

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 338 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2004 PCT/US2004/002484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2004 WO04069849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2004 E 04706051 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.08.2017 EP 1594980**

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

30 Prioridad:

29.01.2003 US 443471 P

23.04.2003 US 465071 P

06.06.2003 US 476602 P

06.06.2003 US 476504 P

06.06.2003 US 476313 P

06.06.2003 US 476592 P

25.08.2003 US 497985 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
11.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERKA, JAN;
CHEN, YI-JU;
LEAMON, JOHN, H.;
LEFKOWITZ, STEVEN;
LOHMAN, KENTON;
MAKHIJANI, VINOD;
SARKIS, GARY, J.;
ROTHBERG, JONATHAN;
WEINER, MICHAEL y
SRINIVASAN, MAITHREYAN**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

DESCRIPCIÓN

Amplificación de ácidos nucleicos en emulsión de perlas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para amplificar ácidos nucleicos de molde a partir de un número de copia reducido hasta cantidades que permitan la secuenciación en un soporte sólido, tal como en una perla. Asimismo, la presente invención se refiere a la eliminación de perlas vacías, un método de enriquecimiento de soporte sólidos que contienen ácidos nucleicos amplificados.

Antecedentes

La capacidad de amplificar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos, tal como una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc, resulta crítica dada la ineficiencia de los métodos actuales de secuenciación. Las tecnologías de secuenciación actuales requieren millones de copias de ácido nucleico por cada reacción de secuenciación. Además, la secuenciación de un genoma humano requeriría aproximadamente diez millones de reacciones de secuenciación diferentes. En el caso de que el material de partida fuese limitado, resultaría necesaria la amplificación del ADN inicial antes de la secuenciación genómica. El material de partida puede ser limitado, por ejemplo si el genoma que debe secuenciarse procede de una cantidad traza de patógeno o de un paciente prenatal. Las técnicas actuales para la amplificación genómica *in vitro* implican protocolos laboriosos de clonación y cultivo que han limitado la utilidad de la secuenciación genómica. Otras técnicas, tales como la PCR, aunque rápidas y fiables, no son capaces de amplificar un genoma de una manera representativa.

Aunque la PCR con cebadores aleatorios puede manipularse fácilmente para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos en una reacción, este método no resulta preferente debido a que la biblioteca amplificada no es representativa de la biblioteca de partida. Es decir, en el contexto de una PCR aleatoria algunas secuencias de ADN se amplifican preferentemente a expensas de otras secuencias, de manera que el producto amplificado no representa el material de partida. Este problema de la PCR puede superarse si cada miembro individual de una biblioteca se amplifica en una reacción separada. Sin embargo, este enfoque puede no resultar práctico en el caso de que se requieran muchos miles de tubos de reacción para el procedimiento de amplificación, ya que una biblioteca genómica o una biblioteca de ADNc puede incluir más de 100.000 fragmentos. La amplificación individual de cada fragmento de estas bibliotecas en una reacción separada no resulta práctica.

El documento WO 00/40712 da a conocer un método de separación óptica utilizado para aislar uno o más elementos genéticos codificantes de un producto génico que presente una actividad deseada.

Descripción resumida de la invención

La presente invención, tal como se menciona en las reivindicaciones adjuntas, proporciona un método para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo cada secuencia de una biblioteca de ADN, transcriptoma o genoma) de una manera rápida y económica en un único tubo de reacción. Un uso del método de la invención es llevar a cabo amplificación clonal simultánea mediante PCR asimétrica de una pluralidad de muestras (hasta varios cientos de miles) en un recipiente de reacción. La presente invención proporciona además un medio para encapsular una pluralidad de muestras de ADN individualmente en una microcápsula de una emulsión (es decir, un microrreactor), llevando a cabo la amplificación por PCR asimétrica de la pluralidad de muestras encapsuladas de ácidos nucleicos simultáneamente, y liberando dicha pluralidad amplificada de ADN de las microcápsulas para reacciones posteriores.

