pares de cebadores específicos del objetivo y objetivos genómicos en las bibliotecas de mezcla de grupos 1-2 y mezcla de grupos 1-3), hay un efecto relativamente pequeño en la cobertura de los objetivos de la biblioteca del grupo 1 de 192-plex.

Ejemplo 9

Sistemas

La Figura 22 ilustra un diagrama de bloques funcional de un ejemplo de un sistema microfluídico **2200** que incluye un accionador de gotas **2205**, que es un ejemplo de cartucho fluídico. La tecnología microfluídica digital realiza operaciones de gotas en gotas discretas en un accionador de gotas, tal como el accionador de gotas **2205**, por control eléctrico de su tensión superficial (electrohúmedecación). Las gotas se pueden intercalar entre dos sustratos del accionador de gotas **2205**, un sustrato inferior y un sustrato superior separados por un espacio de operaciones de gotas. El sustrato inferior puede incluir una disposición de electrodos direccionables eléctricamente. El sustrato superior puede incluir un plano de electrodo de referencia hecho, por ejemplo, de tinta conductora u óxido de indio y estaño (ITO). El sustrato inferior y el sustrato superior pueden estar recubiertos con un material hidrófobo. Las operaciones de gotas se llevan a cabo en el espacio de operaciones de gotas. El espacio alrededor de las gotas (p. ej., el espacio entre los sustratos superior e inferior) puede llenarse con un fluido inerte inmiscible, tal como aceite de silicona, para evitar la evaporación de las gotas y facilitar su transporte dentro del dispositivo. Otras operaciones de gotas pueden efectuarse variando los patrones de activación de voltaje; los ejemplos incluyen fusión, división, mezcla y dispensación de gotas.

El accionador de gotas **2205** puede estar diseñado para caber en una plataforma de instrumentos (no se muestra) del sistema microfluídico **2200**. La plataforma de instrumentos puede contener el accionador de gotas **2205** y albergar

5 otras características del accionador de gotas, tales como, entre otras, uno o más imanes y uno o más dispositivos de calentamiento. Por ejemplo, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más imanes **2210**, que pueden ser imanes permanentes. Opcionalmente, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más electroimanes **2215**. Los imanes **2210** y/o los electroimanes **2215** se colocan en relación con el accionador de gotas **2205** para la inmovilización de perlas magnéticamente sensibles. Opcionalmente, las posiciones de los imanes **2210** y/o electroimanes **2215** se pueden controlar mediante un motor **2220**. Además, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más dispositivos de calentamiento **2225** para controlar la temperatura dentro de, por ejemplo, ciertas zonas de reacción y/o lavado del accionador de gotas **2205**. En un ejemplo, los dispositivos de calentamiento **2225** pueden ser barras calentadoras que se colocan en relación con el accionador de gotas **2205** para proporcionar su control térmico.

10 Un controlador **2230** del sistema microfluídico **2200** está eléctricamente acoplado a varios componentes de hardware del aparato expuesto en el presente documento, tales como el accionador de gotas **2205**, electroimanes **2215**, motor **2220**, y dispositivos de calentamiento **2225**, así como a un detector **2235**, un sistema de detección de impedancia **2240** y cualquier otro dispositivo de entrada y/o salida (no mostrado). El controlador **2230** controla el funcionamiento general del sistema microfluídico **2200**. El controlador **2230** puede, por ejemplo, ser un ordenador de uso general, ordenador de uso especial, ordenador personal u otro aparato de procesamiento de datos programable. El controlador **2230** sirve para proporcionar capacidades de procesamiento, tales como almacenar, interpretar y/o ejecutar instrucciones de software, así como controlar el funcionamiento general del sistema. El controlador **2230** puede configurarse y programarse para controlar datos y/o aspectos de potencia de estos dispositivos. Por ejemplo, en un aspecto, con respecto al accionador de gotas **2205**, el controlador **2230** controla la manipulación de gotas activando/desactivando electrodos.

15 En un ejemplo, el detector **2235** puede ser un sistema de formación de imágenes que se coloca en relación con el accionador de gotas **2205**. En un ejemplo, el sistema de formación de imágenes puede incluir uno o más diodos emisores de luz (LED) (p. ej., una fuente de iluminación) y un dispositivo de captura de imágenes digitales, tal como una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD). La detección puede llevarse a cabo utilizando un aparato adecuado para un reactivo o marcador particular en uso. Por ejemplo, se puede usar un detector óptico tal como un detector de fluorescencia, detector de absorbancia, detector de luminiscencia o similares para detectar marcadores ópticos apropiados. Los sistemas diseñados para la detección basada en matrices son particularmente útiles. Por ejemplo, los sistemas ópticos para usar con los métodos expuestos en el presente documento pueden construirse para incluir diversos componentes y conjuntos como se describe en Banerjee et al., Patente de EE.UU. N° 8,241,573, titulada "Systems and Devices for Sequence by Synthesis Analysis", concedida el 14 de agosto de 2012; Feng et al., Patente de EE.UU. N° 7,329,860, titulada "Confocal Imaging Methods and Apparatus", publicada el 12 de febrero de 2008; Feng et al., Patente de EE.UU. N° 8,039,817, titulada "Compensator for Multiple Surface Imaging", publicada el 18 de octubre de 2011; Feng et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20090272914, titulada "Compensator for Multiple Surface Imaging", publicada el 5 de noviembre de 2009; y Reed et al., Publicación de patente de EE.UU. N° 20120270305, titulada "Systems, Methods, and Apparatuses to Image a Sample for Biological or Chemical Analysis", publicada el 25 de octubre de 2012. Dichos sistemas de detección son particularmente útiles para las realizaciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

20 El sistema de detección de impedancia **2240** puede ser cualquier circuito para detectar la impedancia en un electrodo específico del accionador de gotas **2205**. En un ejemplo, el sistema de detección de impedancia **2240** puede ser un espectrómetro de impedancia. El sistema de detección de impedancia **2240** puede usarse para monitorear la carga capacitiva de cualquier electrodo, tal como cualquier electrodo de operaciones de gotas, con o sin una gota sobre el mismo. Para ver ejemplos de técnicas de detección de capacitancia adecuadas, véase Sturmer et al. Publicación de patente internacional N° WO/2008/101194, titulada "Capacitance Detection in a Droplet Actuator", publicada el 30 de diciembre de 2009; y Kale et al. Publicación de patente internacional N° WO/2002/080822, titulada "System and Method for Dispensing Liquids", publicada el 26 de febrero de 2004, cuyas descripciones completas se incorporan en el presente documento por referencia.

25 El accionador de gotas **2205** puede incluir un dispositivo de interrupción **2245**. El dispositivo de interrupción **2245** puede incluir cualquier dispositivo que promueva la interrupción (lisis) de materiales, tales como tejidos, células y esporas en un accionador de gotas. El dispositivo de interrupción **2245** puede ser, por ejemplo, un mecanismo por sonicación, un mecanismo por calentamiento, un mecanismo de cizalladura mecánica, un mecanismo de agitación con perlas, características físicas incorporadas en el accionador de gotas **2205**, un mecanismo generador de campo eléctrico, mecanismo de ciclado y cualquier combinación de los mismos. El dispositivo de interrupción **2245** puede ser controlado por el controlador **2230**.

30 Se apreciará que diversos aspectos de la presente descripción pueden realizarse como un método, sistema, medio legible por ordenador y/o producto de programa de ordenador. Los aspectos de la presente descripción pueden tomar la forma de realizaciones de hardware, realizaciones de software (incluyendo firmware, software residente, microcódigo, etc.), o realizaciones que combinan aspectos de software y hardware que generalmente se pueden denominar en el presente documento como "circuito", "módulo" o "sistema". Además, los métodos de la presente descripción pueden tomar la forma de un producto de programa de ordenador en un medio de almacenamiento utilizable por ordenador que tiene un código de programa utilizable por ordenador incorporado en el medio.

Se puede utilizar cualquier medio utilizable por ordenador adecuado para los aspectos de software de la presente descripción. El medio utilizable por ordenador o legible por ordenador puede ser, por ejemplo, pero no limitado a, un sistema, aparato, dispositivo o medio electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor. El medio legible por ordenador puede incluir realizaciones transitorias. Los ejemplos más específicos (una lista no exhaustiva) del medio legible por ordenador incluirían algunos o todos los siguientes: una conexión eléctrica que tiene uno o más cables, un disquete de ordenador portátil, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), una memoria de solo lectura programable y borrrable (EPROM o memoria Flash), una fibra óptica, una memoria portátil de solo lectura de disco compacto (CD-ROM), un dispositivo de almacenamiento óptico, un medio de transmisión como los que admiten Internet o una intranet, o un dispositivo de almacenamiento magnético. Tenga en cuenta que el medio utilizable por ordenador o legible por ordenador podría incluso ser papel u otro medio adecuado sobre el cual se imprime el programa, ya que el programa se puede capturar electrónicamente, por ejemplo, mediante escaneo óptico del papel u otro medio, luego compilar, interpretar o procesar de otra manera de forma adecuada, si es necesario, y luego almacenar en una memoria de ordenador. En el contexto de este documento, un medio utilizable por ordenador o legible por ordenador puede ser cualquier medio que pueda contener, almacenar, comunicar, propagar o transportar el programa para su uso por o en conexión con el sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

El código del programa para llevar a cabo operaciones de los métodos y aparatos expuestos en el presente documento puede estar escrito en un lenguaje de programación orientada a objetos tal como Java, Smalltalk, C++ o similares. Sin embargo, el código del programa para llevar a cabo operaciones de los métodos y aparatos expuestos en el presente documento también puede escribirse en lenguajes de programación de procedimientos convencionales, tales como el lenguaje de programación en "C" o lenguajes de programación similares. El código del programa puede ser ejecutado por un procesador, un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC) u otro componente que ejecute el código del programa. El código del programa puede referir simplemente a una aplicación de software que se almacena en la memoria (tal como el medio legible por ordenador que se describe en el presente documento). El código del programa puede hacer que el procesador (o cualquier dispositivo controlado por el procesador) produzca una interfaz gráfica de usuario ("GUI"). La interfaz gráfica de usuario se puede producir de forma visual en un dispositivo de visualización, aunque la interfaz gráfica de usuario también puede tener características audibles. Sin embargo, el código del programa puede funcionar en cualquier dispositivo controlado por procesador, tal como un ordenador, servidor, asistente digital personal, teléfono, televisión o cualquier dispositivo controlado por procesador que utilice el procesador y/o un procesador digital de señales.

El código del programa puede ejecutarse en local y/o en remoto. El código del programa, por ejemplo, puede almacenarse total o parcialmente en la memoria local del dispositivo controlado por el procesador. Sin embargo, el código del programa también se puede almacenar, acceder y descargar al menos parcialmente en remoto, en el dispositivo controlado por el procesador. El ordenador de un usuario, por ejemplo, puede ejecutar completamente el código del programa o ejecutar solo parcialmente el código del programa. El código del programa puede ser un paquete de software independiente que está al menos en parte en el ordenador del usuario y/o es ejecutado parcialmente en un ordenador remoto, o está completamente en un ordenador o servidor remoto. En el último escenario, el ordenador remoto puede estar conectado al ordenador del usuario a través de una red de comunicaciones.

Los métodos y aparatos expuestos en el presente documento pueden aplicarse independientemente del entorno de red. La red de comunicaciones puede ser una red de cable que opera en el dominio de radiofrecuencia y/o el dominio del Protocolo de Internet (IP). Sin embargo, la red de comunicaciones también puede incluir una red informática distribuida, tal como Internet (a veces conocida alternativamente como "World Wide Web"), una intranet, una red de área local (LAN) y/o una red de área amplia (WAN). La red de comunicaciones puede incluir cables coaxiales, cables de cobre, líneas de fibra óptica y/o líneas híbridas coaxiales. La red de comunicaciones puede incluso incluir partes inalámbricas que utilizan cualquier parte del espectro electromagnético y cualquier estándar de señalización (tal como la familia de estándares IEEE 802, GSM/CDMA/TDMA o cualquier estándar celular, y/o la banda ISM). La red de comunicaciones puede incluso incluir partes de cable eléctrico, en las cuales las señales se comunican a través del cableado eléctrico. Los métodos y aparatos expuestos en el presente documento pueden aplicarse a cualquier red de comunicaciones inalámbricas/por cable, independientemente de los componentes físicos, configuración física o estándar(es) de comunicaciones.

Ciertos aspectos de la presente descripción se describen con referencia a diversos métodos y etapas del método. Se entenderá que cada etapa del método puede implementarse mediante el código del programa y/o mediante instrucciones de la máquina. El código del programa y/o las instrucciones de la máquina pueden crear medios para implementar las funciones/actos especificados en los métodos.

El código del programa también puede almacenarse en una memoria legible por ordenador que puede dirigir el procesador, ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para que funcione de una manera particular, de modo que el código del programa almacenado en la memoria legible por ordenador produzca o transforme un artículo de fabricación que incluye medios de instrucciones que implementan diversos aspectos de las etapas del método.

El código del programa también puede cargarse en un ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para hacer que se realicen una serie de etapas operativas para producir un proceso implementado por

el procesador/ordenador de manera que el código del programa proporcione etapas para implementar varias funciones/actos especificados en los métodos de la presente descripción.

Ejemplo 10

Preparación de biblioteca indexada

5 La PCR multiplexada indexada se realizó con la mezcla de tampón OTMI (Illumina Parte nº 15059758), el cebador SBS3-GS-F 161-plex (directo específico de gen) y el cebador GS-R (inverso específico de gen) en betaína, cebador universal directo (UF- 4) con diferentes índices, cebador inverso universal (UR) y ADN genómico humano. Las concentraciones de cebadores utilizadas fueron 10 nM de cada uno de GS-F y GS-R, 300 nM de UF-4 y 200 nM de cebador UR en la reacción de PCR final. Se usó ADN genómico Coriell NA12878 en 0.02 ng/µl final como entrada para la PCR. La ADN polimerasa utilizada era 0.04 U/µl de ADN polimerasa Phusion HSII (Thermo Fisher Scientific).
 10 Los parámetros de termociclado utilizados en este experimento se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros utilizados en reacciones de termociclado.

98°C	2 min
	98°C 20 s
30 ciclos	70°C 30 s
	60°C 60 s (rampa de 70°C a 60°C, 0.2°C/s)
	72°C 75 s (rampa de 60°C a 72°C, 0.2°C/s)
72°C	2 min
10°C	mantenimiento

15 El producto de la PCR resultante tenía adaptadores en los extremos que eran complementarios de los cebadores P7 y P5 usados en el Ejemplo 12 a continuación.

Ejemplo 11

Preparación de perlas de captura para la normalización por Ex-Amp

20 Las perlas con estreptavidina (Illumina Parte nº 11118442) se lavaron con un tampón que contenía Tris-HCl 5 mM, pH 7.5, EDTA 500 nM y NaCl 1 M (tampón BW) y se volvieron a suspender en 75 µl de Biotin-P7-Index-SBS491 en tampón BW a una concentración final de 10 µM. Las perlas se agitaron en vórtice durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en tampón BW 1x y se volvieron a suspender en 37.5 µl o 0.25 nM de cada oligonucleótido molde de sonda de captura, en tampón HT1 (como en el kit MiSeq V3 de 150 ciclos; catálogo Illumina nº MS-102-3001). Las perlas se incubaron durante 5 minutos a 60°C, seguido de 5 minutos a 40°C, luego se lavaron y se volvieron a suspender en tampón AMS-6 (como en el kit HiSeq PE Cluster V4 para cBot (Illumina Catálogo nº PE-401-4001). Después de la
 25 incubación a 40°C durante 5 minutos, las perlas se resuspendieron en 100 µl de NaOH 0.1N y se incubaron durante 5 minutos adicionales a temperatura ambiente. Después, las perlas se lavaron al menos una vez en 100 µl de tampón HT1 y se volvieron a suspender en 150 µl de tampón HT1. Las perlas resultantes contenían cebador de normalización o amplificación biotina-P7 unido.

Ejemplo 12

30 Extensión en perla y normalización por Ex-Amp

Se prepararon diluciones seriadas de diez veces del producto de PCR indexado del Ejemplo 10 en 1 x tampón HT1 y se desnaturalizaron en 20 x SSC calentando a 98°C durante 3 minutos y luego se mantuvieron en hielo. Se añadió un volumen igual de perlas de captura del Ejemplo 11 al producto de PCR desnaturalizado y se incubó a 75°C durante 30 segundos, luego a 65°C durante 10 minutos, luego a 40°C durante 5 minutos, seguido de lavado en tampón PR2 (en Kit MiSeq V3 de 150 ciclos, catálogo Illumina nº MS-102-3001).
 35

La normalización por Ex-Amp en perla se realizó de la siguiente manera. Brevemente, cada muestra se incubó a temperatura ambiente durante 8 minutos con 1 µl de cebador P5 100 µM, 4 µl de H₂O y 5 µl de NaOH 0.1N. Se añadió la mezcla EPX preparada siguiendo las recomendaciones del fabricante (Illumina PN 15067046) y 35 µl de la mezcla EPX a 15 µl del cebador P5 desnaturalizado. Se eliminó el tampón PR2 de las perlas (en el imán) y se añadieron 50 µl del cóctel EPX + P5 a las perlas, y luego se resuspendió e incubó a 38°C durante 20 minutos seguido de la eliminación del líquido sobrenadante. Las bibliotecas se desnaturalizaron con NaOH 0.1 N, se lavaron y se volvieron a suspender en tampón PR2.
 40

Las bibliotecas se cuantificaron utilizando kits de cuantificación de biblioteca de qPCR SYBR Green (KAPA Biosystems, parte número KK4824). Como se muestra en la Figura 29A, los rendimientos de la biblioteca producida

se normalizaron independientemente de las diversas concentraciones de muestra de entrada.

Ejemplo 13

Secuenciación de alto rendimiento (HiSeq)

5 Las muestras del Ejemplo 12 se normalizaron basándose en el rendimiento de la qPCR dado. La concentración total de bibliotecas utilizada era 10 pM. En este ejemplo, las muestras normalizadas del ejemplo 12 se secuenciaron en el HiSeq2000 de Illumina utilizando la química HiSeq V4 (números de catálogo de Illumina: PE-401-4001, FC-401-4002 y FC-401-4003), siguiendo la configuración de índice único estándar según las recomendaciones del fabricante. Las métricas de secuenciación de nivel superior se muestran en la Tabla 5.

10 Tabla 5: Resumen de las métricas de secuenciación para muestras individuales de ácido nucleico cuya concentración de ADN se ha normalizado como se describe en el Ejemplo 12.

Nombre de muestra	PF total	En objetivo	Media	Especificidad	Uniformidad	CV	Span95
S1-30Cyc-Dil-1-ExAmp_S1	77760589	77169353	482308	0.992	0.90625	0.713	22
S2-30Cyc-Dil-10-ExAmp_S2	78706859	78295323	489346	0.995	0.85	0.965	49
S3-30Cyc-Dil-100-ExAmp_S3	75718469	75305133	470657	0.995	0.825	1.089	74
S4-30Cyc-Dil-1000-ExAmp_S4	73640185	72479744	452998	0.984	0.8125	1.112	79

15 Como se muestra en la Tabla 5, se observó que incluso con la dilución agresiva del producto de PCR de entrada, la especificidad de la biblioteca permanecía alta (>0,98). La uniformidad se redujo como se esperaba con una dilución adicional de la biblioteca, sin embargo, incluso con una entrada de producto de PCR diluido 1000 veces, la uniformidad todavía está en un nivel aceptable (>0.80). Por lo tanto, como se muestra en la Tabla 5, las métricas de secuenciación para las bibliotecas del Ejemplo 12 que resultan del método descrito en la presente descripción son comparables al método de preparación de biblioteca estándar.

Ejemplo 14

Extensión en perla y normalización por Ex-Amp

20 En otro experimento, se siguió el procedimiento experimental descrito anteriormente en el Ejemplo 12, excepto que el ADN molde utilizado era ADN genómico de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) (HorizonDX HD751). Las muestras de entrada que contenían 50, 10, 2, 0.4 y 0.08 ng de ADN genómico se analizaron utilizando el protocolo de preparación de biblioteca estándar utilizando el kit de preparación de biblioteca TrueSeq (Illumina FC-121-4001) según las recomendaciones del fabricante o utilizando el método descrito en la presente descripción. Los rendimientos de la biblioteca se cuantificaron usando el kit de cuantificación de la biblioteca KAPA. Los datos que se muestran en la Figura 29B se generaron usando el método de preparación de biblioteca estándar donde los rendimientos de la biblioteca producida eran aproximadamente 659, 216, 67, 18 y 5.3 pM para el intervalo de ADN de entrada de 50, 10, 2, 0.4 y 0.08 ng respectivamente. En comparación, usando el método descrito en la presente descripción, los rendimientos de la biblioteca producida eran consistentes en todo el intervalo de entrada, lo que daba como resultado aproximadamente 51500, 46250, 47628, 45220 y 43238 pM, respectivamente, como se muestra en la Figura 29C.

Ejemplo 15

Extensión en perla y normalización por Ex-Amp

35 En este ejemplo, las muestras se normalizaron basándose en el rendimiento dado de la qPCR. Los rendimientos de la preparación estándar de la biblioteca usando 0.4 ng y 0.08 ng de ADN (muestras S05 y S06 en la tabla a continuación) eran demasiado bajos para ser normalizados. La concentración total normalizada de la biblioteca fue de 20 pM. Las bibliotecas se secuenciaron en el secuenciador MiSeq de Illumina usando el kit MiSeq V3 de 150 ciclos (Catálogo Illumina nº MS-102-3001), siguiendo los parámetros de indexación doble estándar. Las métricas de secuenciación de nivel superior se dan en la Tabla 6. Las muestras S02-S06 son las preparaciones de biblioteca estándar que se muestran en la Figura 29B, mientras que S08-S012 son las muestras de la Figura 29C. Las muestras S01 y S07 son controles.

Tabla 6: Resumen de las métricas de secuenciación para muestras individuales de ácido nucleico cuyas concentraciones de ADN se han normalizado como se describe en el Ejemplo 14.

Nombre de la muestra	PF total	En objetivo	Media	Especificidad	Uniformidad	CV	Span95
S01-AX-NTC_S1	75263	22117	138	0.294	0.388	6.699	462
S02-AX-50ngHD751_S2	4622638	4590000	28688	0.993	0.906	0.905	26
S03-AX-10ngHD751_S3	5624965	5592099	34951	0.994	0.844	0.99	49
S04-AX-2ngHD751_S4	4387777	4359280	27246	0.994	0.756	1.286	138
S05-AX-o4ngHD751_S5	2890741	2854572	17841	0.987	0.681	1.471	604
S06-AX-o08ngHD751_S6	615260	593796	3711	0.965	0.544	1.699	inf
S07-ExAmp-NTC_S7	1215577	422982	2644	0.348	0.031	8.812	435
S08-ExAmp-50ngHD751_S8	4042970	4009345	25058	0.992	0.863	1.031	38
S09-ExAmp-10ngHD751_S9	3993705	3967177	24795	0.993	0.794	1.132	70
S10-ExAmp-2ngHD751_S10	3897994	3869129	24182	0.993	0.688	1.449	210
S11-ExAmp-o4ngHD751_S11	3825284	3787323	23671	0.99	0.65	1.689	833
S12-ExAmp-o08ngHD751_S12	3284845	3177453	19859	0.967	0.512	1.829	200862

5 Como se muestra en la Tabla 6, las métricas de secuenciación para las bibliotecas resultantes del método de amplificación y normalización descrito en la presente descripción (S08-S12) son comparables al método de preparación de biblioteca estándar (S02-S06).

10 Por lo tanto, como demuestran las Figuras 29A y 29C, los métodos de amplificación y normalización descritos en el presente documento proporcionan un método simple de proporcionar una cantidad normalizada de bibliotecas de ADN producidas en un amplio intervalo de concentraciones de muestras de ADN de entrada, donde no se requiere más dilución o concentración de las bibliotecas producidas resultantes antes de agrupar las bibliotecas para la secuenciación posterior. En particular, los datos experimentales presentados en las Tablas 5 y 6 muestran que la calidad del producto amplificado es comparable a los métodos de preparación de bibliotecas existentes en un amplio intervalo de concentraciones de ADN de entrada.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación de ácido nucleico que comprende:
 - a) proporcionar una muestra de entrada que comprende moléculas de ácido nucleico objetivo;
 - 5 b) poner en contacto la muestra de entrada con una mezcla de reacción que comprende una fase sólida y una fase líquida, en donde:
 - i. la fase sólida comprende una pluralidad de primeros cebadores de amplificación inmovilizados en un soporte sólido, siendo capaces los primeros cebadores de amplificación de hibridarse específicamente con una primera secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo, y
 - 10 ii. la fase líquida comprende una pluralidad de segundos cebadores de amplificación en disolución, siendo capaces la pluralidad de segundos cebadores de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo;
 - c) amplificar las moléculas de ácido nucleico objetivo en condiciones isotérmicas de modo que sustancialmente todos los primeros cebadores de amplificación se incorporen en productos de amplificación, en donde
 - 15 la pluralidad de primeros cebadores de amplificación se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y
 - la pluralidad de segundos cebadores de amplificación se proporciona en una cantidad que excede la cantidad de los primeros cebadores de amplificación.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además separar los productos de amplificación del soporte sólido.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el soporte sólido comprende una pluralidad de
 20 perlas, opcionalmente;

en donde el soporte sólido comprende perlas seleccionadas de perlas magnéticas, perlas paramagnéticas, perlas de plástico, perlas de poliestireno, perlas de vidrio, perlas de agarosa, microperlas de citometría de flujo, micropartículas de poliestireno, nanopartículas de poliestireno, micropartículas de poliestireno funcionalizadas, nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, micropartículas de poliestireno recubiertas, nanopartículas de poliestireno recubiertas,
 25 microperlas de sílice, microesferas fluorescentes, nanoesferas fluorescentes, microesferas fluorescentes funcionalizadas, nanoesferas fluorescentes funcionalizadas, microesferas fluorescentes recubiertas, nanoesferas fluorescentes recubiertas, micropartículas teñidas de color, nanopartículas teñidas de color, micropartículas magnéticas, nanopartículas magnéticas, micropartículas superparamagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas y sus combinaciones.
- 30 4. El método de la reivindicación 3, en donde uno o más de los siguientes:
 - (a) las perlas están en un tampón de reacción acuoso;
 - (b) las perlas están en comunicación fluida entre sí;
 - (c) las perlas comprenden perlas con estreptavidina sobre las cuales se fijan los primeros cebadores de amplificación a través de biotina conjugada;
 - 35 (d) las perlas son monoclonales o policlonales;
 - (e) la muestra comprende una o ambas moléculas de ácido nucleico monocatenario o moléculas de ácido nucleico bicatenario.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el soporte sólido es una superficie de un sitio de reacción, opcionalmente;
 40 en donde la superficie de un sitio de reacción comprende una porción inferior de una superficie interna de un pocillo, una ranura, una celda de flujo, una cámara o canal de reacción.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los primeros cebadores de amplificación y los segundos cebadores de amplificación comprenden secuencias complementarias de secuencias de nucleótidos conocidas dentro de las moléculas de ácido nucleico objetivo, opcionalmente en donde al menos uno de
 45
 - a. las secuencias de nucleótidos conocidas corresponden al primer extremo y al segundo extremo de las moléculas de ácido nucleico objetivo;
 - b. los primeros extremos y segundos extremos de las moléculas de ácido nucleico objetivo comprenden adaptadores de cola de secuenciación universales o regiones de cebadores universales que se han añadido a las

moléculas de ácido nucleico objetivo, opcionalmente en donde;

i. las regiones de cebadores universales comprenden una secuencia de cebador de secuenciación por síntesis (SBS);

5 ii. en donde al menos uno de los cebadores primero y/o segundo comprende además una región que tiene complementariedad de secuencia con las regiones de cebadores universales añadidas a las moléculas de ácido nucleico objetivo.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde cada uno de los cebadores de amplificación primero y/o segundo comprende además una porción de indexación.

10 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos una porción de los primeros cebadores de amplificación comprende además una porción de captura que tiene complementariedad de secuencia con una región relacionada de las moléculas de ácido nucleico objetivo además de una secuencia conocida de las moléculas de ácido nucleico objetivo, opcionalmente;

15 en donde la porción de captura se genera hibridando un oligonucleótido de captura con un primer cebador de amplificación inmovilizado sobre el soporte sólido y extendiendo el cebador de amplificación inmovilizado para generar un cebador de amplificación extendido que tiene complementariedad de secuencia con el oligonucleótido de captura.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa de amplificación (c) se realiza en una pluralidad de muestras de ácido nucleico, opcionalmente en donde al menos uno de;

(a) la cantidad de cada muestra de entrada no está normalizada en la pluralidad de muestras,

(b) en donde la pluralidad de muestras de entrada se combina antes de la etapa de amplificación,

20 (c) los productos de amplificación de la pluralidad de muestras se combinan para formar una biblioteca de ácidos nucleicos agrupada,

(d) los productos de amplificación de la pluralidad de muestras se combinan antes de ser separados del soporte sólido respectivo,

25 (e) los productos de amplificación de la pluralidad de muestras se combinan después de ser separados del soporte sólido respectivo.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además obtener una secuencia de nucleótidos de los productos de amplificación.

30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la mezcla de reacción comprende además una o más de una recombinasa, una proteína de unión a ADN monocatenaria, una helicasa y una polimerasa de desplazamiento de cadena.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el primer y segundo cebadores de amplificación son primer y segundo cebadores de normalización, en donde opcionalmente:

(a) la pluralidad de los primeros cebadores de normalización se hibrida con las moléculas de ácido nucleico objetivo antes de ser inmovilizadas en el soporte sólido, o;

35 (b) la pluralidad de primeros cebadores de normalización se inmoviliza sobre el soporte sólido antes de hibridarse con las moléculas de ácido nucleico objetivo.

40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde antes de la etapa (a), las moléculas de ácido nucleico objetivo en la muestra de entrada se someten a una primera reacción de amplificación de enriquecimiento que comprende un primer cebador específico del objetivo y un segundo cebador específico del objetivo, opcionalmente;

en donde cada uno del primer cebador específico del objetivo y/o el segundo cebador específico del objetivo comprende una región que tiene complementariedad de secuencia con secuencias conocidas de las moléculas de ácido nucleico objetivo, opcionalmente:

45 a. en donde cada uno del primer cebador específico del objetivo y/o el segundo cebador específico del objetivo comprende además una región de cebador universal, opcionalmente;

en donde la región de cebador universal del primer cebador específico del objetivo comprende una secuencia de cebador de secuenciación por síntesis (SBS), o;

b. en donde antes de la etapa (a), las moléculas de ácido nucleico objetivo en la muestra de ácido nucleico de entrada se someten a una segunda reacción de amplificación de enriquecimiento que comprende un primer

cebador universal y un segundo cebador universal, en donde:

i. el primer cebador universal comprende una región que tiene complementariedad de secuencia con la región de cebador universal del primer cebador específico del objetivo; y

5 ii. el segundo cebador universal comprende una región que tiene complementariedad de secuencia con la región de cebador universal del segundo cebador específico del objetivo,

y opcionalmente, en donde al menos uno de los cebadores universales primero y/o segundo comprende además una porción de indexación.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el método se lleva a cabo en formato multiplexado usando un accionador de gotas.

10 15. Un sistema microfluídico para llevar a cabo la amplificación multiplexada de muestras de ácido nucleico en un accionador de gotas, que comprende un procesador para ejecutar código, una memoria acoplada en comunicación con el procesador y un código de programa almacenado en la memoria que hace que el procesador ejecute un método de amplificación multiplexada de muestras de ácido nucleico de acuerdo con el método de la reivindicación 14, en donde el método comprende

15 a. cargar una pluralidad de muestras de entrada en una superficie de operaciones de gotas del accionador de gotas que tiene electrodos de operaciones de gotas dispuestos sobre ella, comprendiendo cada una de la pluralidad de muestras de entrada moléculas de ácido nucleico objetivo;

b. dispensar una gota de reactivo de normalización que comprende una pluralidad de primeros cebadores de normalización y una pluralidad de segundos cebadores de normalización, en donde:

20 i. la pluralidad de primeros cebadores de normalización se inmoviliza sobre un soporte sólido, siendo los primeros cebadores de normalización capaces de hibridarse específicamente con una primera secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo; y

25 ii. la pluralidad de segundos cebadores de normalización está en disolución, siendo capaz la pluralidad de segundos cebadores de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo;

c. amplificar las moléculas de ácido nucleico objetivo en condiciones isotérmicas de modo que sustancialmente todos los primeros cebadores de normalización se incorporen en productos de amplificación,

y opcionalmente;

en donde el sistema microfluídico comprende además uno o más de los siguientes componentes:

30 (a) un dispositivo de calentamiento;

(b) un accionador de gotas acoplado térmicamente con el dispositivo de calentamiento, opcionalmente en donde el accionador de gotas comprende uno o más de los siguientes:

35 i. un sustrato inferior y un sustrato superior separados por un espacio de operaciones de gotas, en donde uno o ambos del sustrato inferior y superior comprenden electrodos configurados para realizar operaciones de gotas en el espacio, opcionalmente;

en donde el espacio de operaciones de gotas se llena con un fluido de carga o un gas de carga, opcionalmente;

en donde el fluido de carga se selecciona del grupo que consiste en un aceite de silicona, un fluido de carga de hexadecano, un aceite halogenado, un aceite fluorado y un aceite perfluorado.

40 ii. una disposición de electrodos que comprende uno o más caminos, carriles de reacción y una matriz de electrodos de operación de gotas;

iii. una pluralidad de depósitos de fluido interconectados a través de la disposición de electrodos configurada para dispensar fluidos separados a lo largo de los electrodos, opcionalmente;

45 en donde la pluralidad de depósitos de fluido comprende uno o más depósitos de reactivos, uno o más depósitos de muestra, uno o más depósitos de indexación, uno o más depósitos de residuos, o una combinación de los mismos,

iv. una pluralidad de zonas de control de temperatura;

v. una o más zonas de reacción bioquímica para realizar ciertas etapas de procesamiento para cada reacción de amplificación de ácido nucleico;

vi. uno o más imanes móviles desde y cerca de uno o más de los electrodos de operaciones de gotas, opcionalmente en donde los imanes son imanes permanentes o electroimanes;

(c) un detector ópticamente acoplado al accionador de gotas;

(d) un módulo de detección de impedancia;

5 (e) un dispositivo de disrupción para lisar un biomaterial que comprende ácidos nucleicos; y

(f) un controlador acoplado electrónicamente a uno o más de los componentes de (a) a (d), opcionalmente;

en donde el controlador comprende un código de programa, un procesador para ejecutar el código de programa y una memoria local en comunicación con el procesador, en donde el código de programa hace que el procesador ejecute un método de amplificación multiplexada de muestras de ácido nucleico de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

10

(g) uno o más imanes móviles desde y cerca de uno o más de los depósitos de fluido, en donde las posiciones de los imanes están controladas opcionalmente por un motor.

16. Un medio legible por ordenador que almacena instrucciones ejecutables por el procesador para llevar a cabo un método de amplificación de ácido nucleico multiplexado en un accionador de gotas, comprendiendo el método:

15

a. cargar una pluralidad de muestras de entrada en una superficie de operaciones de gotas del accionador de gotas que tiene electrodos de operaciones de gotas dispuestos sobre ella, comprendiendo cada una de la pluralidad de muestras de entrada moléculas de ácido nucleico objetivo;

b. dispensar una gota de reactivo de normalización que comprende una pluralidad de primeros cebadores de normalización y una pluralidad de segundos cebadores de normalización, en donde:

20

i. la pluralidad de primeros cebadores de normalización se inmoviliza sobre un soporte sólido, siendo capaces los primeros cebadores de normalización de hibridarse específicamente con una primera secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo; y

25

ii. la pluralidad de segundos cebadores de normalización está en disolución, siendo capaz la pluralidad de segundos cebadores de hibridarse específicamente con una segunda secuencia de las moléculas de ácido nucleico objetivo;

c. amplificar las moléculas de ácido nucleico objetivo en condiciones isotérmicas de manera que sustancialmente todos los primeros cebadores de normalización se incorporen en productos de amplificación, en donde

la pluralidad de primeros cebadores de normalización se proporciona en una cantidad que limita el rendimiento de los productos de amplificación a una cantidad predefinida, y

30

la pluralidad de segundos cebadores de normalización se proporciona en una cantidad que excede la cantidad de los primeros cebadores de normalización.