Se hibridan copias individuales de la especie de ácido nucleico molde a perlas de captura que comprenden oligonucleótidos de captura que se unen al molde de ácidos nucleicos. Las perlas se suspenden en solución de amplificación completa (ver el Ejemplo 2 para un ejemplo de una solución de amplificación) y se emulsionan para producir microrreactores (típicamente de 100 a 200 micrómetros de diámetro). A continuación, se utiliza amplificación por PCR asimétrica para incrementar clonalmente el número de copia de la especie molde inicial en los microrreactores, y estas copias se unen a las perlas de captura en los microrreactores.

Una ventaja de la presente invención es que los microrreactores permiten la amplificación clonal y discreta simultánea de muchos moldes diferentes sin contaminación cruzada de los productos amplificados o reactivos, o el dominio de un molde particular o conjunto de moldes (por ejemplo el sesgo de PCR). La reacción de amplificación, por ejemplo, puede llevarse a cabo simultáneamente con por lo menos 3.000 microrreactores por microlitro de mezcla de reacción. Preferentemente, cada microrreactor comprende una o unas pocas especies de molde amplificado.

En diversas realizaciones de la invención, los microrreactores presentan un tamaño medio de entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 250 μm . En una realización preferente, los microrreactores presentan un diámetro medio de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 200 μm . En una realización más preferente,

5 los microrreactores presentan un diámetro medio de aproximadamente 60 μm , tal como una media de entre 40 μm y 80 μm de diámetro. En una realización, los microrreactores presentan un diámetro medio de aproximadamente 60 μm . En otra realización preferente, los microrreactores presentan un volumen medio de aproximadamente 113 μl . En una realización todavía más preferente, aproximadamente 3.000 microrreactores se encuentran contenidos en un microlitro de una emulsión 1:2 de agua en aceite.

10 La presente invención, tal como se menciona en las reivindicaciones adjuntas, proporciona además un método para producir una pluralidad de perlas portadoras de ácidos nucleicos molde, en la que cada perla comprende hasta 1.000.000 copias o más de una única secuencia de ácidos nucleicos. En una realización preferente, cada perla puede comprender más de 20 millones de copias de un único ácido nucleico.

15 La presente invención, tal como se menciona en las reivindicaciones adjuntas, proporciona además un método para enriquecer aquellas perlas que contengan el producto de la amplificación exitosa de ADN (es decir, mediante la eliminación de perlas que no presentan ADN unido a las mismas).

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1 Esquema de la estructura de una perla de captura de ADN.

20 Figuras 2A-2B Esquema de una realización de un procedimiento de amplificación en emulsión de perlas.

Figura 3 Esquema de un procedimiento de enriquecimiento para eliminar perlas que no presentan ningún ADN unido a las mismas.

25 Figura 4 Ilustración de dispositivo utilizado para sostener tubos en la placa de agitación situada bajo una bomba vertical de jeringa. El dispositivo se modificó para sostener tres conjuntos de mezclas de reacción de amplificación en emulsión de perlas. La jeringa se cargó con la mezcla de reacción de PCR y perlas.

30 Figura 5 Ilustración de la organización óptima de jeringas en una bomba vertical de jeringa y orientación de los tubos de emulsión bajo las salidas de las jeringas.

Figura 6 Ilustración de la organización óptima del bloque impulsor de la bomba de jeringas contra los émbolos de las jeringas, y orientación óptima del dispositivo sobre la placa de agitación. Mediante la utilización de dicha disposición, se expulsa el contenido de la jeringa en el aceite en emulsión bajo agitación.

35 Figura 7 Ilustración de perlas (ver las flechas) suspendidas en microrreactores individuales según los métodos de la invención.