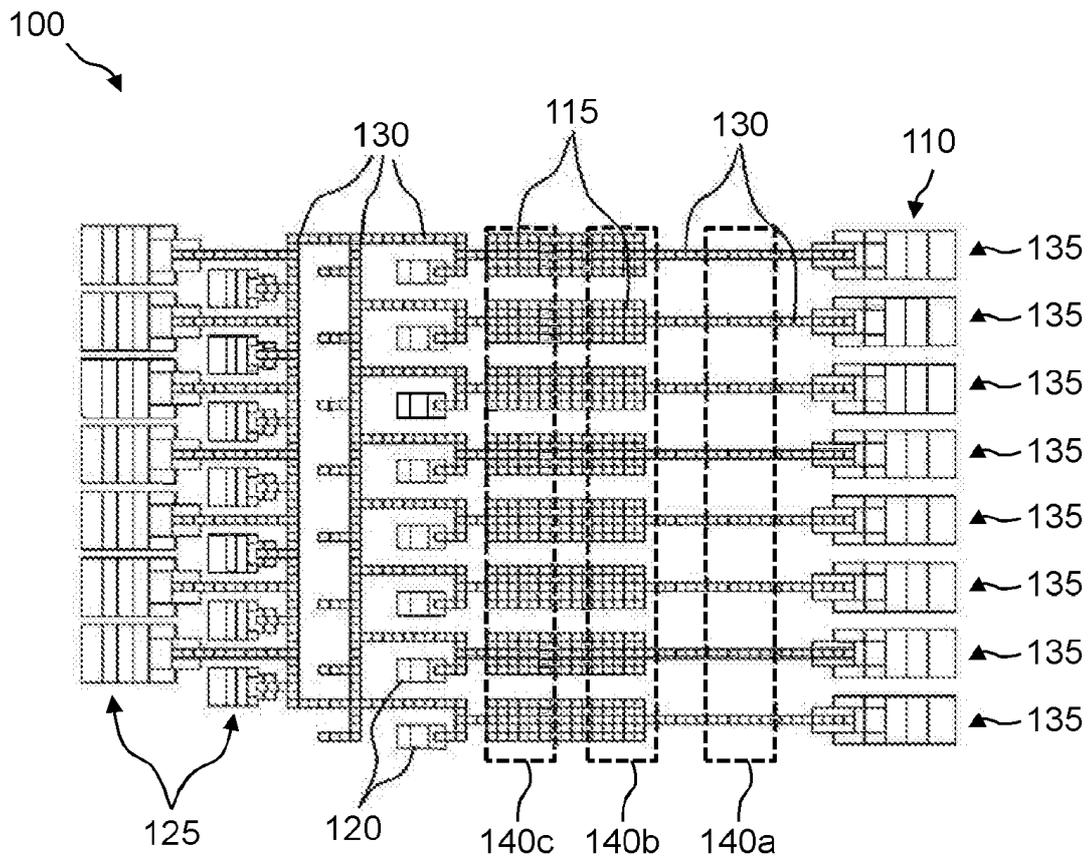


FIG. 1

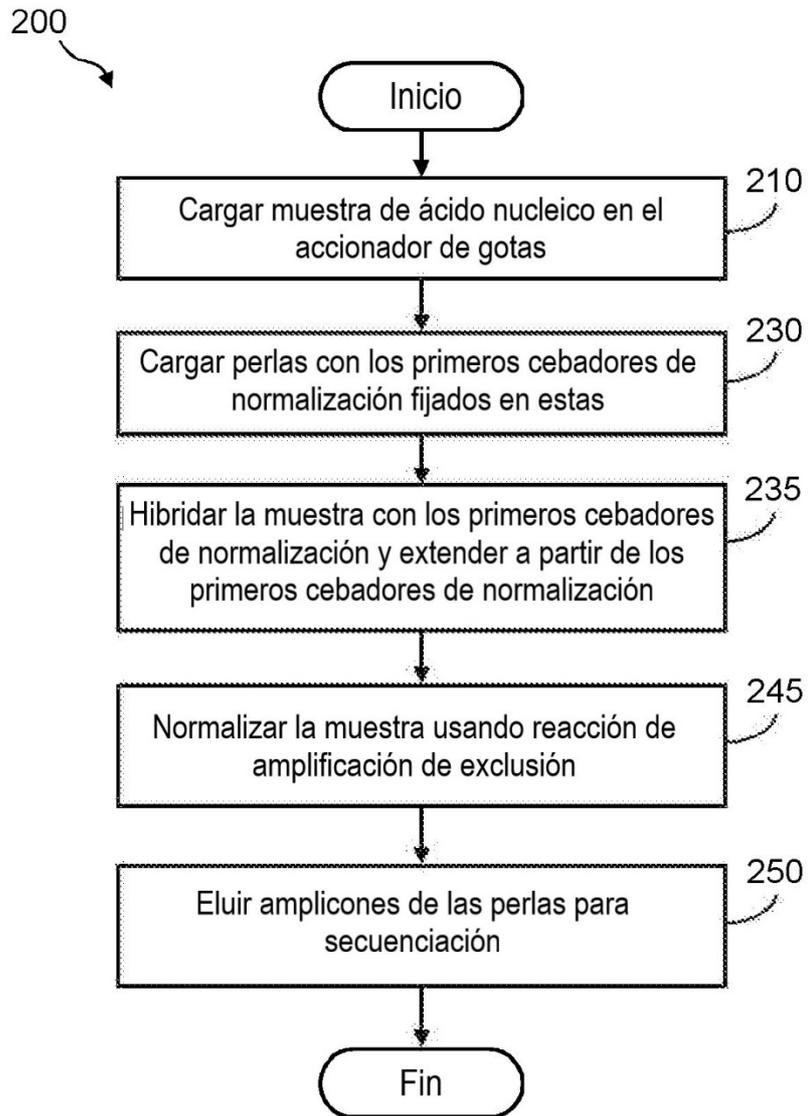


FIG. 2

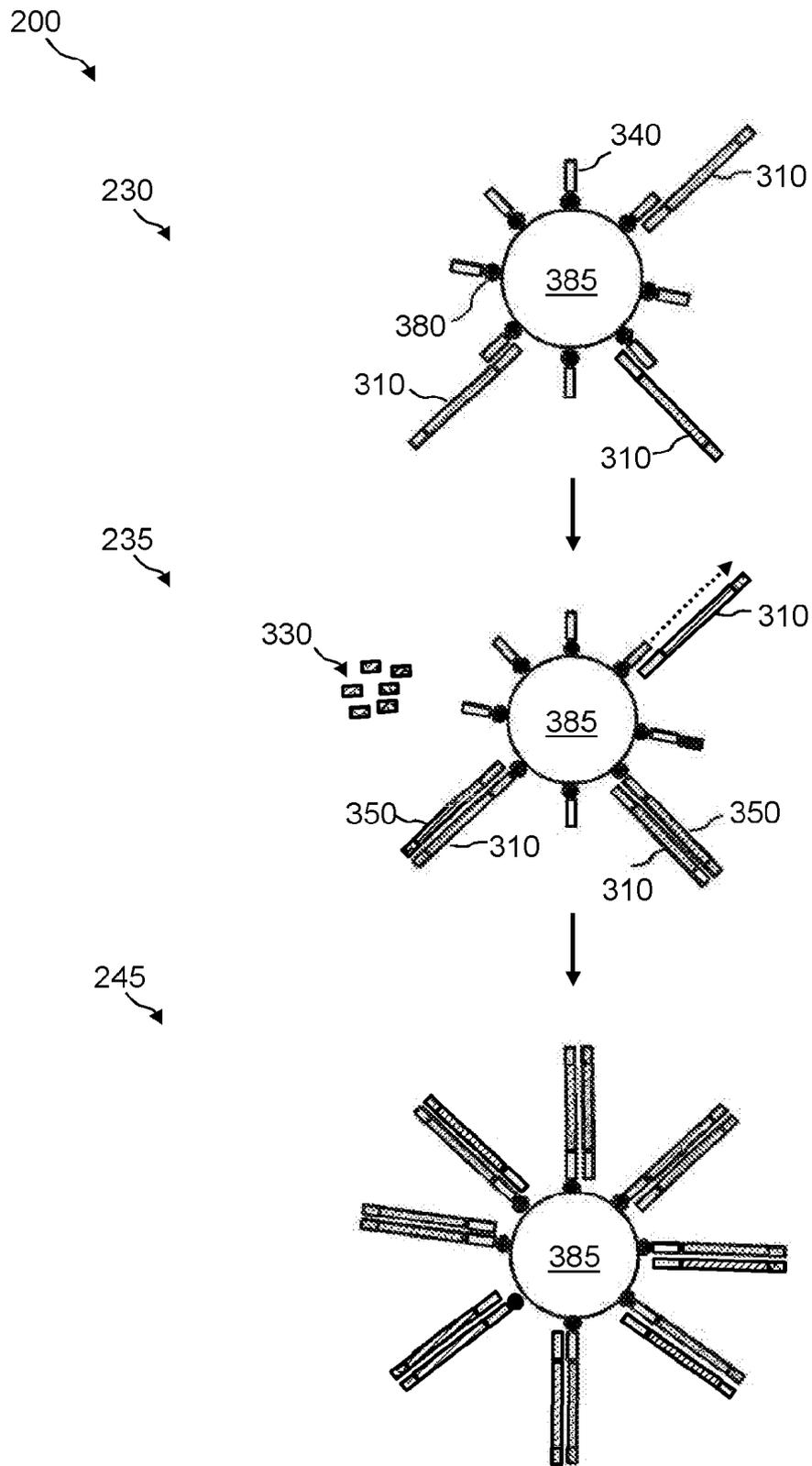


FIG. 3

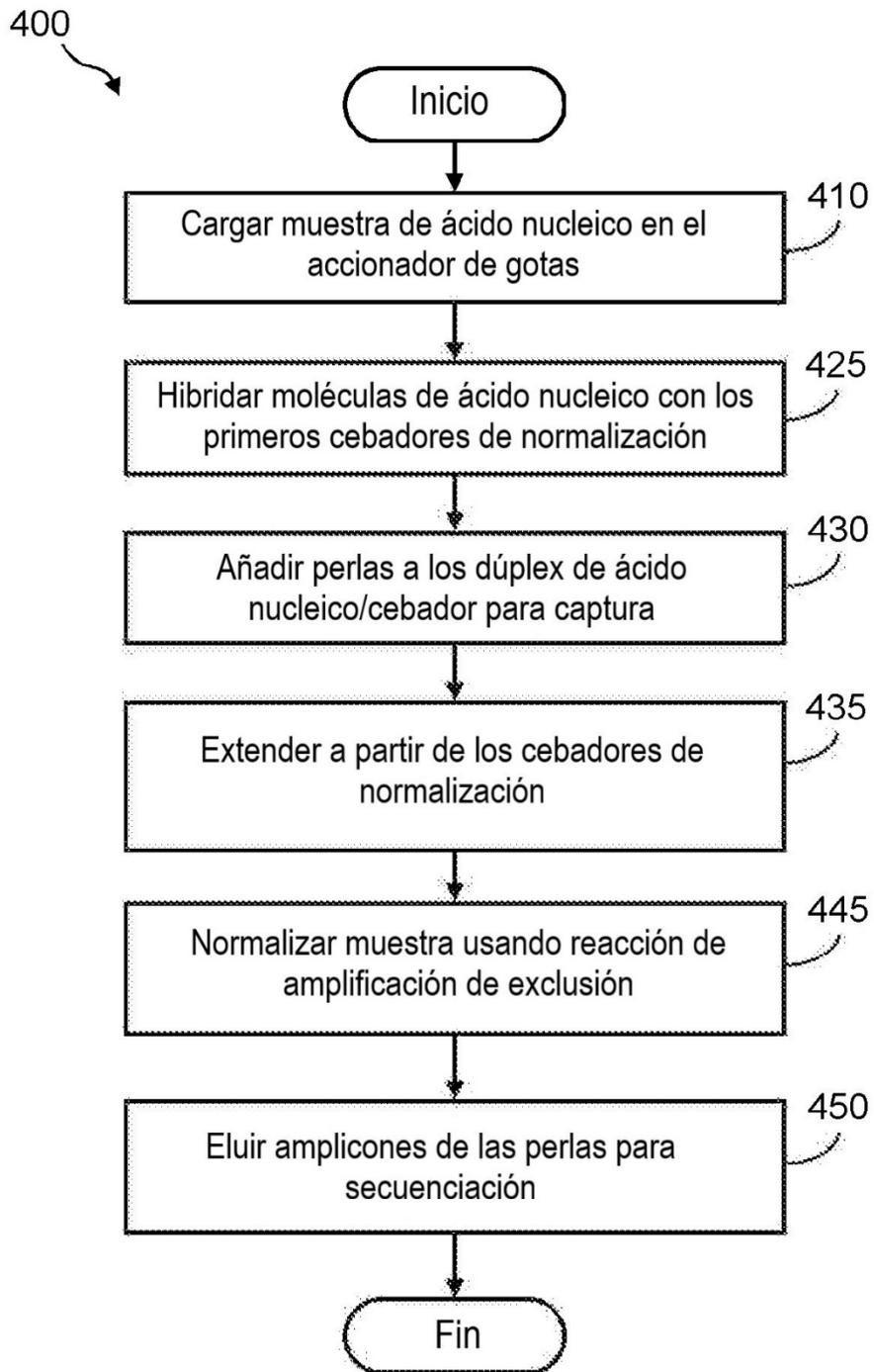


FIG. 4

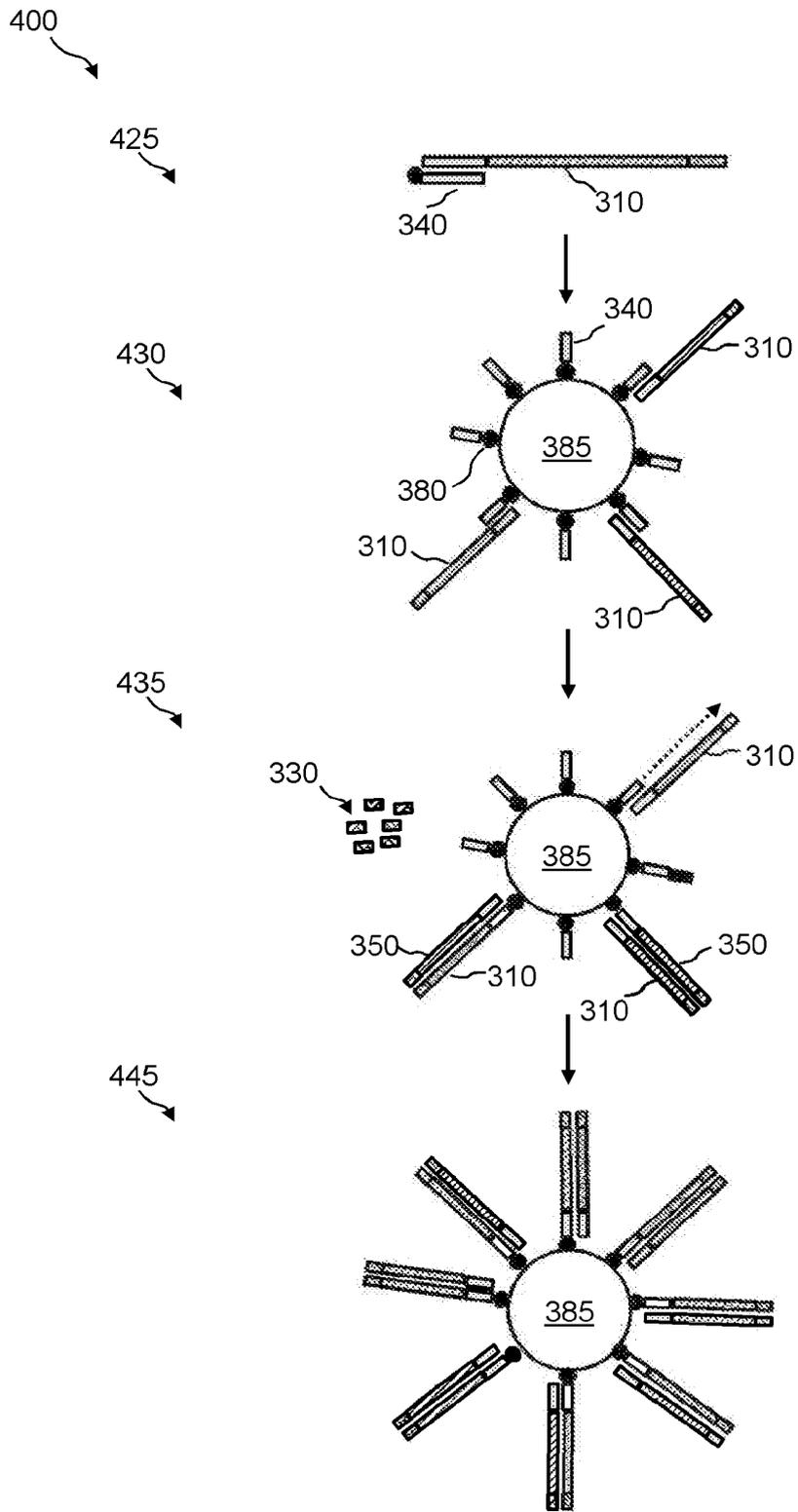


FIG. 5

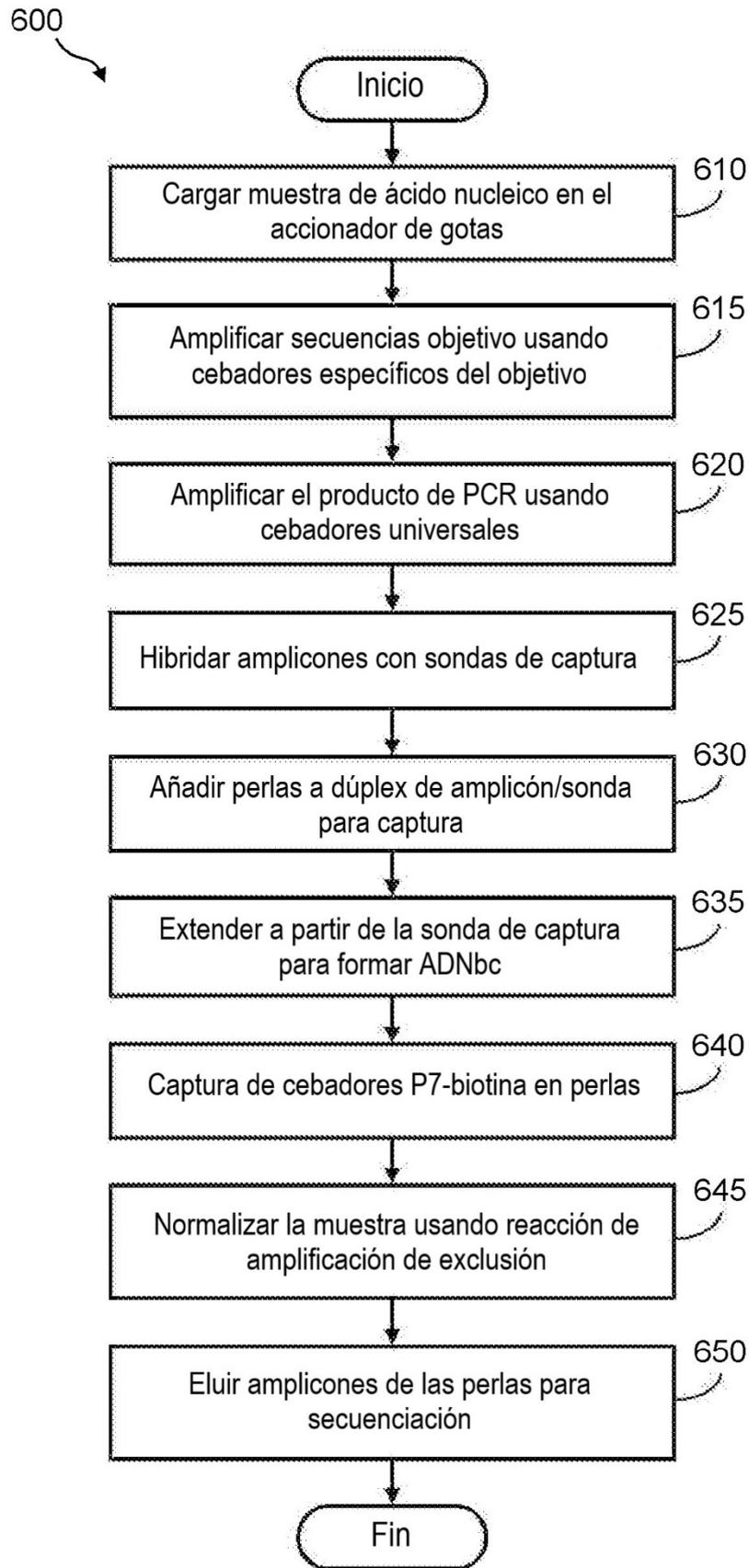


FIG. 6

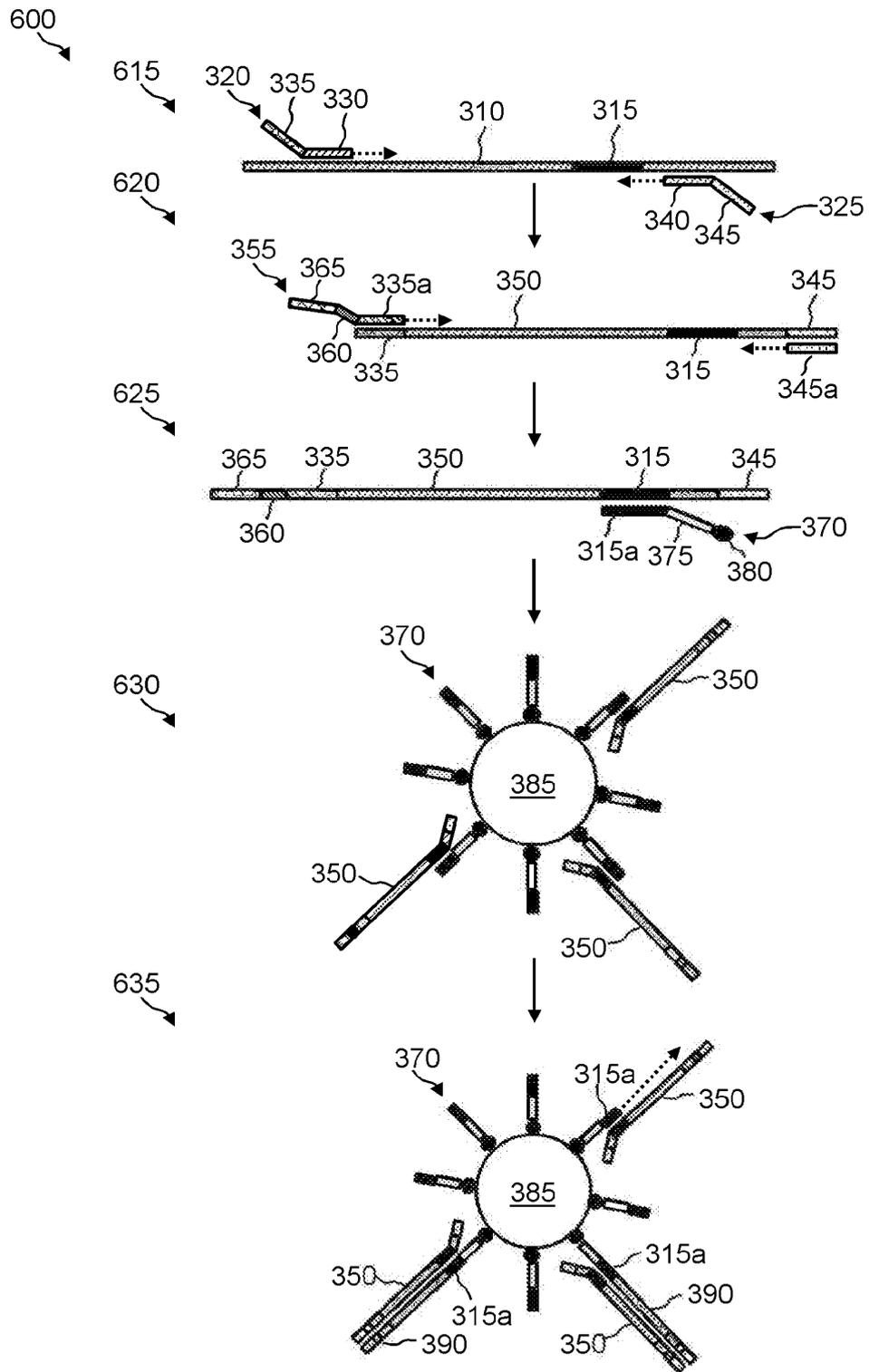


FIG. 7A

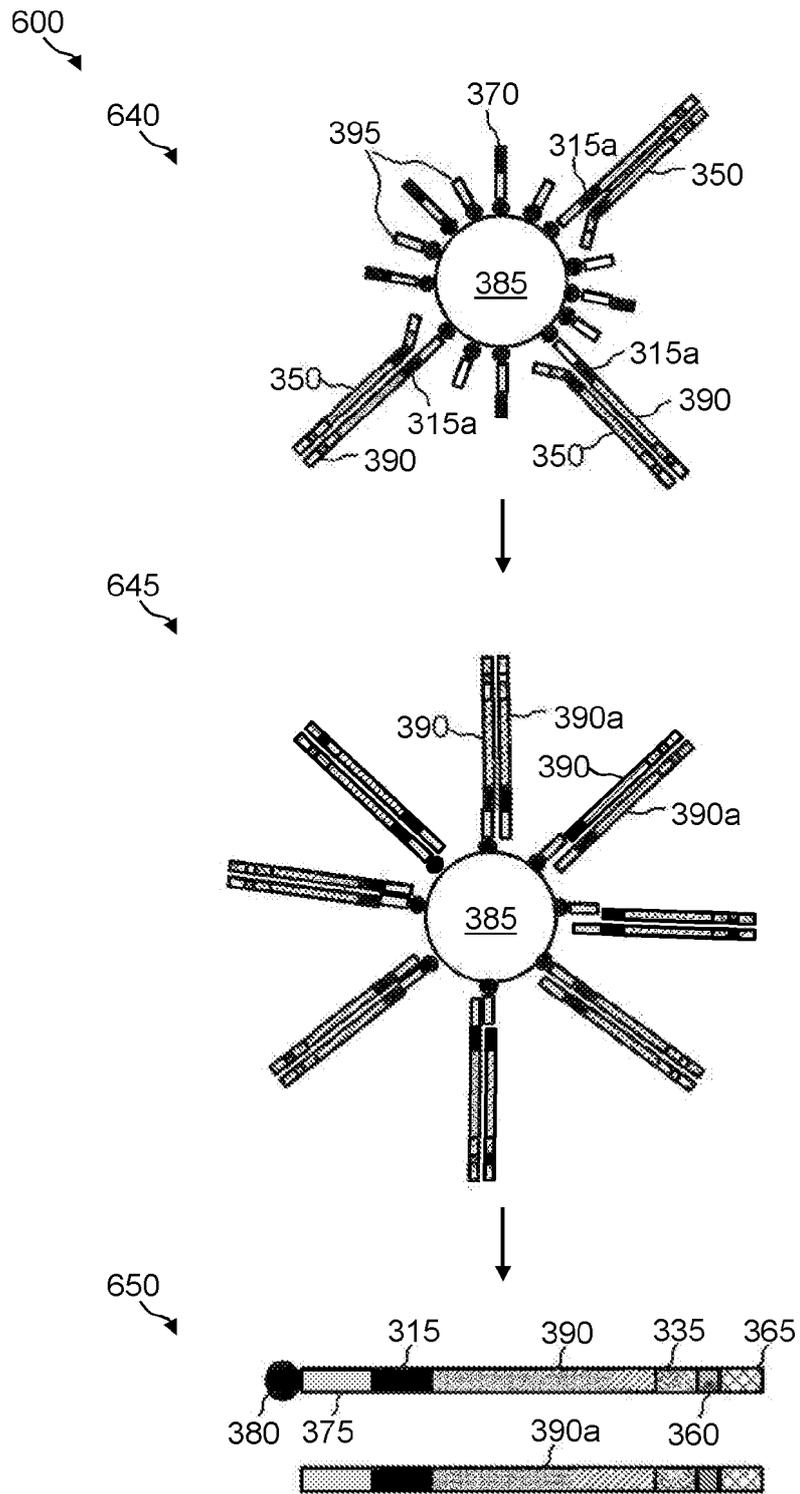


FIG. 7B

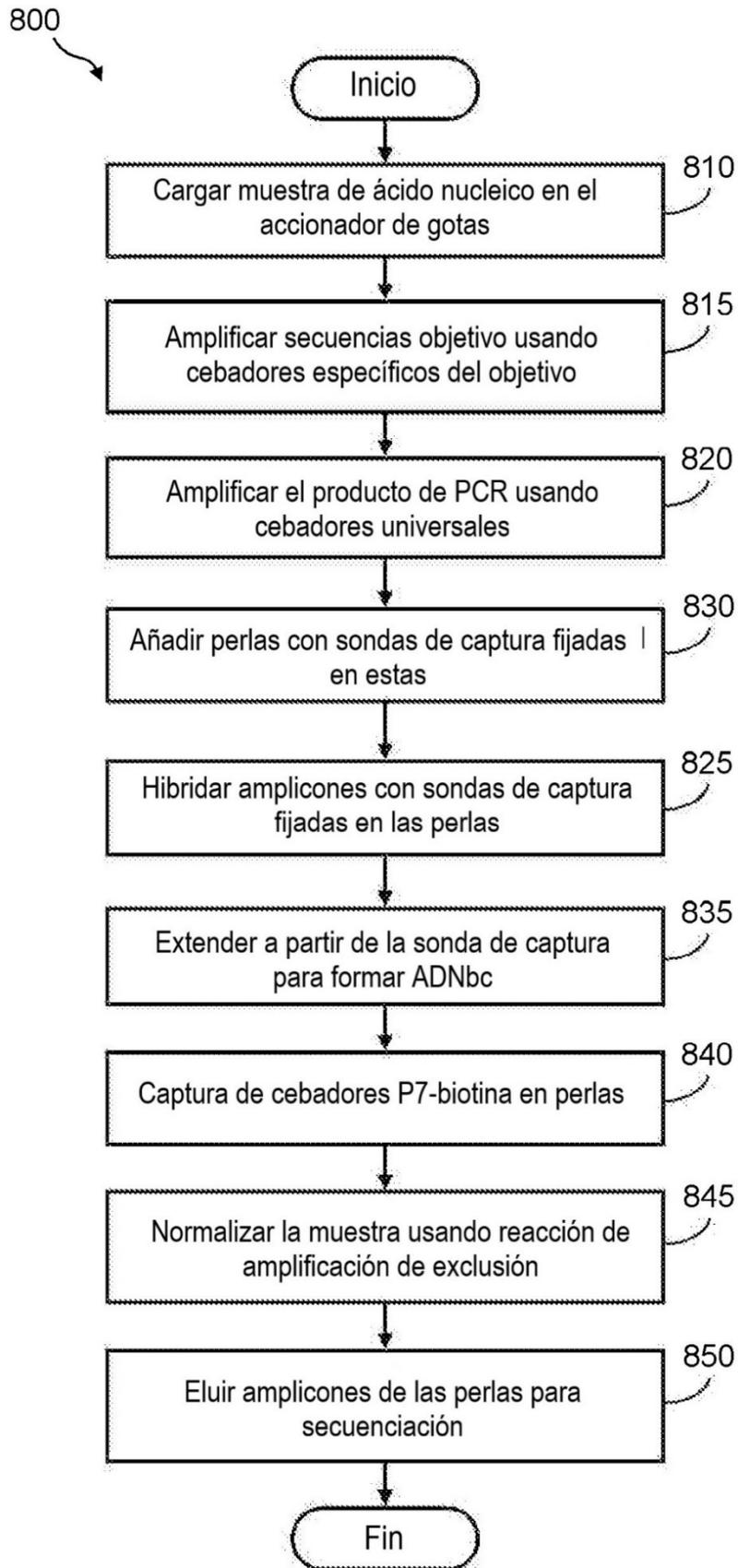


FIG. 8

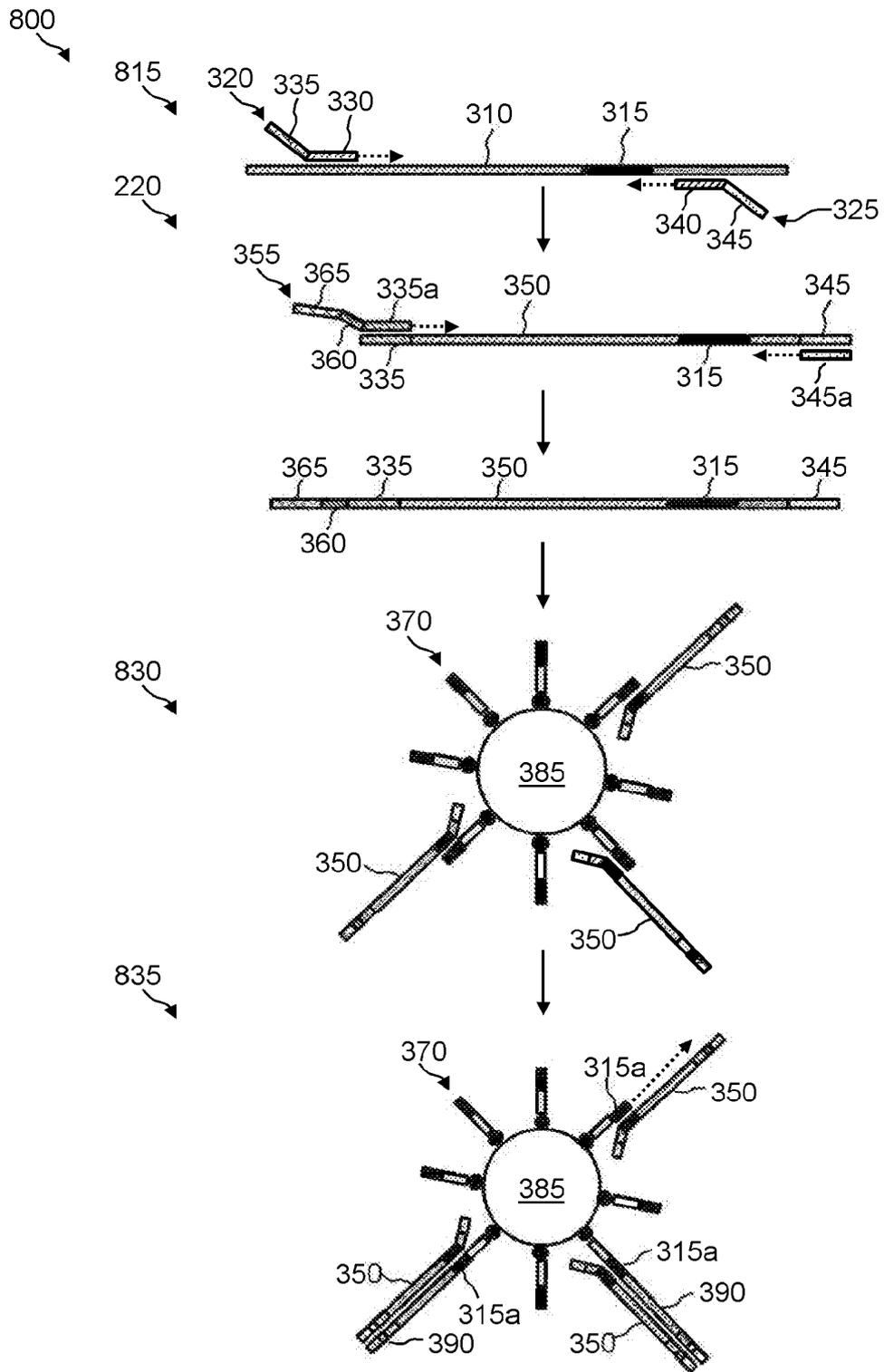


FIG. 9A

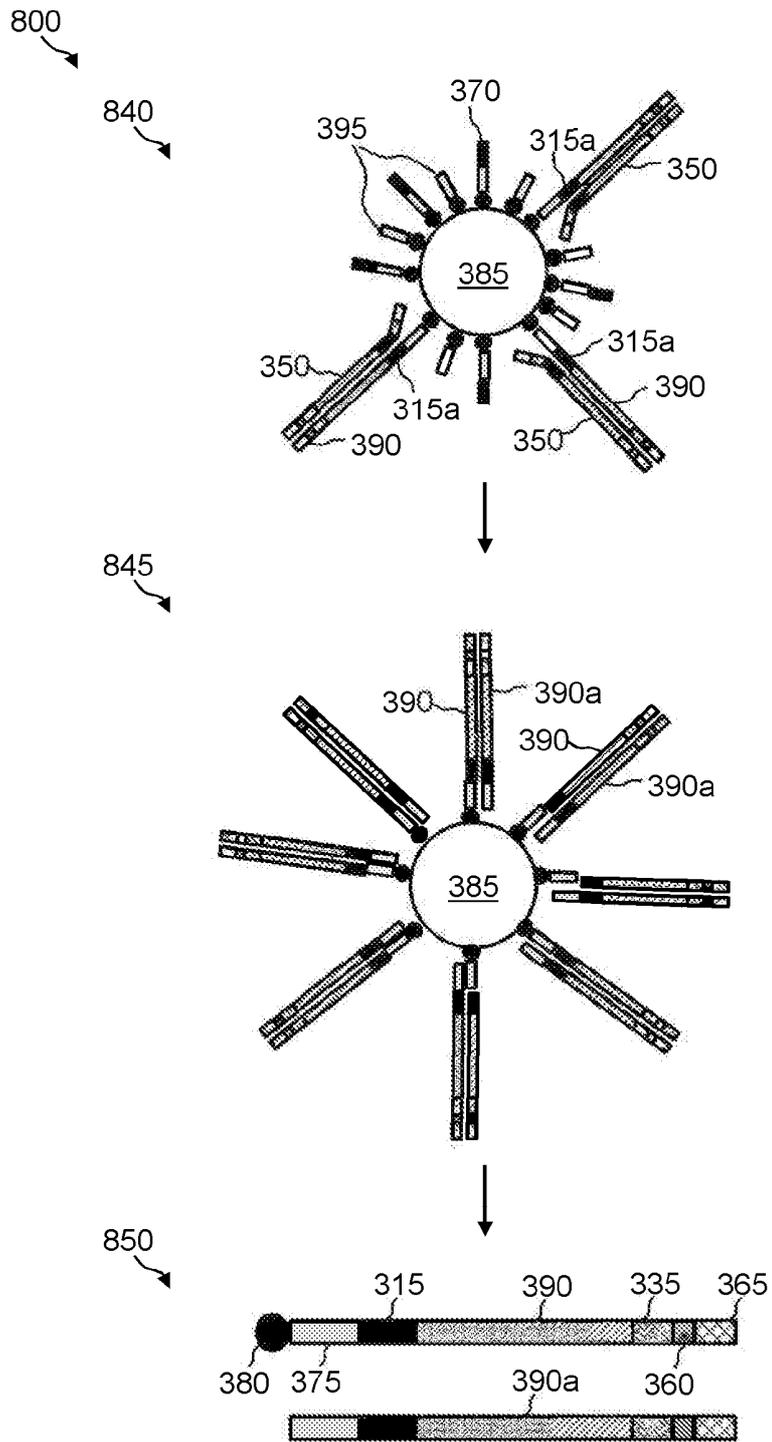


FIG. 9B

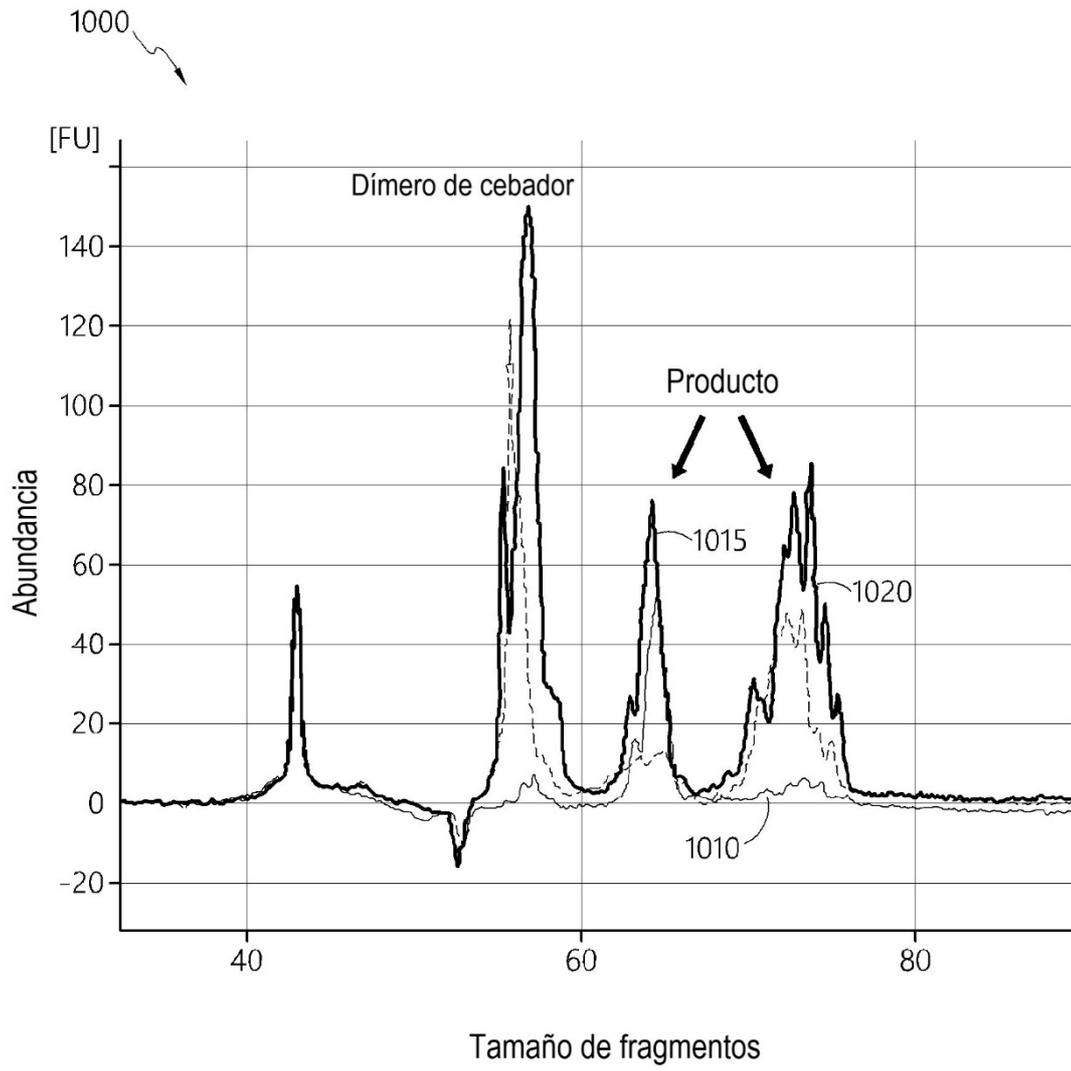


FIG. 10

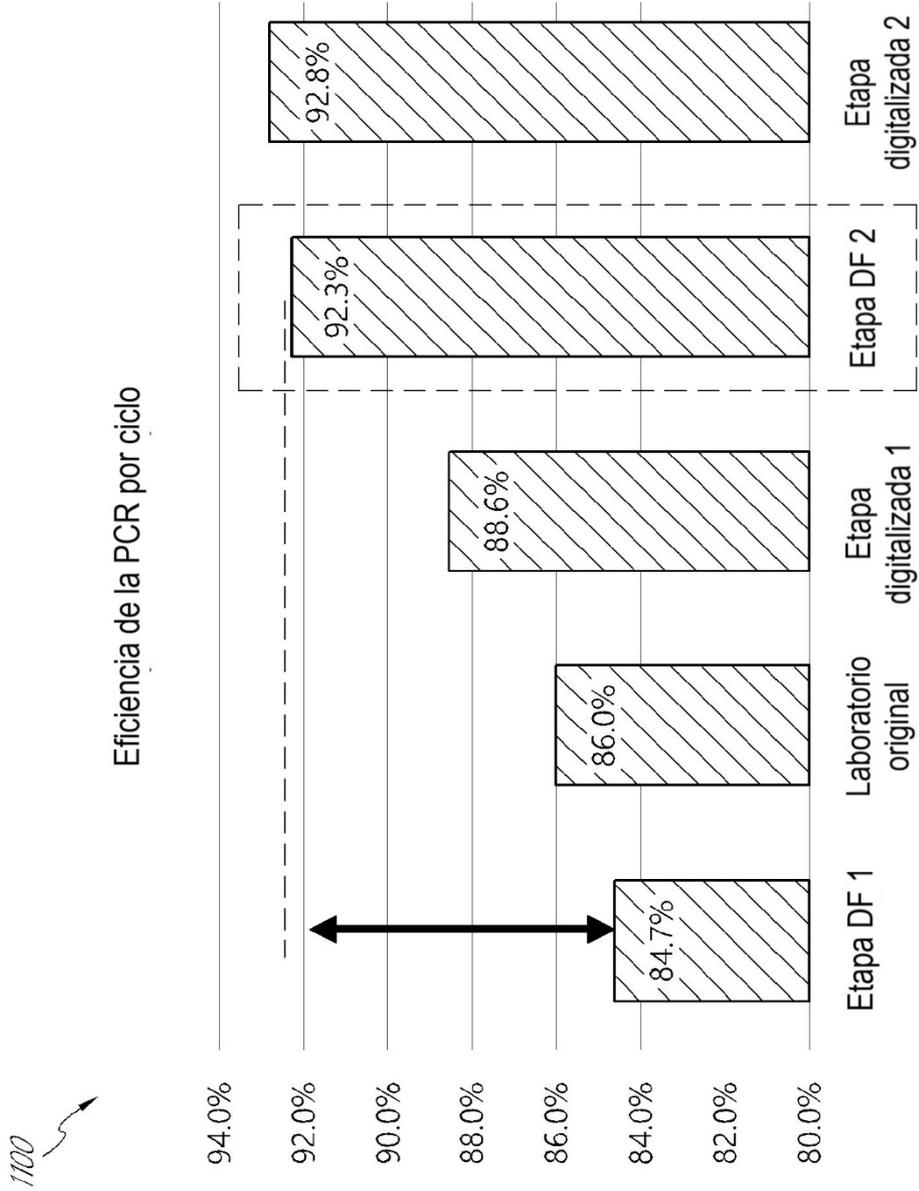


FIG. 11A

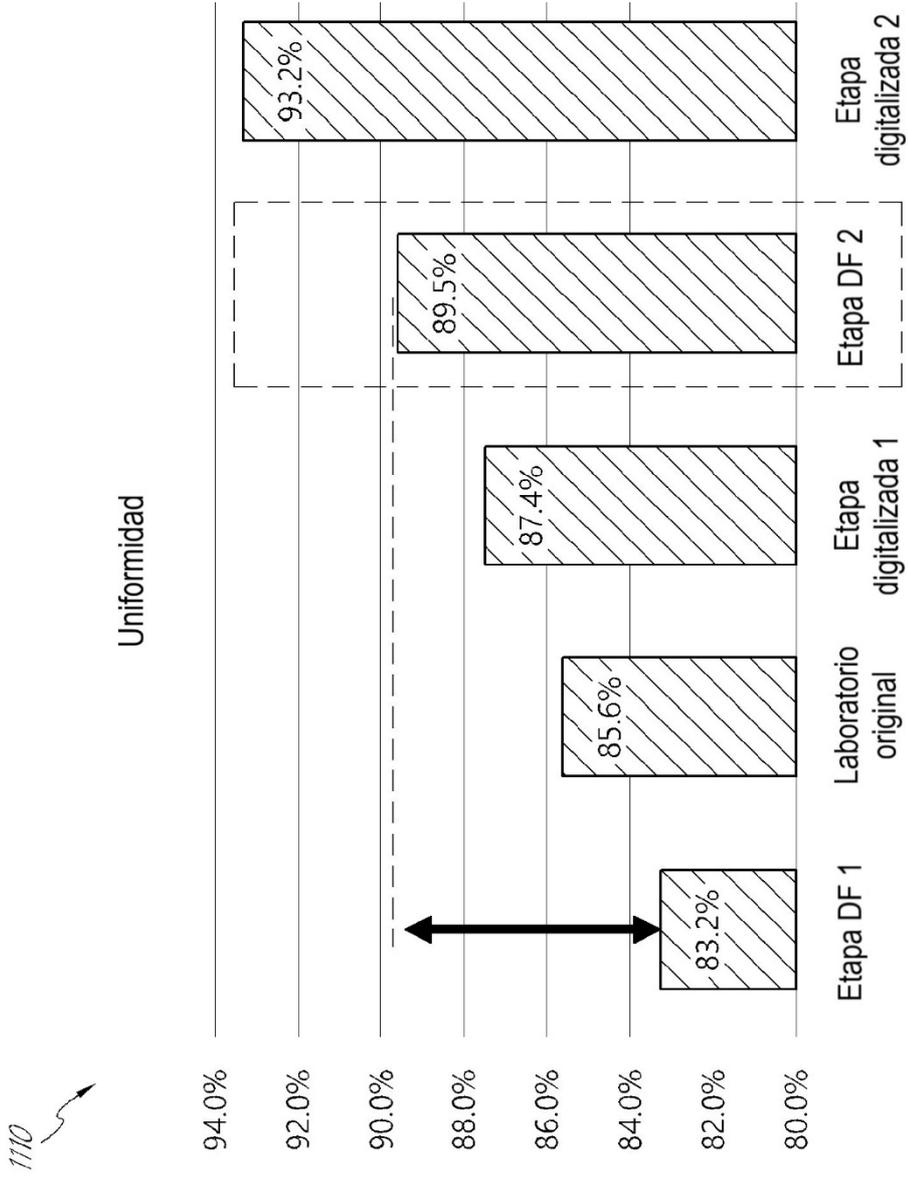


FIG. 11B

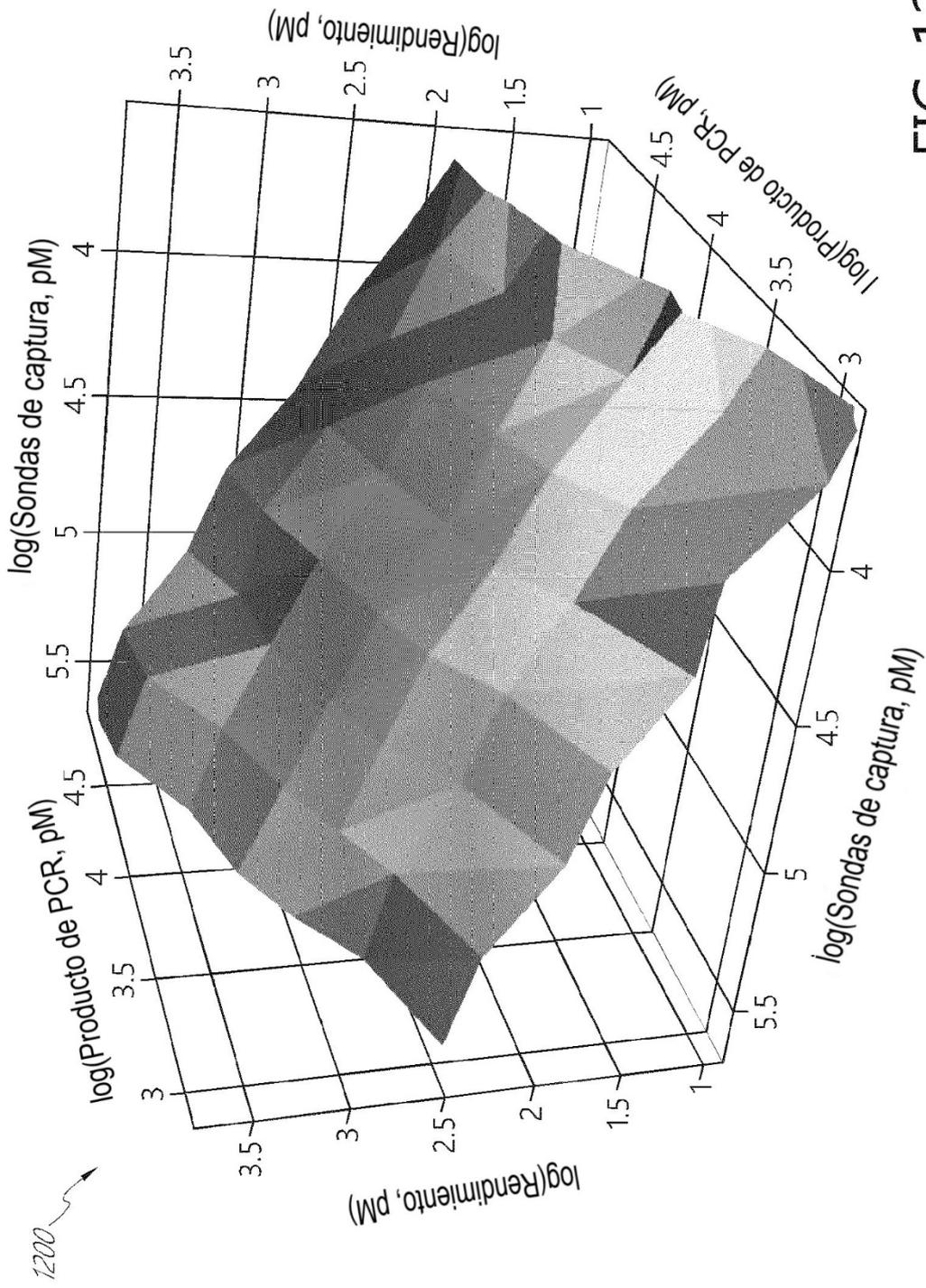


FIG. 12A