40 Figura 8A-8C Esquema que muestra las etapas iniciales de amplificación en emulsión de perlas utilizada conjuntamente con la secuenciación desde dos extremos. La perla activada por NHS (figura 8A) se une a los cebadores de captura (figura 8B) y se encapsula en un microrreactor que comprende la perla de captura de ADN y molde (figura 8C).

45 Figura 9 Esquema que muestra las etapas de amplificación y de captura de la amplificación en emulsión de perlas utilizada conjuntamente con la secuenciación desde dos extremos. El molde se amplifica mediante PCR en fase solución y los productos de amplificación se unen a la perla de captura de ADN.

50 Figura 10 Esquema que muestra las últimas etapas de amplificación en emulsión de perlas utilizada conjuntamente con la secuenciación desde dos extremos. La emulsión se rompe (figuras 10A-10B), se elimina la segunda cadena del producto de amplificación y se utiliza el enriquecimiento para maximizar el número de perlas unidas a producto de amplificación (figura 10C), se hibridan los cebadores de secuenciación (figura 10D) y se secuencia la primera cadena (figura 10E), seguido de la segunda cadena.

55 Descripción detallada de la invención

Breve vista general de la amplificación en emulsión de perlas

60 Se comenta posteriormente una breve vista general de una realización de la invención. A continuación, se proporciona una descripción más detallada de cada etapa individual de la presente realización. La PCR es la técnica de amplificación seleccionada.

65 Se lleva a cabo la amplificación en emulsión de perlas mediante la unión de un molde (por ejemplo un molde de ADN) que debe amplificarse a un soporte sólido, en la forma de un perla generalmente esférica. La perla se une a un gran número de una única especie de cebador (es decir, el cebador B en la figura 2) que es complementario a una región del molde de ADN y la amplificación copia a partir de este molde. Las perlas se suspenden en una mezcla de reacción acuosa y después se encapsulan en una emulsión de agua en aceite. El ADN molde se une a la perla

previamente a la emulsificación.

La emulsión está compuesta de microgotas discretas en fase acuosa, por ejemplo de diámetro medio comprendido entre aproximadamente 60 y 200 μm , incluidas en una fase aceite termoestable. Cada microgota contiene solución de reacción de amplificación por PCR (es decir, los reactivos necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos); concretamente, una mezcla de reacción de PCR (polimerasa, sales, dNTPs; ver el Ejemplo 2 para un ejemplo) y una pareja de cebadores de PCR (cebador A y cebador B) (ver la figura 2A). Un subconjunto de la población de microgotas incluye la perla de ADN y el molde. Este subconjunto de microgotas es la base para la amplificación. Las microcápsulas restantes no contienen ADN molde y no participarán en la amplificación. La técnica de amplificación es la PCR asimétrica y los cebadores de PCR pueden estar presentes en una proporción de 8:1 o de 16:1 (es decir, 8 ó 16 de un cebador a 1 del segundo cebador) para llevar a cabo una PCR asimétrica.

La reacción de amplificación por PCR asimétrica, puede llevarse a cabo tal como se ilustra en la vista general siguiente. En el ejemplo, se hibrida una región de la molécula de ADN (región B') a un oligonucleótido inmovilizado en una perla (cebador B). Durante el termociclado (figura 2B), el enlace entre el molde monocatenario y el cebador B inmovilizado en la perla se rompe, liberando el molde a la solución microencapsulada circundante. La solución de PCR contiene cebador A y cebador B en fase solución (por ejemplo en una proporción de 8:1 o de 16:1). Los cebadores B en fase solución se unen fácilmente a la región B' complementaria del molde debido a que la cinética de unión es más rápida para los cebadores en fase solución que para los cebadores inmovilizados.