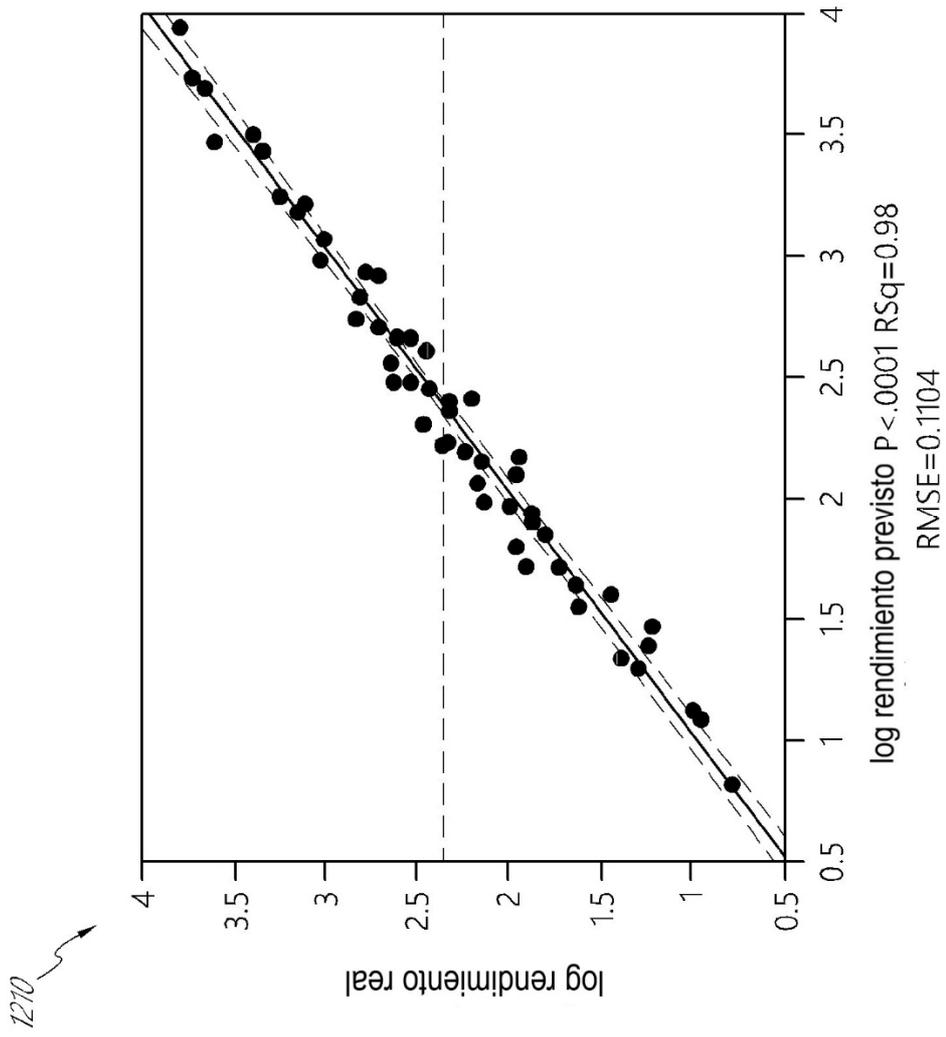


FIG. 12B

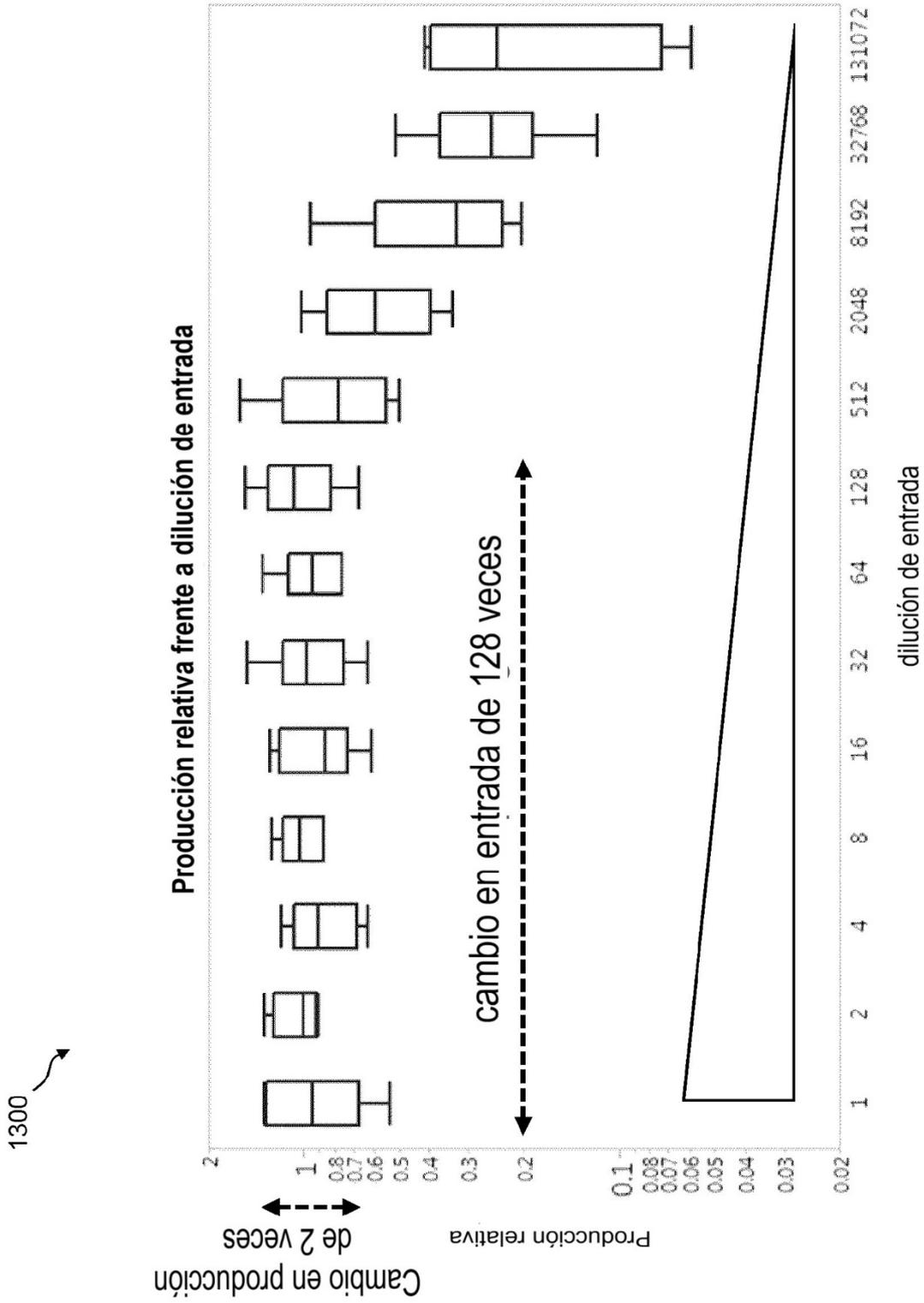


FIG. 13

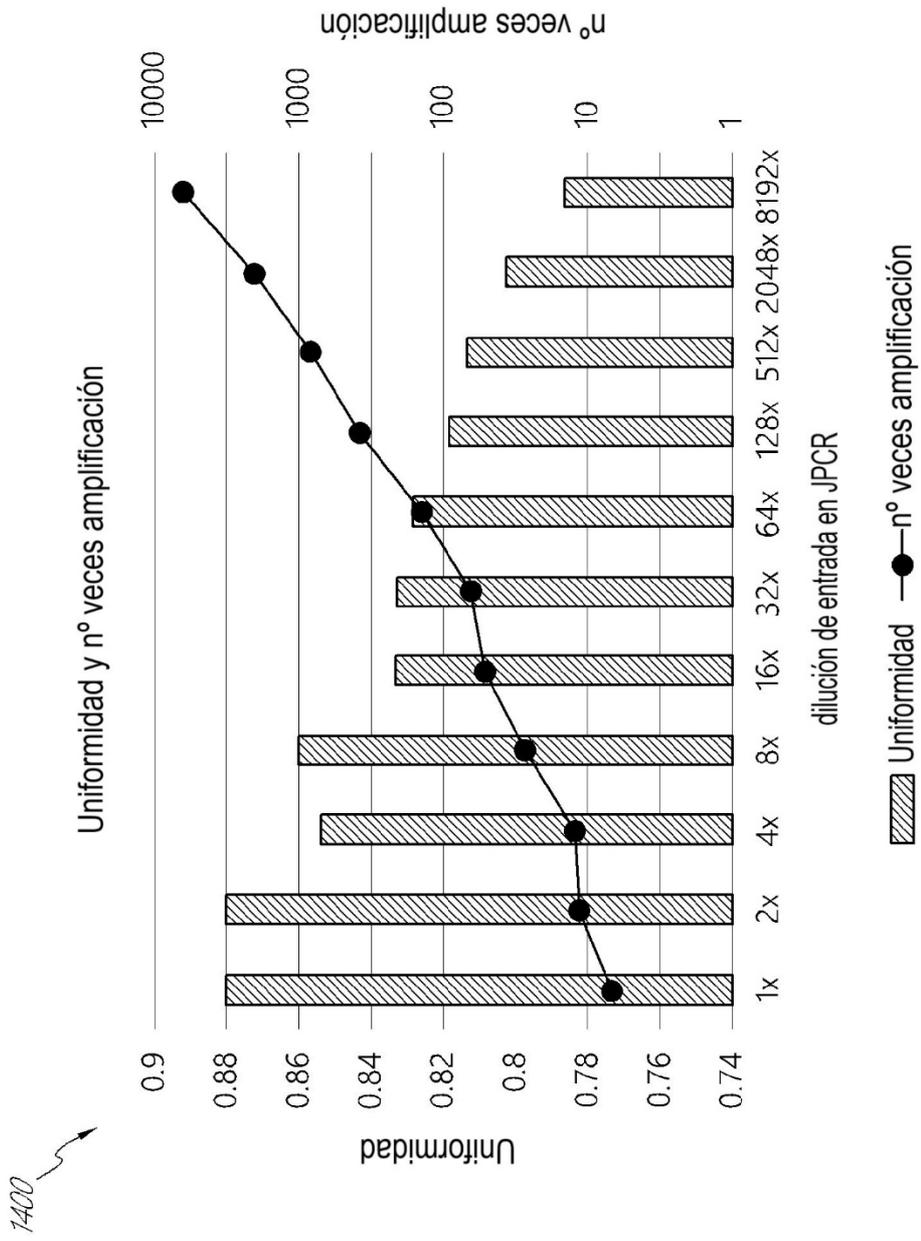


FIG. 14A

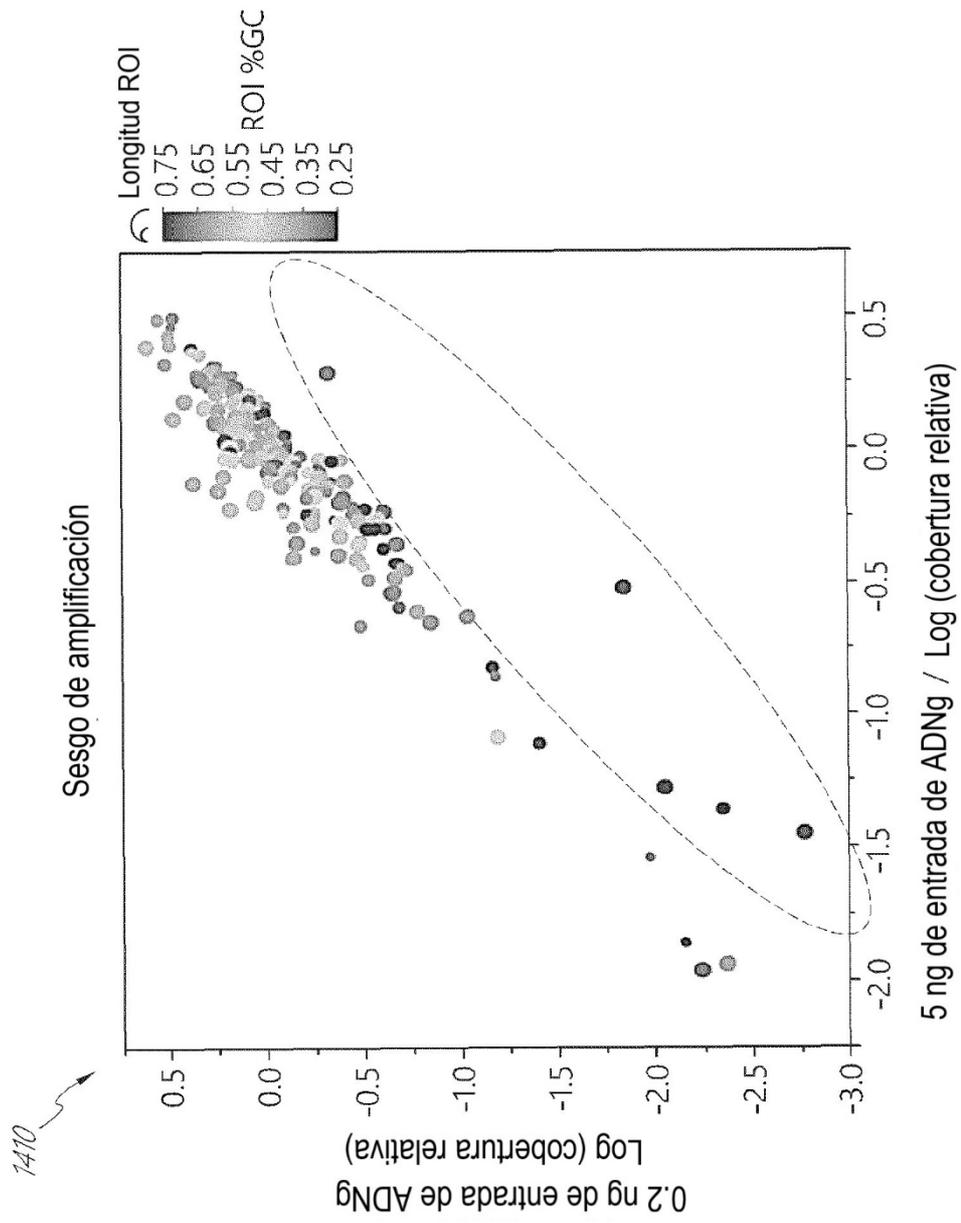


FIG. 14B

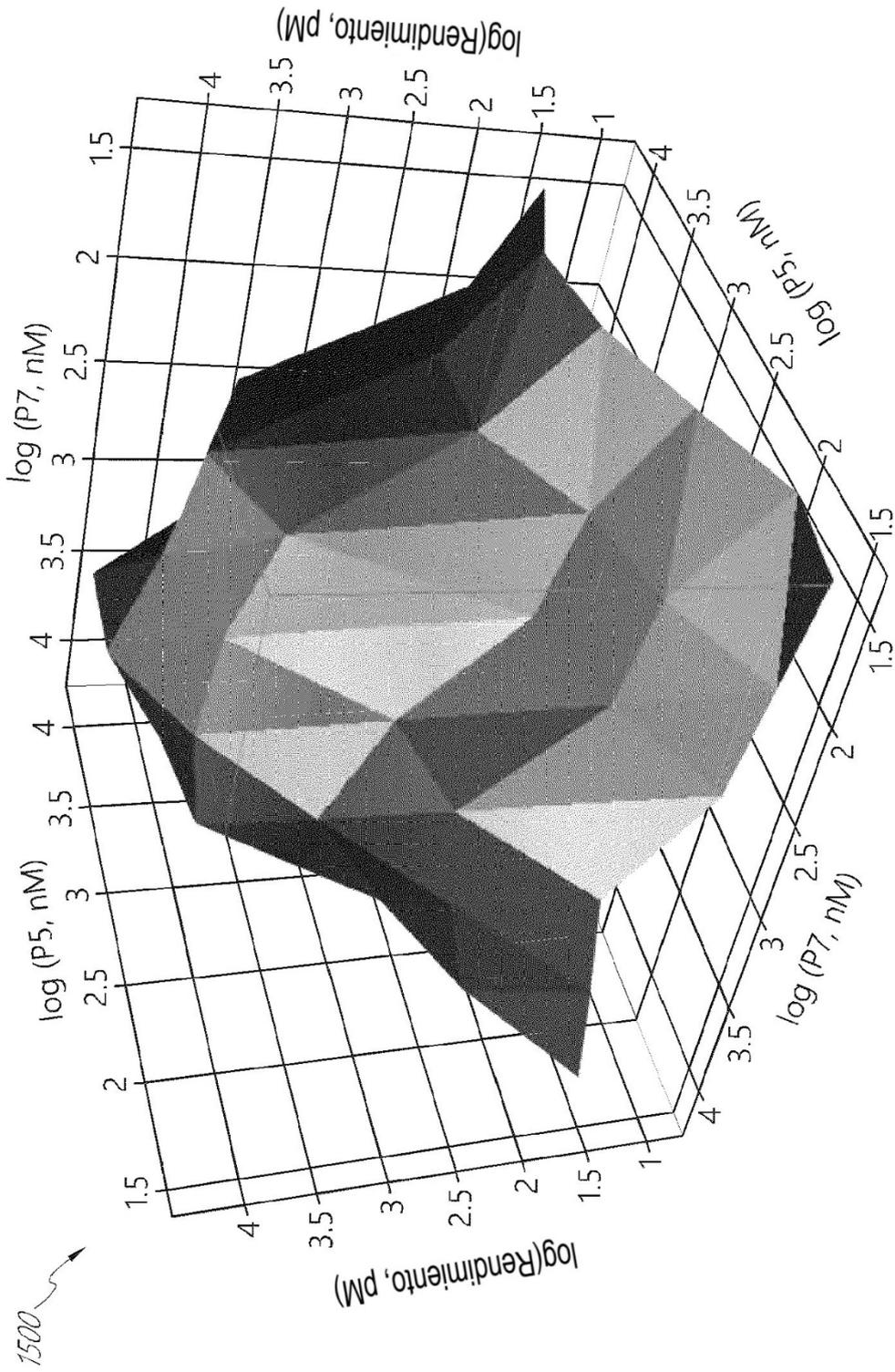


FIG. 15A

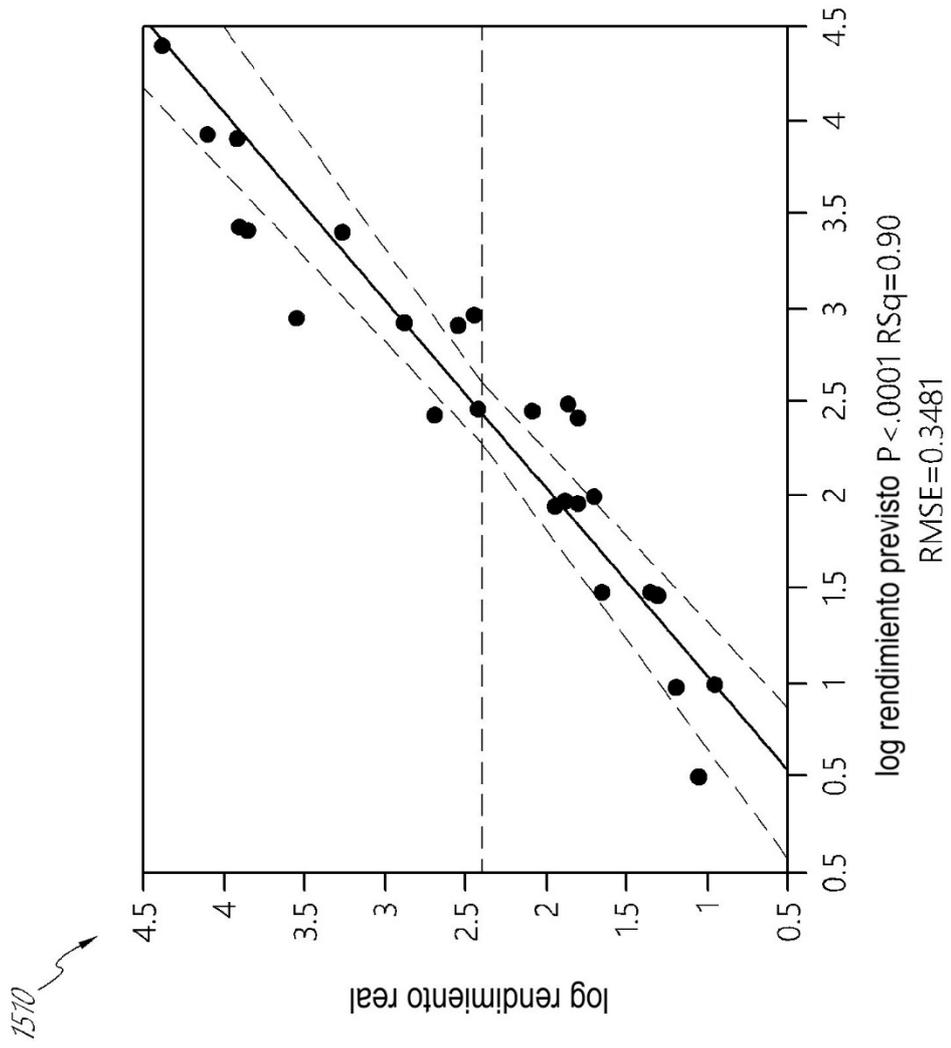


FIG. 155B

1600

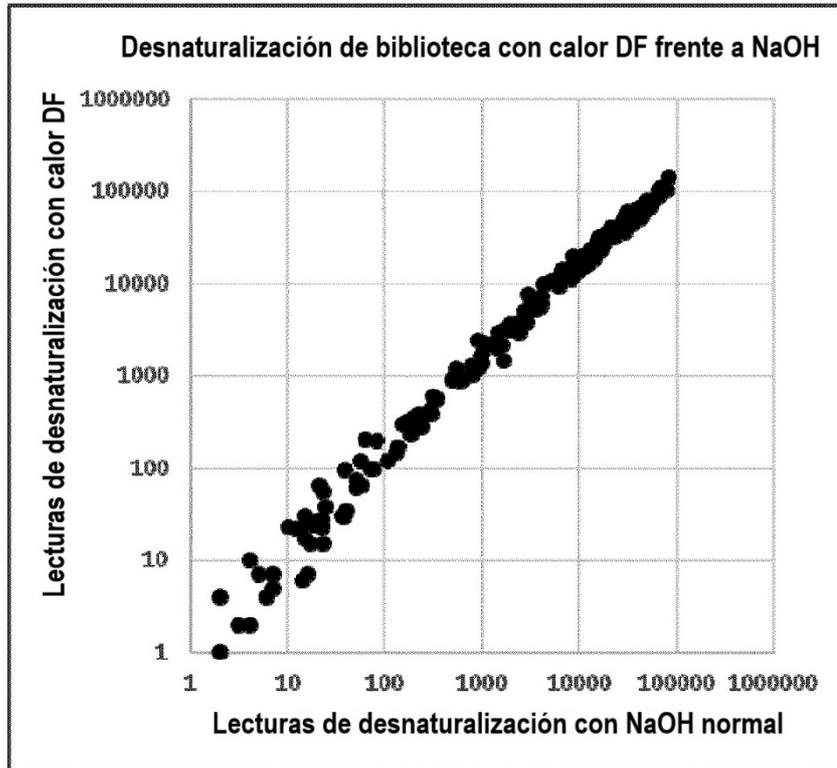


FIG. 16

1700 ↗

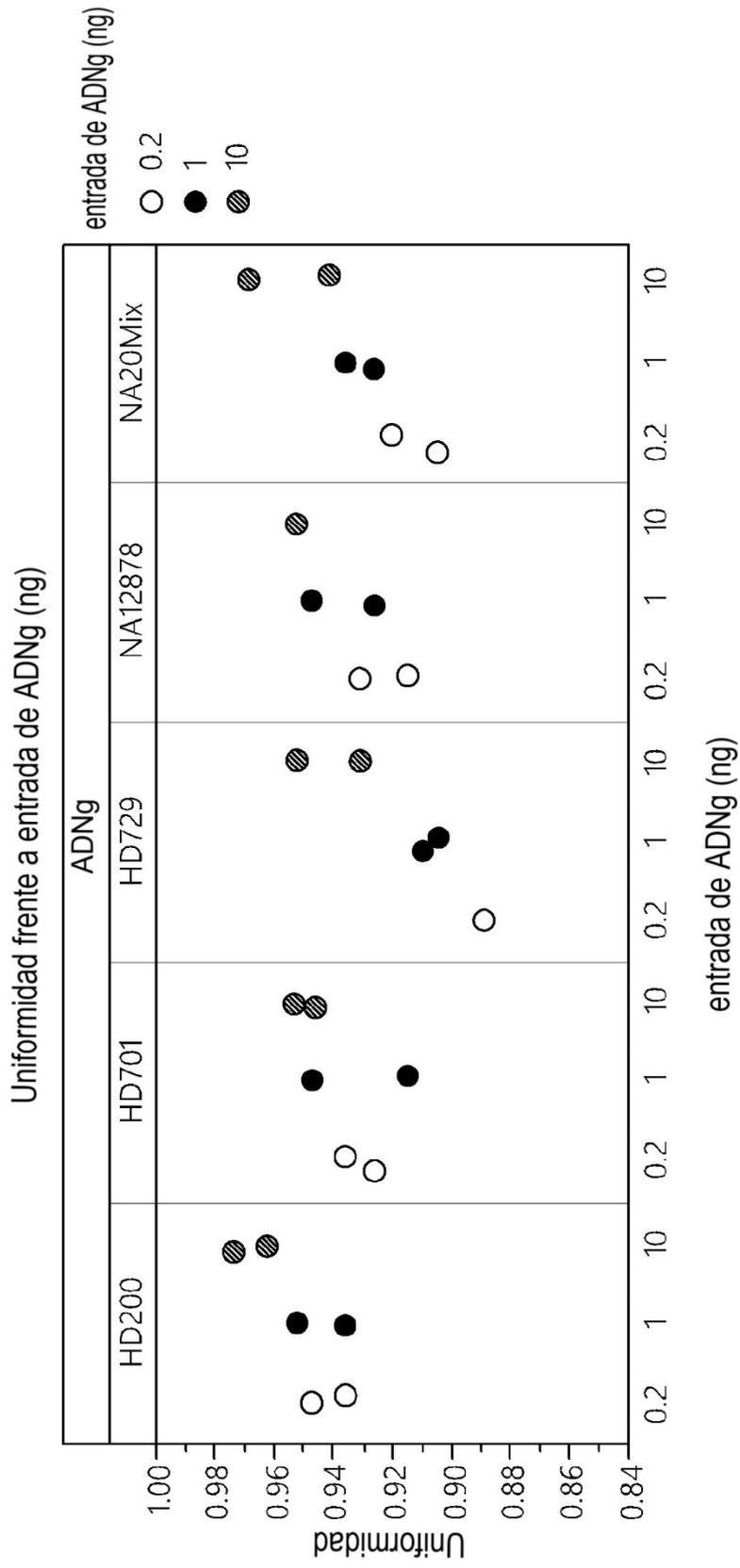


FIG. 17

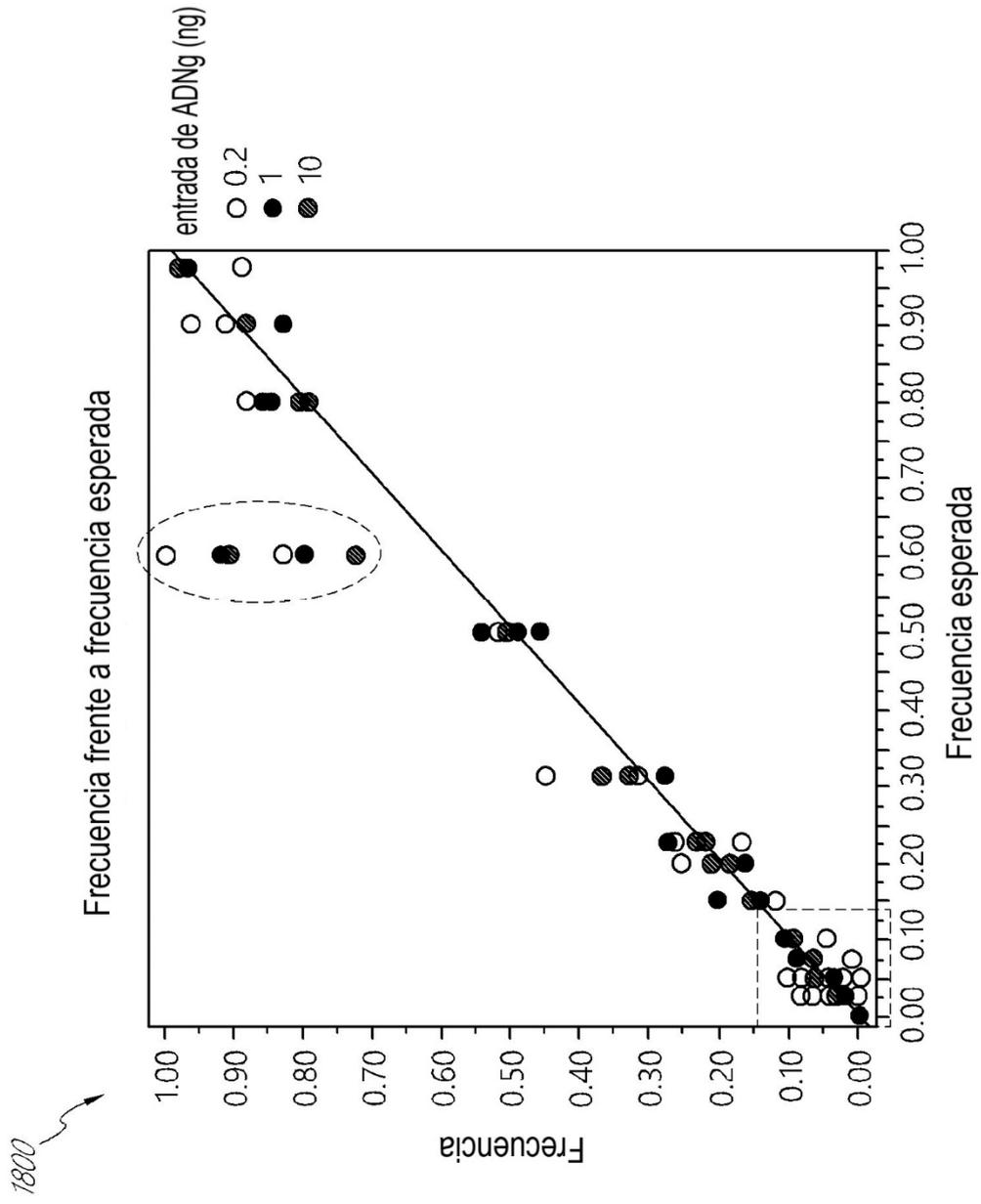


FIG. 18A

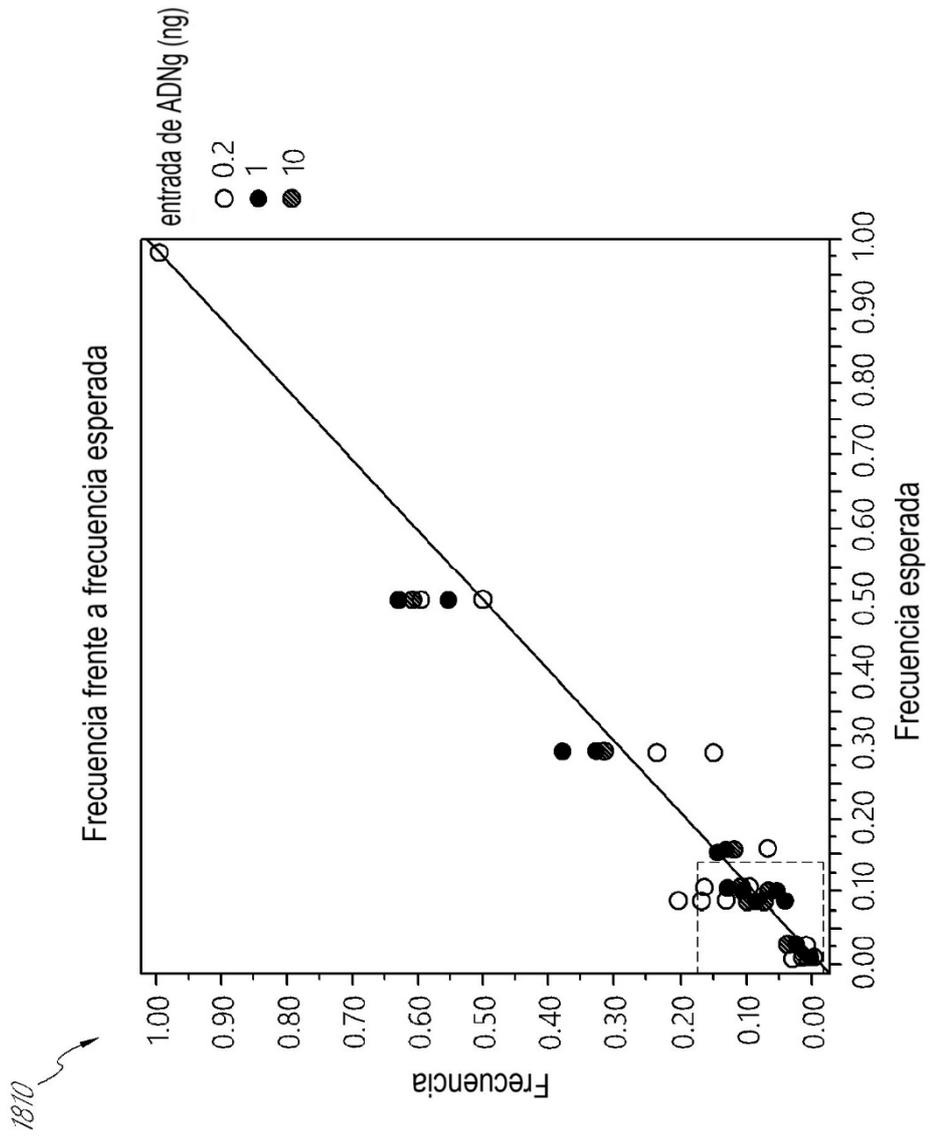


FIG. 18B

1910

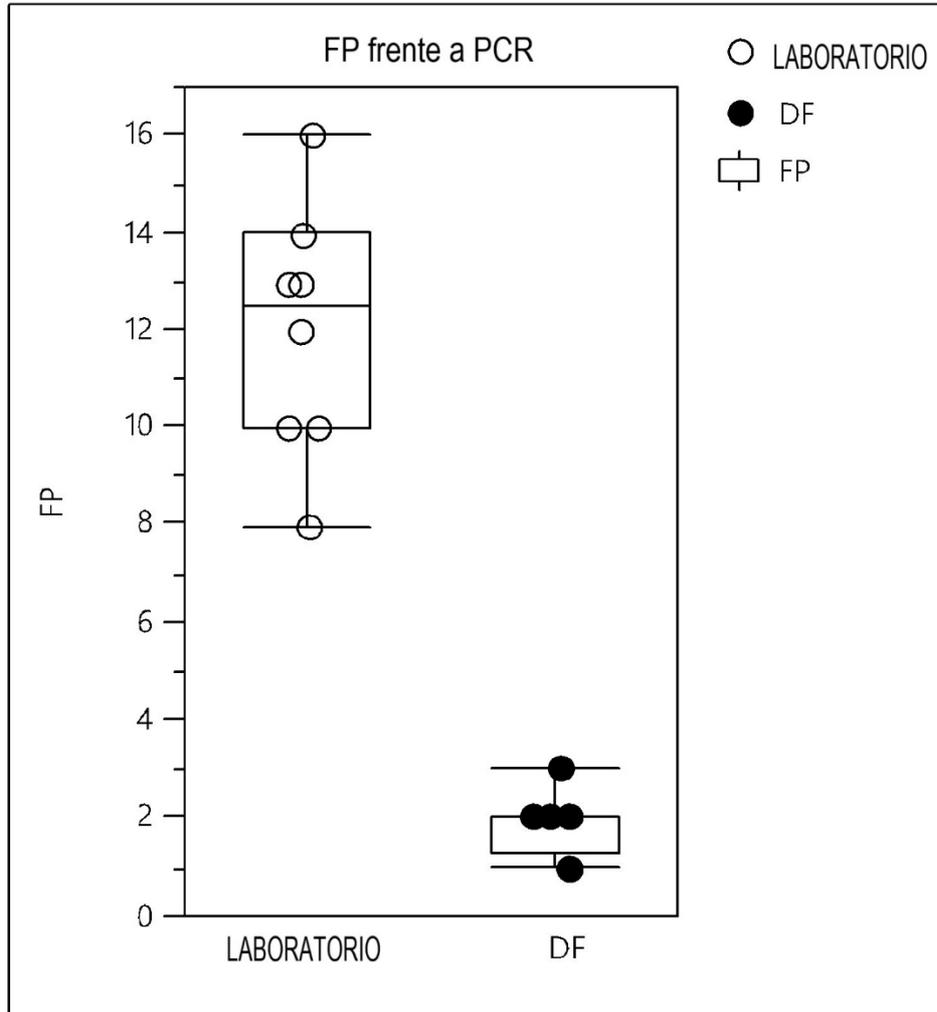


FIG. 19B

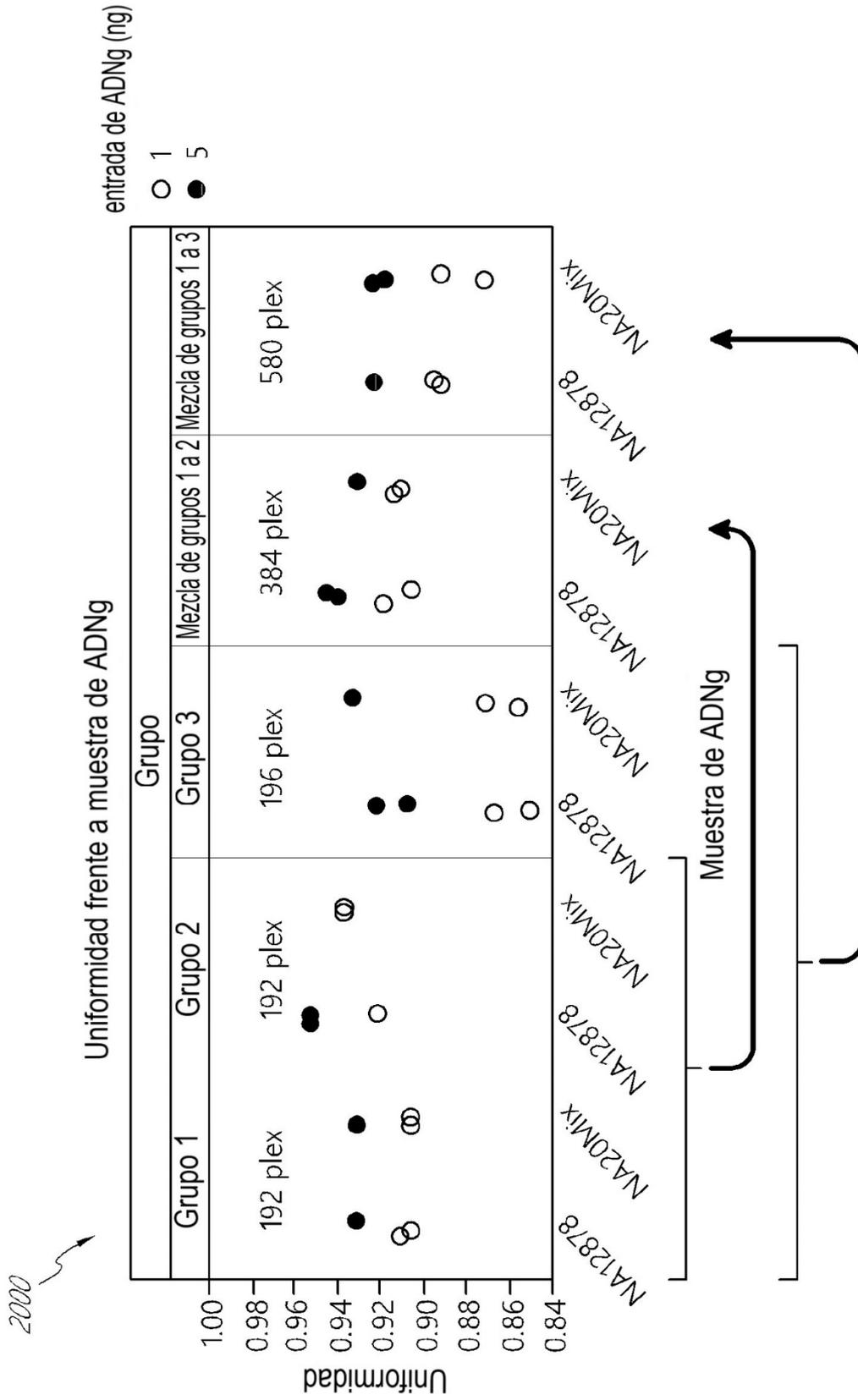


FIG. 20

FIG. 21A

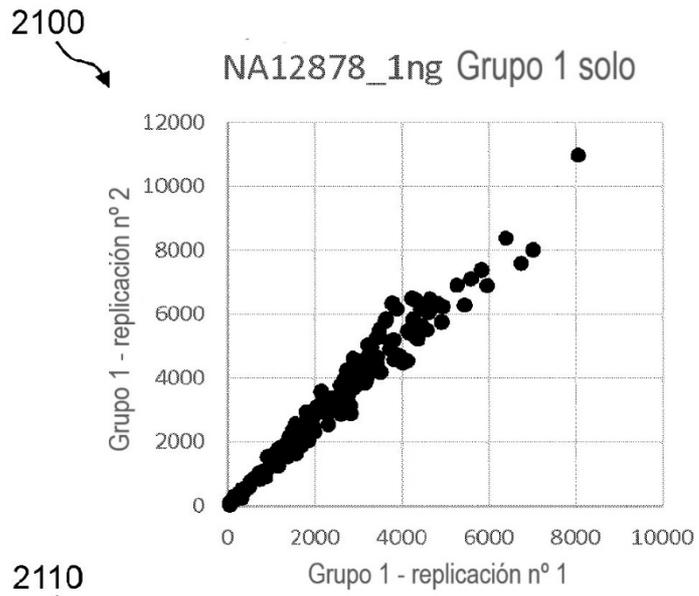


FIG. 21B

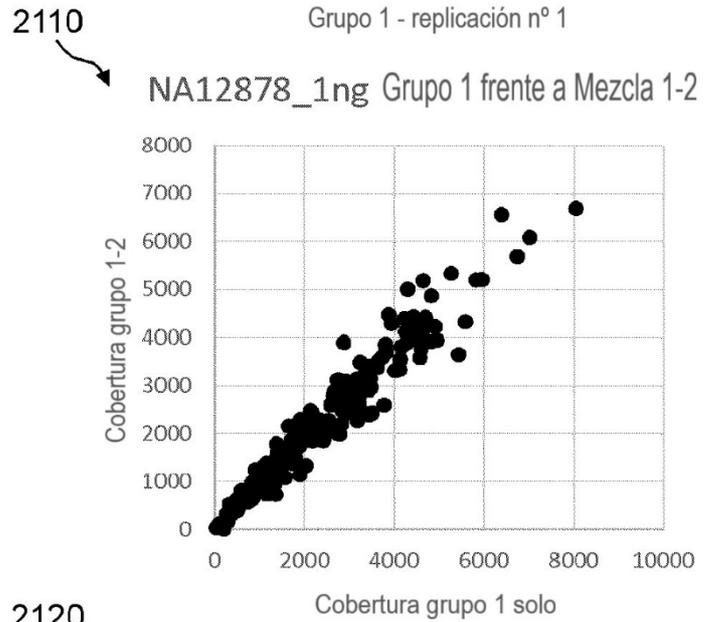
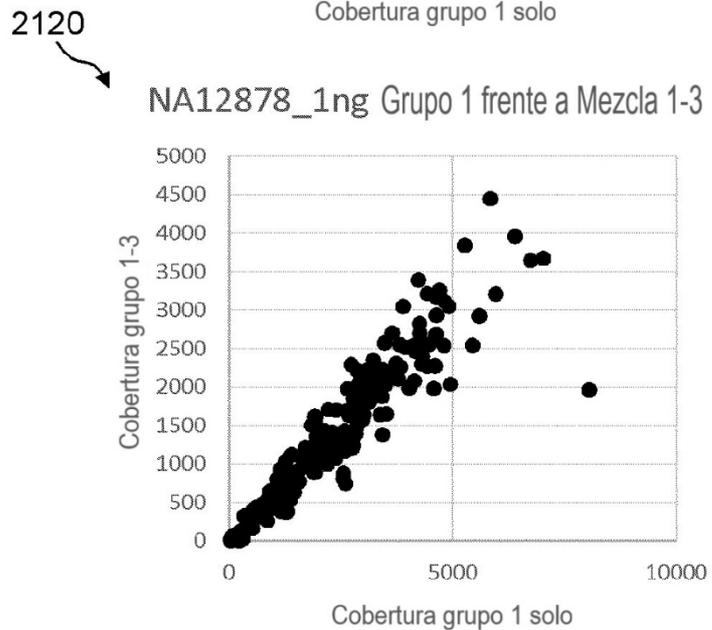