En la PCR en etapa temprana, tanto la cadena A como la B se amplifican igualmente bien (figura 2C). Al alcanzar la etapa intermedia de la PCR (es decir, entre los ciclos 10 y 30), se han agotado los cebadores B, deteniendo la amplificación exponencial. A continuación, la reacción entra en amplificación asimétrica y la población de amplicones resulta dominada por las cadenas A (figura 2D). En la PCR en etapa tardía (figura 2E), tras 30 a 40 ciclos, la amplificación asimétrica incrementa la concentración de cadenas A en solución. El exceso de cadenas A inicia su hibridación a los cebadores B inmovilizados en perlas. Seguidamente las polimerasas termoestables utilizan la cadena A como molde para sintetizar una cadena B inmovilizada del amplicón unida a perla.

En la PCR en la etapa final (figura 2F), el ciclado térmico continuo fuerza la hibridación adicional a cebadores unidos a perlas. La amplificación en fase solución puede ser mínima en esta etapa, aunque la concentración de cadenas B inmovilizadas se incrementa. A continuación, se rompe la emulsión y el producto inmovilizado se convierte en monocatenario mediante desnaturalización (por calor, pH, etc.), que elimina la cadena A complementaria. Los cebadores A se hibridan a la región A' de la cadena inmovilizada, y la cadena inmovilizada se carga con enzimas de secuenciación, y cualquier proteína accesoria necesaria. A continuación, las perlas se secuencian utilizando técnicas de pirofosfato conocidas (descritas, por ejemplo, en las patentes US Nos. 6.274.320, 6.258.568 y 6.210.891).

Diseño del molde

En una realización preferente, el molde de ácidos nucleicos que debe amplificarse mediante amplificación en emulsión de perlas es una población de ADN, tal como, por ejemplo, una biblioteca de ADN genómico o una biblioteca de ADNc. Resulta preferente que cada miembro de la población de ADN presente una secuencia común de ácidos nucleicos en el primer extremo y una secuencia común de ácidos nucleicos en un segundo extremo. Esto puede conseguirse, por ejemplo, ligando una primera secuencia adaptadora de ADN a un extremo y una segunda secuencia adaptadora de ADN a un segundo extremo de cada miembro de la población de ADN. Muchas bibliotecas de ADN y de ADNc, en virtud de la naturaleza del vector de clonación (por ejemplo Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA) encajan en la descripción de que presentan una secuencia común en un primer extremo y una segunda secuencia común en un segundo extremo de cada ADN miembro. El molde de ácidos nucleicos puede presentar cualquier tamaño que permite la PCR asimétrica *in vitro*. En una realización preferente, el molde presenta un tamaño de entre aproximadamente 150 y 750 pb, tal como, por ejemplo aproximadamente 250 pb.

Unión de molde de ácidos nucleicos a perlas de captura

Se une un molde de ácidos nucleicos monocatenarios que debe amplificarse a una perla de captura. El molde se captura en una perla previamente a la emulsificación. Las copias de amplificación del molde de ácidos nucleicos se unen a una perla de captura. Estas uniones están mediadas por oligonucleótidos que se encuentran unidos a la superficie de la perla. Los oligonucleótidos pueden unirse a la perla de captura de cualquier manera conocida de la técnica.

La unión química covalente de un oligonucleótido a una perla puede conseguirse mediante la utilización de agentes acoplantes estándares. Por ejemplo, puede utilizarse carbodiimida soluble en agua para unir el fosfato 5' de una secuencia de ADN a perlas de captura recubiertas con amina mediante un enlace fosfoamidato. Entre otras químicas de enlace para unir el oligonucleótido a las perlas se incluyen la utilización de N-hidroxisuccinamida (NHS) y derivados de la misma.

Pueden utilizarse oligonucleótidos que se hibriden específicamente a secuencias únicas en el extremo del fragmento de ADN. Resulta preferente que las perlas continúen ligando los oligonucleótidos inmovilizados durante las etapas

de los métodos de la invención.

Cada perla de captura se diseña para que presente una pluralidad de oligonucleótidos que reconocen (es decir, que sean complementarios a) una parte del molde de ácidos nucleicos, y las copias de amplificación de dicho molde. En los métodos descritos en la presente memoria, se desea la amplificación clonal de la especie molde, de manera que resulta preferente que únicamente una única especie de ácidos nucleicos se una a una perla de captura cualquiera.

Las perlas utilizadas en la presente memoria pueden presentar cualquier tamaño conveniente y fabricarse a partir de uno o más materiales conocidos cualesquiera. Entre los ejemplos de dichos materiales se incluyen: compuestos inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Entre los ejemplos específicos de dichos materiales se incluyen: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno entrecruzado con divinilbenceno o similar (tal como se describe, por ejemplo en Merrifield, *Biochemistry*, 3:1385-1390, 1964), poli(acrilamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, caucho, silicio, plásticos, nitrocelulosa, esponjas naturales, geles de sílice, vidrio de poro controlado, metales, dextranos entrecruzados (por ejemplo Sephadex¹™), gel de agarosa (Sephacrose¹™) y otros soportes de fase sólida conocidos por el experto en la materia. En realizaciones preferentes, las perlas de captura son perlas de diámetro aproximado entre 2 y 100 μm o de entre 10 y 80 μm de diámetro, más preferentemente de entre 20 y 40 μm de diámetro. En una realización preferente, las perlas de captura son perlas de sefarosa.

Emulsificación

Para la utilización con la presente invención, se suspenden perlas de captura con ácidos nucleicos de molde en una emulsión de agua en aceite estable frente al calor. Se contempla que una pluralidad de los microrreactores incluya únicamente un molde y una perla. Pueden existir muchas gotas que no contengan un molde o que no contengan una perla. De manera similar, pueden existir gotas que contengan más de una copia de un molde. La emulsión puede formarse según cualquier método conocido de la técnica. Un método para crear una emulsión se describe posteriormente, aunque puede utilizarse cualquier método para preparar una emulsión. Estos métodos son conocidos de la técnica e incluyen métodos adyuvantes, métodos de contraflujo, métodos de contracorriente, métodos de tambor giratorio y métodos de membrana. Además, el tamaño de las microcápsulas puede ajustarse modificando el caudal y la velocidad de los componentes. Por ejemplo, en la adición gota a gota, puede modificarse el tamaño de las gotas y el tiempo total de adición. Preferentemente, la emulsión contiene una densidad de aproximadamente 3.000 perlas encapsuladas por microlitro.

Se hace referencia a diversas emulsiones que resultan adecuadas para reacciones biológicas en Griffiths y Tawfik, *EMBO*, 22:24-35, (2003); Ghadessy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4552-4557, (2001); patentes US No. 6.489.103 y WO 02/22869.

Se indica que Griffiths *et al.* (patentes US No. 6.489.103 y WO 99/02671) se refiere a un método para la separación *in vitro* de uno o más elementos genéticos codificantes de un producto génico que presenta una actividad deseada. Este método implica compartimentalizar un gen, expresar el gen y separar el gen compartimentalizado basándose en el producto expresado. En contraste con la presente invención, el método de separación por microencapsulado no resulta adecuado para el análisis paralelo de múltiples microcápsulas debido a que su producto ácido nucleico no se encuentra anclado y no puede anclarse. Debido a que los ácidos nucleicos de Griffiths no se encuentran anclados, se mezclarían durante la demulsificación.