FIG. 21C



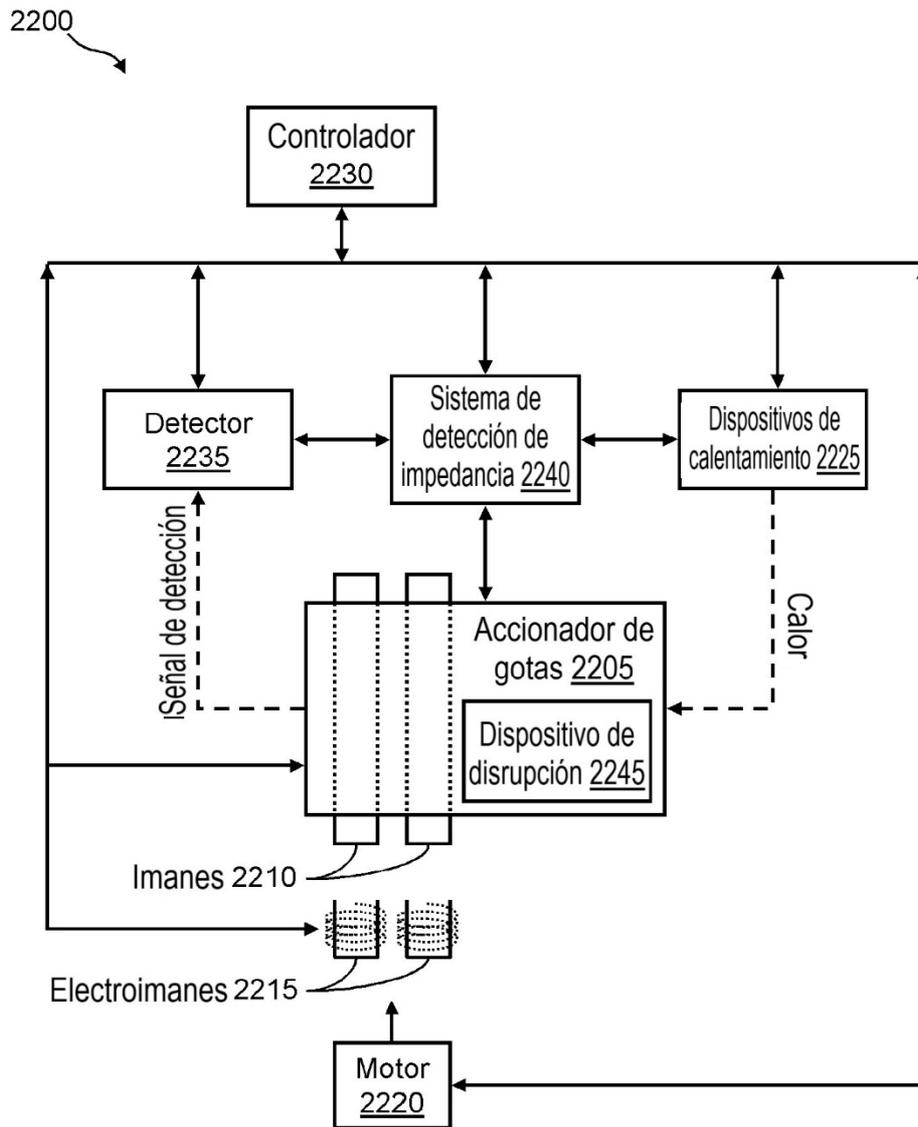


FIG. 22

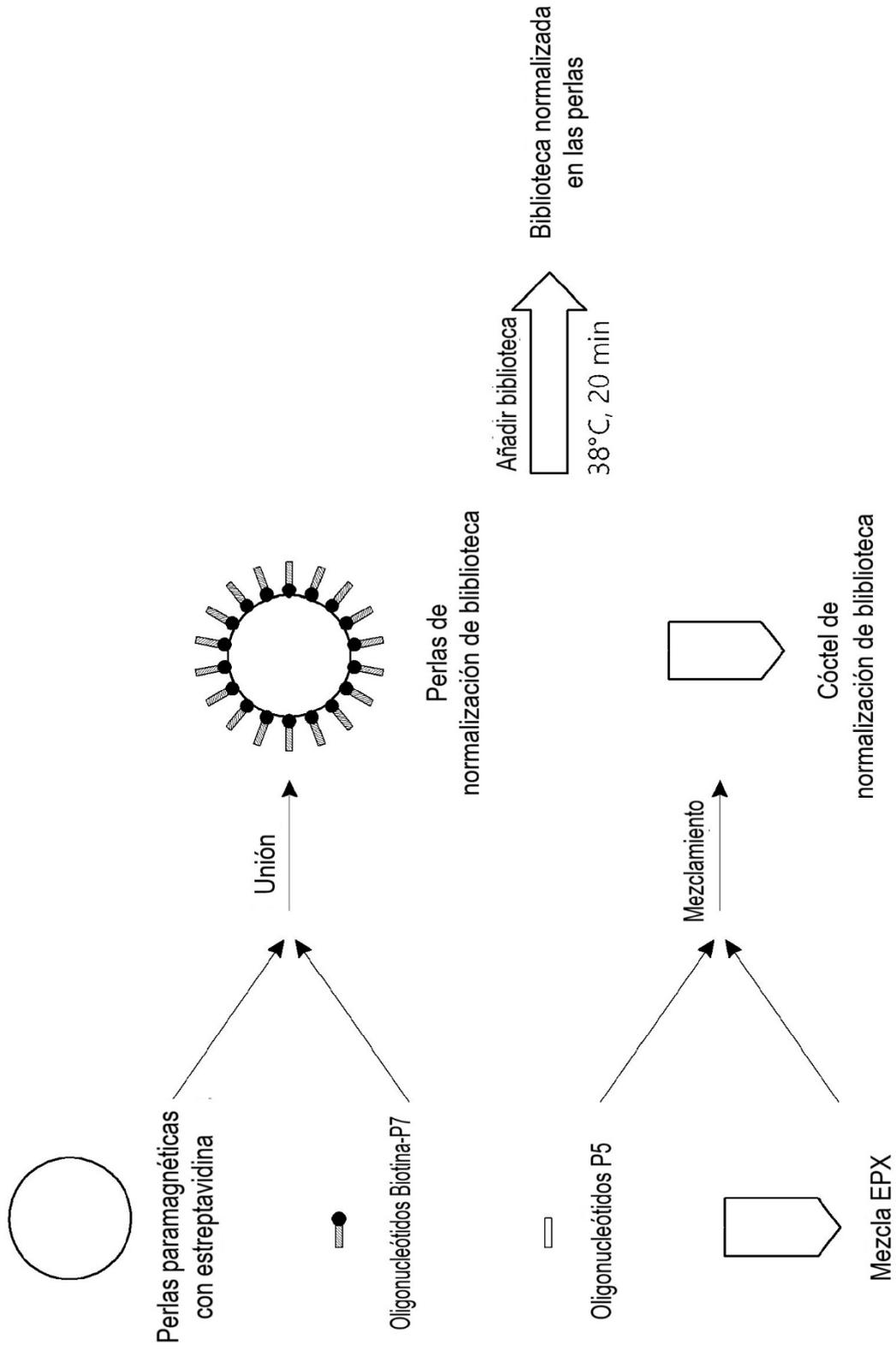


FIG. 23

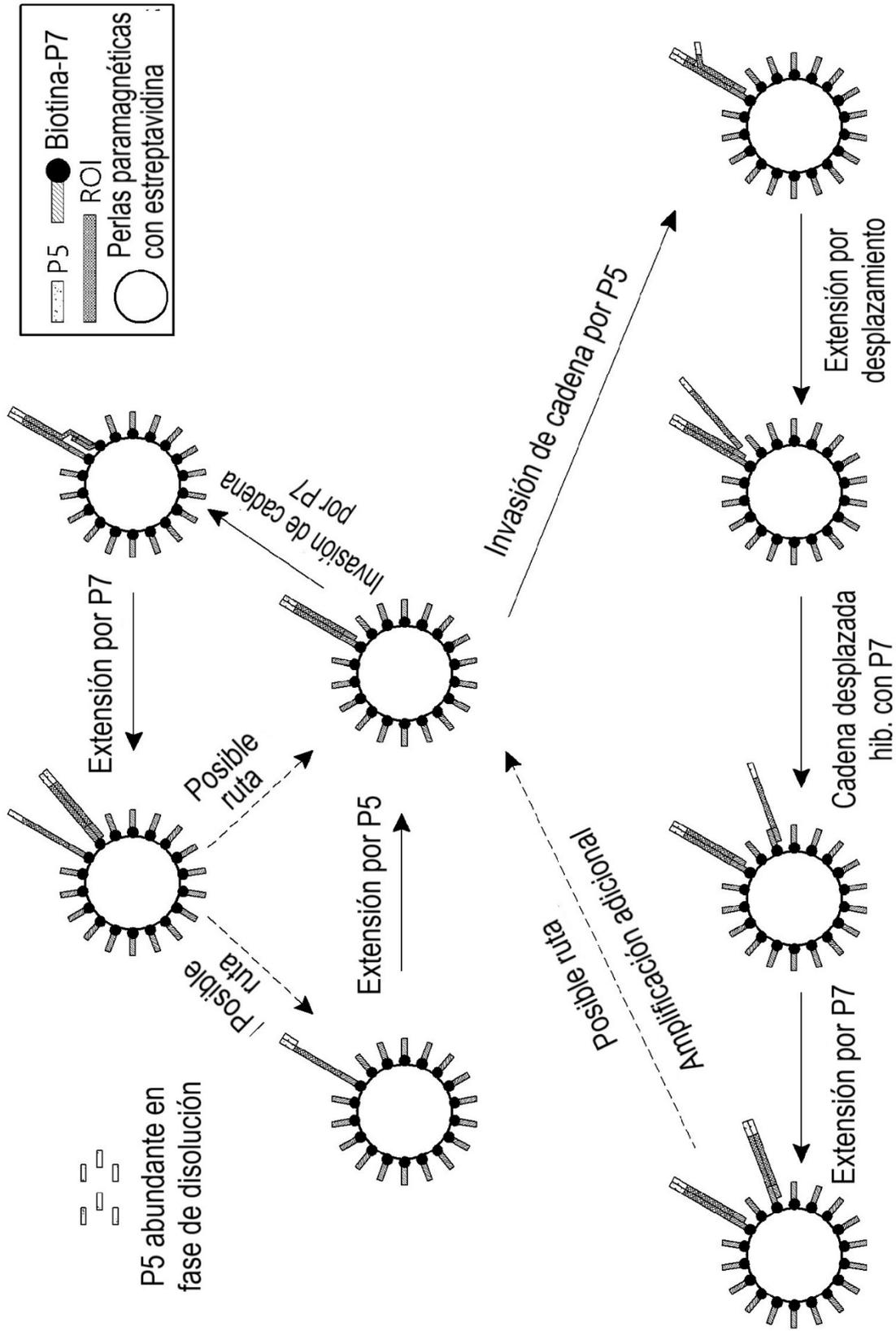


FIG. 24

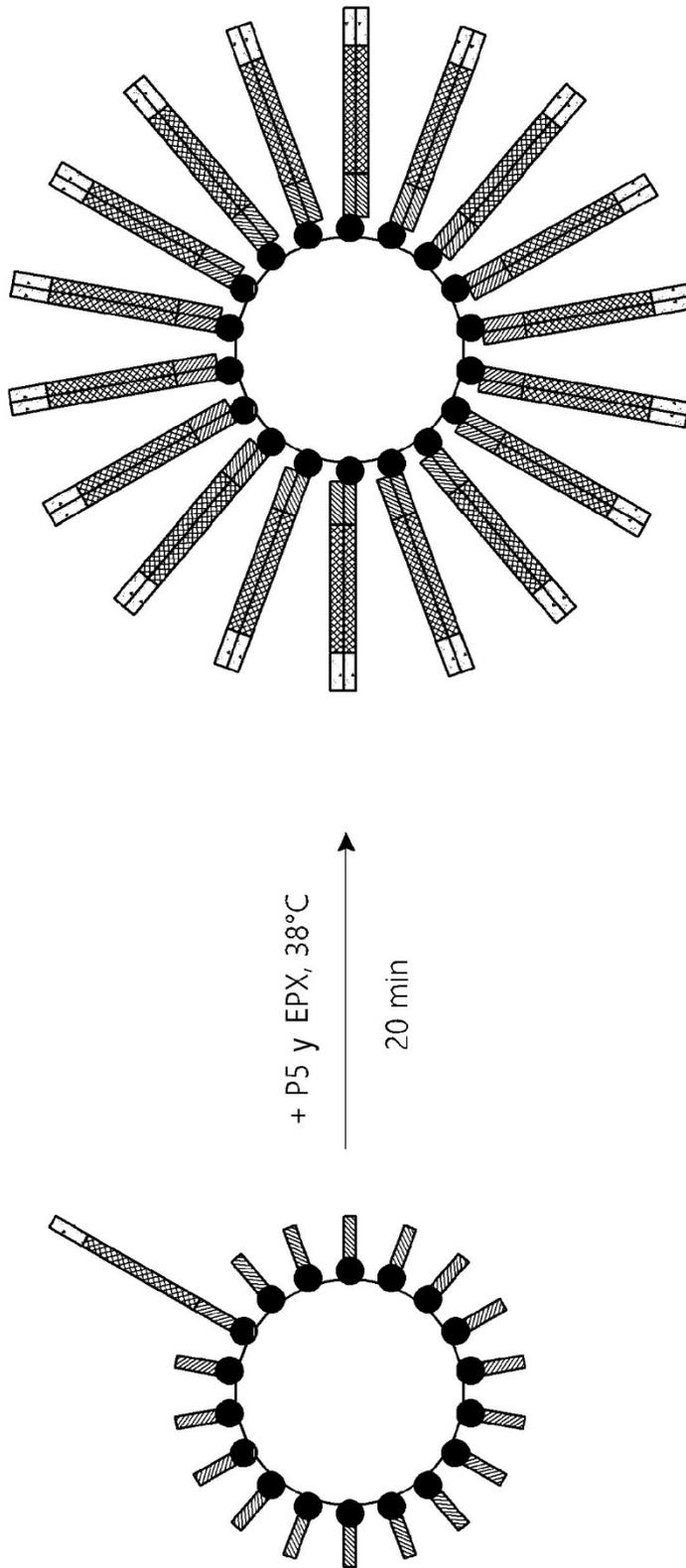


FIG. 25

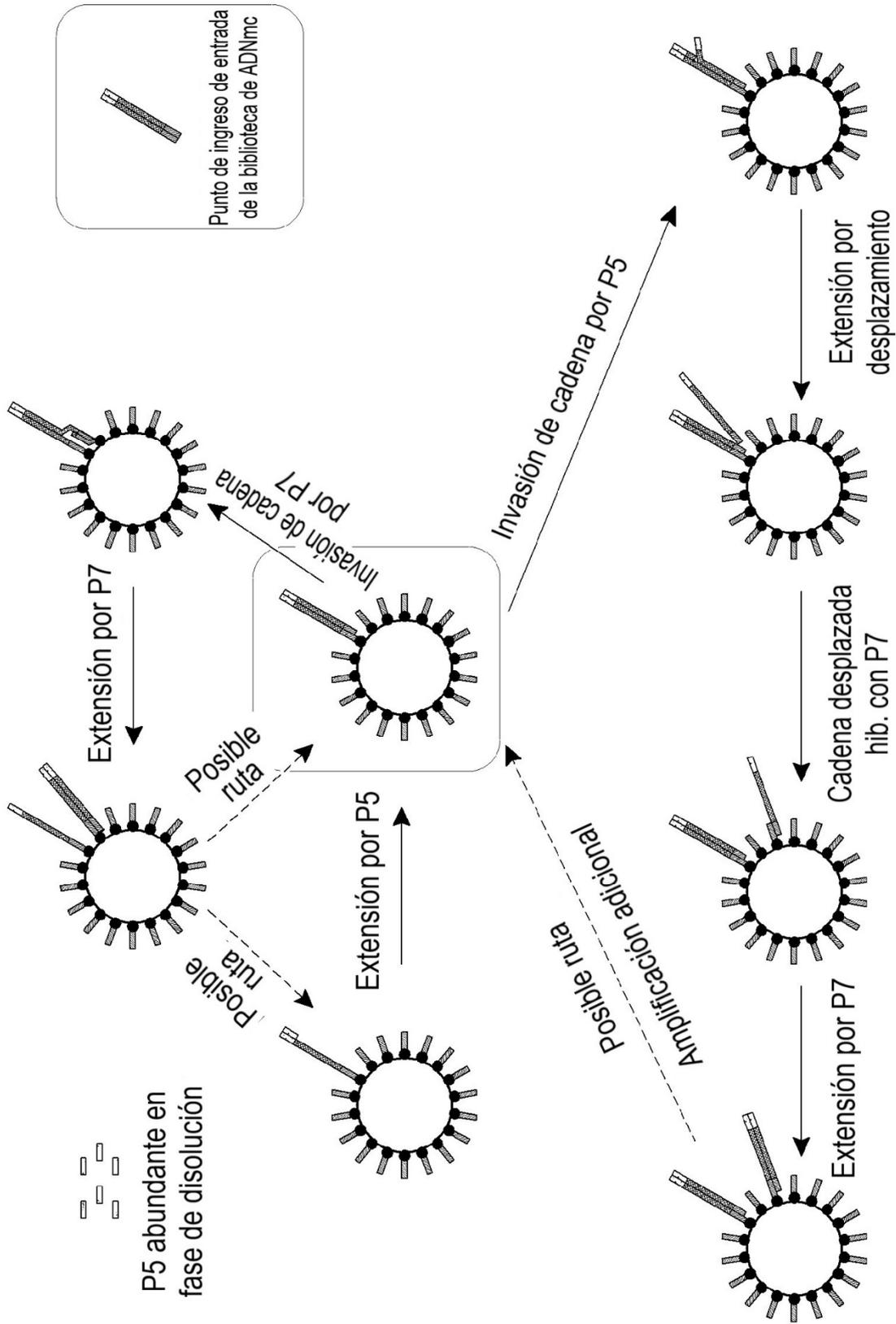


FIG. 26

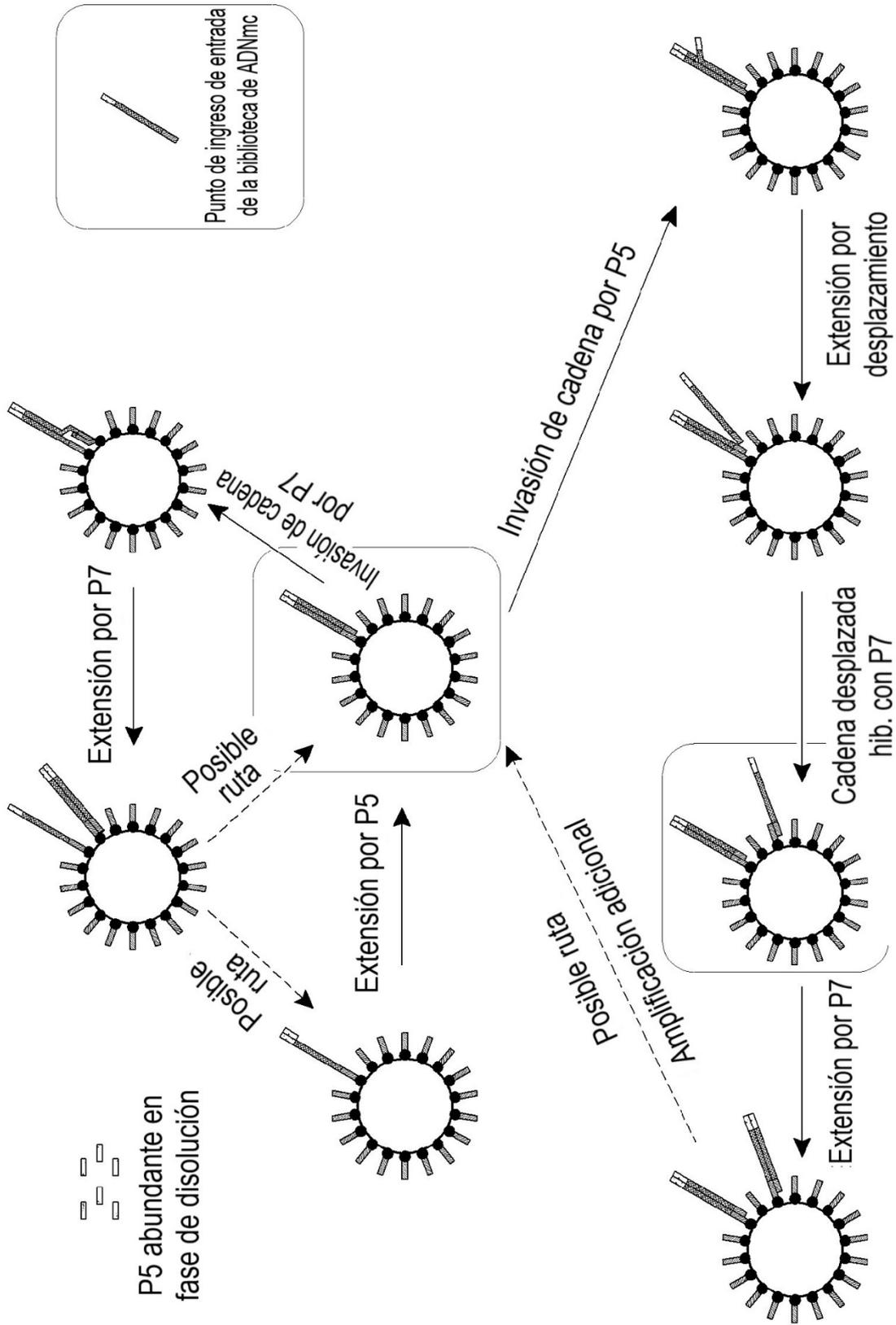


FIG. 27

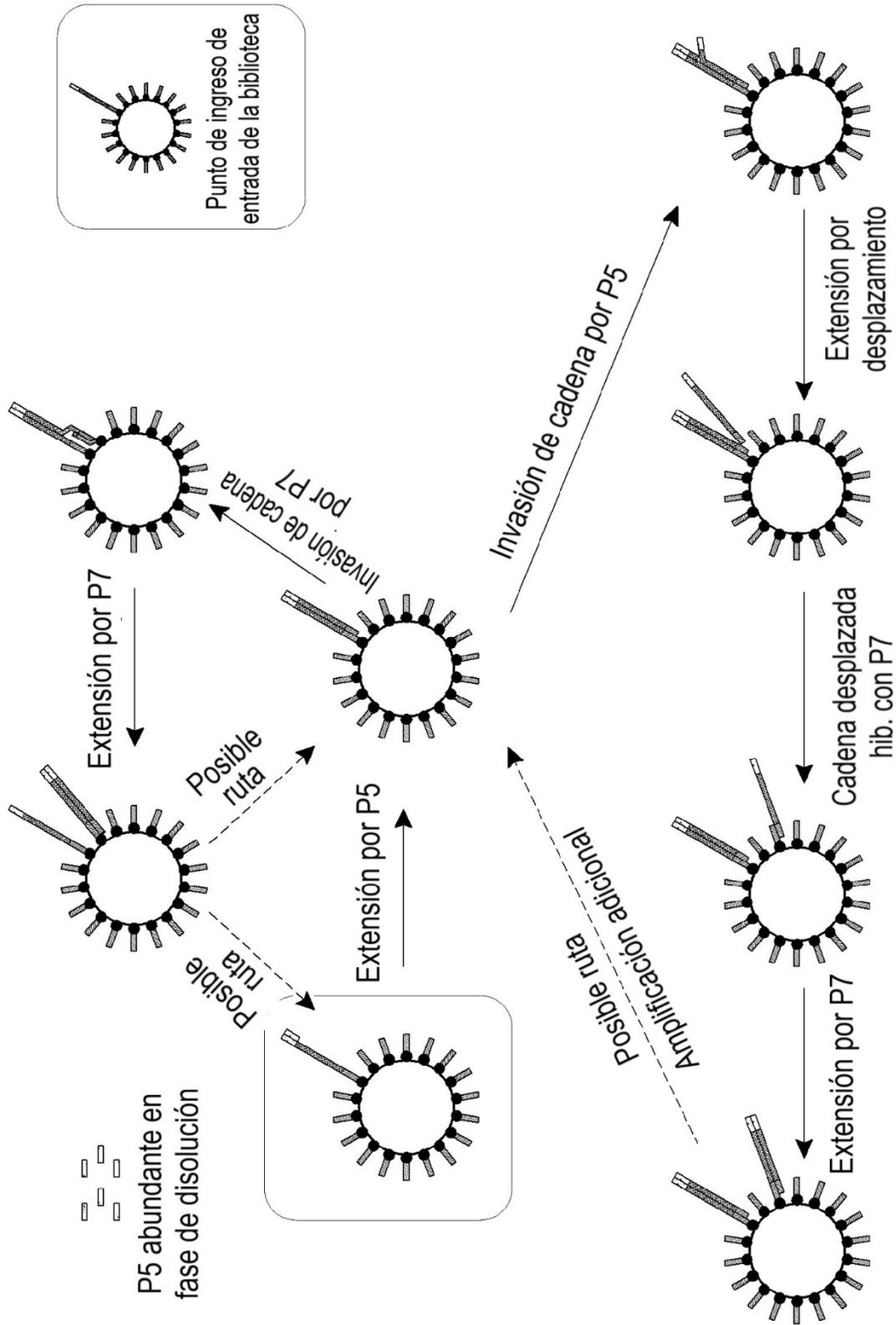


FIG. 28

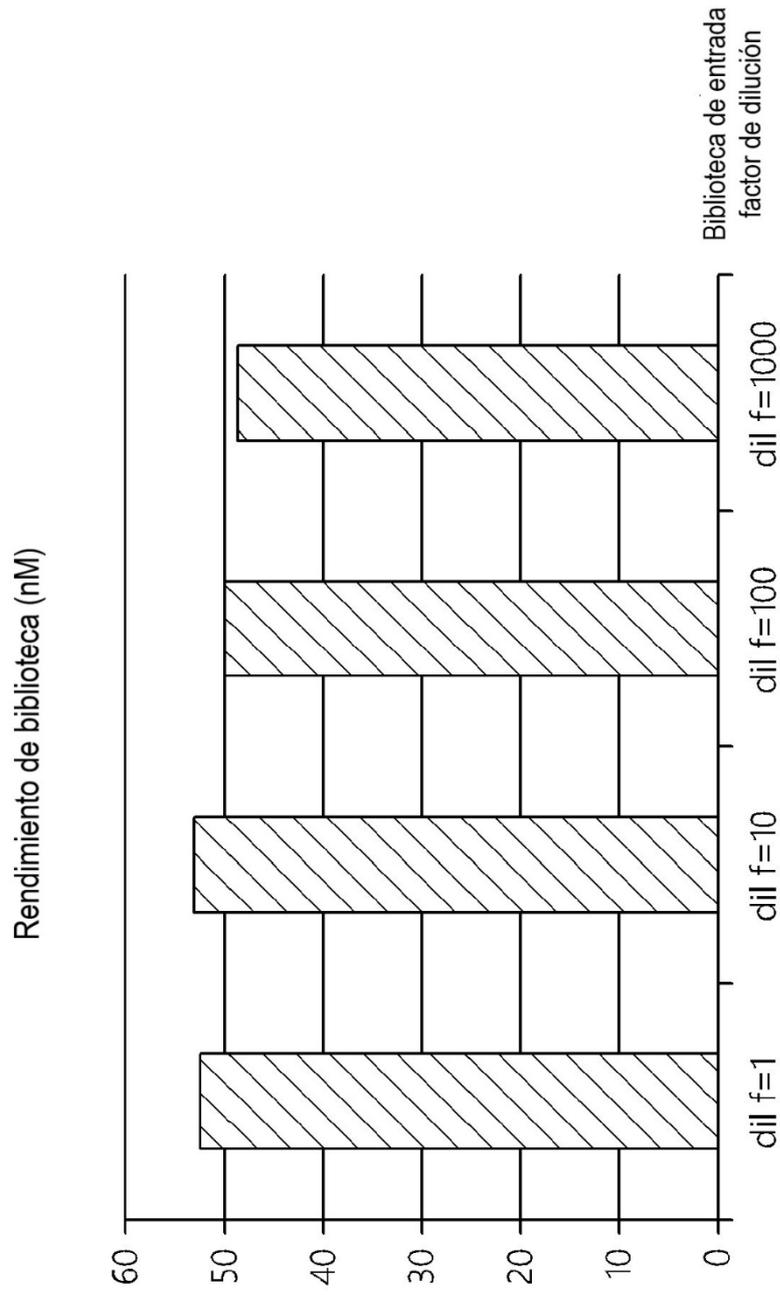


FIG. 29A

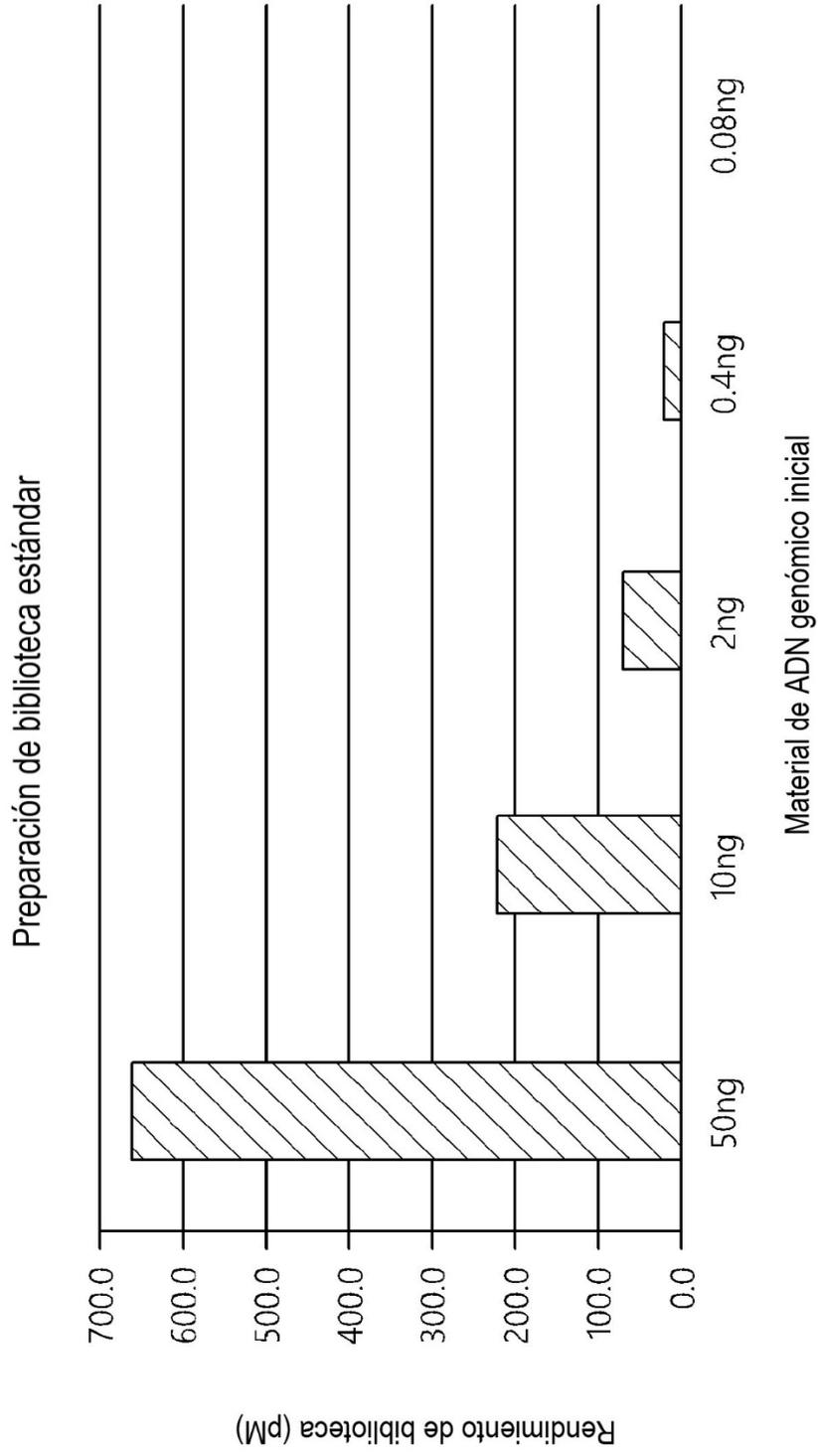


FIG. 29B

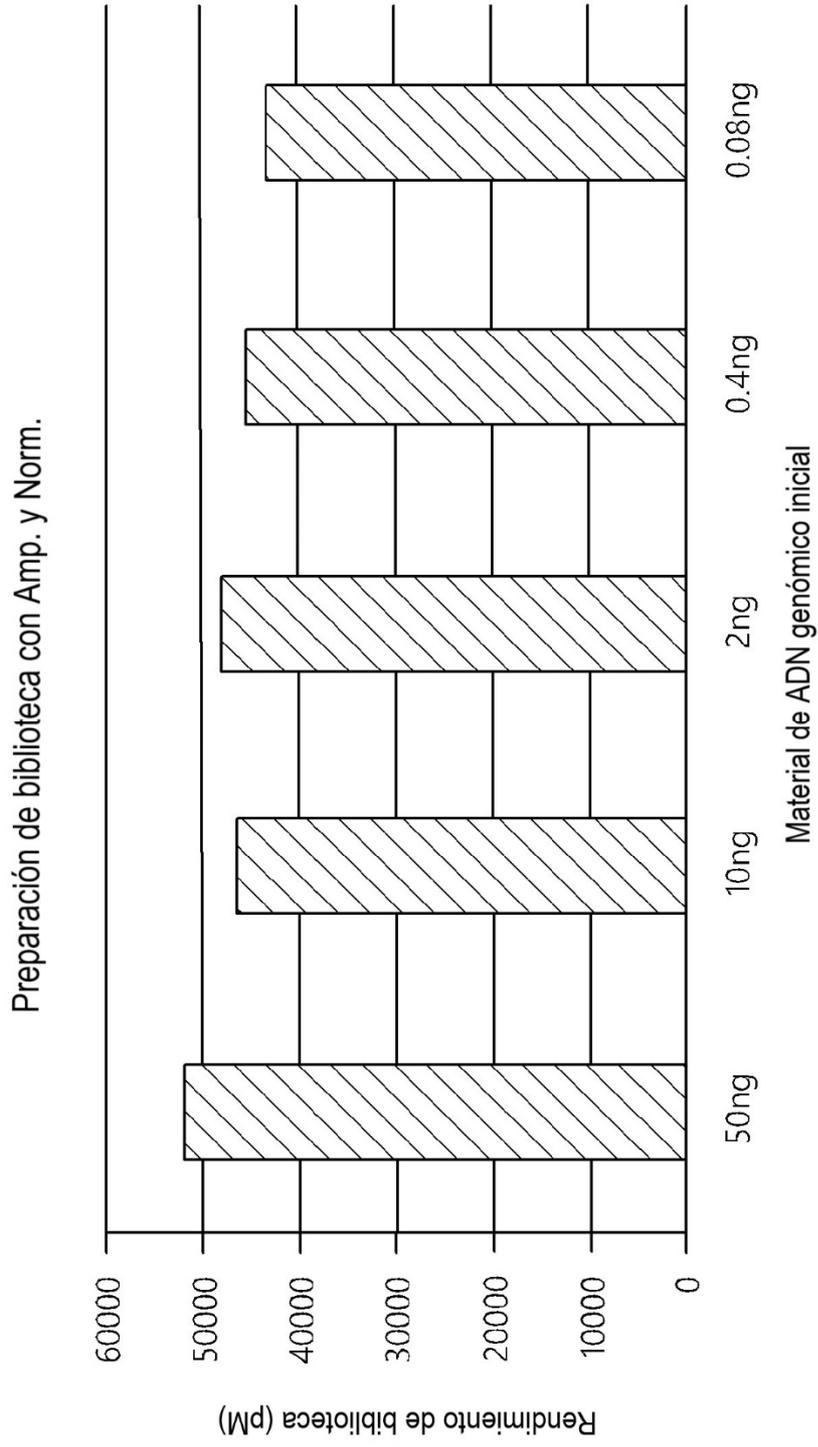


FIG. 29C