La emulsión preferentemente se genera mediante la adición de perlas a una solución de amplificación. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "solución de amplificación" se refiere a una mezcla suficiente de reactivos necesaria para llevar a cabo la amplificación por PCR asimétrica del ADN molde. Un ejemplo de una solución de amplificación por PCR se proporciona en los Ejemplos, posteriormente. En una realización, la mezcla de perlas y solución de amplificación se añade gota a gota a una mezcla de aceite biocompatible (por ejemplo aceite mineral ligero, Sigma) bajo centrifugación y se deja que se emulsione. En otra realización, las perlas y la solución de amplificación se añaden gota a gota en un flujo cruzado de aceite biocompatible. El aceite utilizado puede suplementarse con uno o más estabilizantes de emulsión biocompatibles. Entre estos estabilizantes de emulsión se incluyen Atlox 4912, Span 80, y otros estabilizantes adecuados comercialmente disponibles. En aspectos preferentes, la emulsión es estable al calor para permitir el ciclado térmico, por ejemplo a por lo menos 94°C, a por lo menos 95°C, o a por lo menos 96°C. Preferentemente, las gotas formadas presentan un tamaño comprendido entre aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 500 micrómetros, más preferentemente entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 350 micrómetros, todavía más preferentemente entre aproximadamente 50 y 250 micrómetros, y todavía más preferentemente entre aproximadamente 100 micrómetros y aproximadamente 200 micrómetros. Ventajosamente, la mezcla de fluido en flujo cruzado permite el control de la formación de las gotas y la uniformidad del tamaño de gota. Los presentes inventores señalan que pueden encontrarse presentes en la emulsión gotas de agua de menor tamaño que no contienen perlas.

Los microrreactores deben presentar un tamaño suficientemente grande para poder incluir suficientes reactivos de amplificación para el grado de amplificación requerido. Sin embargo, los microrreactores deben ser suficientemente pequeños para que una población de microrreactores, conteniendo cada uno un miembro de una biblioteca de ADN,

pueda amplificarse utilizando equipos de termociclado de PCR, probetas, incubadores y similares. Notablemente, la utilización de microrreactores permite la amplificación de mezclas complejas de moldes (por ejemplo muestras de ADN genómico o ARN de células completas) sin mezclar entre sí las secuencias o sin que domine uno o más moldes (por ejemplo sesgo de selección de la PCR; ver Wagner *et al.*, 1994; Suzuki y Giovannoni, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Polz y Cavanaugh, 1998).

Dentro de las limitaciones indicadas anteriormente, el tamaño óptimo de un microrreactor puede ser de entre 100 y 200 micrómetros de diámetro. Los microrreactores de este tamaño permitirían la amplificación de una biblioteca de ADN que comprende aproximadamente 600.000 miembros en una suspensión de microrreactores de menos de 10 ml de volumen. Por ejemplo, usando PCR, podrían incluirse 10 ml de microrreactores en 96 tubos de un termociclador convencional con capacidad para 96 tubos. En una realización preferente, la suspensión de 600.000 microrreactores presentaría un volumen inferior a 1 ml. Una suspensión de menos de 1 ml puede amplificarse en aproximadamente 10 tubos de un termociclador de PCR convencional. En una realización todavía más preferente, la suspensión de 600.000 microrreactores presentaría un volumen inferior a 0,5 ml.

Amplificación asimétrica

En una realización preferente, la amplificación del ADN se lleva a cabo mediante PCR asimétrica. La PCR según la presente invención puede llevarse a cabo mediante encapsulado del ácido nucleico diana con una solución de PCR que comprenda todos los reactivos necesarios para la PCR. A continuación, la PCR puede llevarse a cabo mediante exposición de la emulsión a cualquier régimen adecuado de termociclado conocido de la técnica. En una realización preferente, se llevan a cabo 30 a 50 ciclos, preferentemente aproximadamente 40 ciclos de amplificación. Resulta deseable, aunque no necesario, que tras el procedimiento de amplificación se realice uno o más ciclos de hibridación y extensión tras los ciclos de amplificación. En una realización preferente, se llevan a cabo 10 a 30 ciclos, preferentemente aproximadamente 25 ciclos de hibridación y extensión (por ejemplo tal como se describe en los ejemplos). Rutinariamente, el ADN molde se amplifica hasta inmovilizarse en cada perla típicamente por lo menos 10.000 a 50.000.000 copias. Se reconoce que, para las aplicaciones de detección de ácidos nucleicos, resultan necesarias menos copias de molde. Para las aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos los presentes inventores prefieren que se inmovilicen en cada perla por lo menos dos millones a cincuenta millones de copias, preferentemente entre aproximadamente diez millones y treinta millones de copias del ADN molde. El experto en la materia reconocerá que el tamaño de la perla (y del sitio de captura en la misma) determina el número de cebadores capturados que pueden unirse (y, de esta manera, el número de moldes amplificados que puede capturarse en cada perla).

Diseño del cebador de PCR

La selección de ácidos nucleicos cebadores para la amplificación por PCR, se encuentra perfectamente dentro de las capacidades del experto en la materia. Pueden encontrarse estrategias para el diseño de cebadores en la literatura científica, por ejemplo en Rubin E. y A.A. Levy, *Nucleic Acids Res.* 24(18):3538-45, 1996; y Bucks G.A. *et al.*, *Biotechniques* 27(3):528-36, 1999. En una realización preferente, los cebadores pueden limitarse a una longitud de 20 bases (5 tetrámeros) para la síntesis eficiente de cebadores bipartitos de PCR/secuenciación. Cada cebador puede incluir una abrazadera GC de dos bases en el extremo 5', una única abrazadera GC en el extremo 3', y todos los cebadores pueden compartir una Tm similar (+/- 2°C). En una realización preferente, las estructuras de horquilla dentro de los cebadores (ΔG de tallos de horquillas internas > -1,9 kcal/moles) resultan fuertemente desfavorecidas en cualquiera de los cebadores diseñados. En otra realización preferente, la dimerización de los cebadores también se encuentra controlada, de manera que se acepta como máximo un dímero de 3 bases. Sin embargo, se permite que esto ocurra únicamente en las últimas seis bases 3' y la ΔG máxima permisible para un dímero 3' es de -2,0 kcal/mol. Preferentemente, se aplica una penalización a los cebadores en los que los extremos 3' son excesivamente similares a otros en el grupo. Esto impide la hibridación cruzada entre un cebador y el complemento inverso del otro cebador.

En el caso de que los cebadores se diseñen según los criterios indicados anteriormente, la posibilidad de que existan regiones complementarias dentro del genoma de interés no constituye un gran problema, a pesar de la tolerancia informada de la PCR a apareamientos incorrectos en poblaciones de muestra complejas (Rubin E y A.A. Levy, *Nucleic Acids Res.* 24(18):3538-45, 1996). Aunque la probabilidad de encontrar un apareamiento perfecto con un cebador de 20 bases es extremadamente baja (4^{20}) (ver la Tabla 1), la probabilidad de encontrar apareamientos no consecutivos más cortos se incrementa significativamente con el tamaño del genoma de interés. Como consecuencia, la probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta para una secuencia de por lo menos 10 ó 20 bases es 99,35% para un genoma de adenovirus. La probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta para una secuencia de 16 bases es de 97% para las secuencias en la base de datos de NCBI (aproximadamente 100 veces más información de secuencia que el genoma de adenovirus). La probabilidad de encontrar una correspondencia perfecta para una secuencia de 17 a 20 bases es de 99% para el genoma humano (aproximadamente 3.000 millones de bases).

Tabla 1. La probabilidad de apareamientos de secuencias perfectos para los cebadores se incrementa a medida que se reducen los requisitos de longitud de apareamiento y se incrementa el tamaño del genoma de interés

Longitud de apareamiento	Probabilidad de apareamiento perfecto ($1/4^{\text{longitud}}$)	% de probabilidad de apareamiento en ~35K bases de adenovirus	% de probabilidad de apareamiento en las 488 Mbases de la base de datos bacteriana NCBI	% de probabilidad de apareamiento en ~3B bases humanas
20	$9,1 \times 10^{-13}$	0,00%	0,04%	0,27%
19	$7,3 \times 10^{-12}$	0,00%	0,65%	4,32%
18	$4,4 \times 10^{-11}$	0,00%	5,76%	34,37%
17	$2,3 \times 10^{-10}$	0,00%	35,69%	99,17%
16	$1,2 \times 10^{-9}$	0,02%	97,52%	>100%
15	$5,6 \times 10^{-9}$	0,12%	>100%	>100%
14	$2,6 \times 10^{-8}$	0,64%	>100%	>100%
13	$1,2 \times 10^{-7}$	3,29%	>100%	>100%
12	$5,4 \times 10^{-7}$	15,68%	>100%	>100%
11	$2,4 \times 10^{-6}$	58,16%	>100%	>100%
10	$1,0 \times 10^{-5}$	99,35%	>100%	>100%
9	$4,6 \times 10^{-5}$	99,77%	>100%	>100%
8	$2,0 \times 10^{-4}$	>100%	>100%	>100%
7	$8,5 \times 10^{-4}$	>100%	>100%	>100%
6	$3,7 \times 10^{-3}$	>100%	>100%	>100%
5	$1,6 \times 10^{-2}$	>100%	>100%	>100%
4	$6,4 \times 10^{-2}$	>100%	>100%	>100%
3	$2,5 \times 10^{-1}$	>100%	>100%	>100%
2	$7,1 \times 10^{-1}$	>100%	>100%	>100%
1	1	>100%	>100%	>100%

Sin embargo, la hibridación cruzada de un cebador a diversas regiones del genoma resulta menos problemática de lo esperado a partir de la digestión aleatoria de ADN utilizada para formar los ácidos nucleicos molde. Las regiones de hibridación cruzada (CHRs) son bastante benignas. En primer lugar, es improbable que una CHR pueda competir con éxito con el apareamiento perfecto entre los cebadores de PCR en solución y el molde. Además, cualquier cebador que incluya apareamientos incorrectos en el extremo 3' presentará una desventaja competitiva significativa. Incluso en el caso de que una CHR ganase en competición al cebador de PCR deseado, produciría un producto de PCR truncado, sin sitio cadena abajo para el cebador de secuenciación. En el caso de que el producto truncado pudiese transportarse hasta la perla de captura e inmovilizarse, podrían resultar dos situaciones. En el caso de que la CHR ganase en competencia al cebador en fase solución, el producto inmovilizado no presentaría un sitio de unión de cebador de secuenciación y resultaría en un pocillo vacío en la placa PicoTiter (PTP). En el caso de que la CHR ganase en competencia con el cebador unido a perla, el cebador de secuenciación todavía se encontraría presente y el único efecto sería una inserción más corta. Ninguno de estos resultados comprometería indebidamente la calidad de la secuenciación. Dada la gran cantidad de material genómico utilizado en el procedimiento de preparación de muestras (en la actualidad 25 µg, que contiene $5,29 \times 10^{16}$ copias del genoma adenovírico de 35 Kb), puede utilizarse el sobremuestreo para proporcionar fragmentos que no presentan la CHR completa, permitiendo la amplificación por PCR estándar de la región en cuestión.

Rotura de la emulsión y recuperación de perlas

Tras la amplificación del ácido nucleico molde y la unión de copias de amplificación a la perla, se "rompió" la emulsión (también denominada "demulsificación" en la técnica). Existen muchos métodos para romper una emulsión (ver, por ejemplo, la patente US No. 5.989.892 y referencias citadas en la misma) y un experto en la materia sería capaz de seleccionar un método apropiado. En la presente invención, un método preferente para romper la emulsión utiliza aceite adicional para provocar que la emulsión se separe en dos fases. A continuación, se elimina la fase aceite y se añade un solvente orgánico adecuado (por ejemplo hexanos). Tras la mezcla, se elimina la fase de aceite/solvente orgánico. Esta etapa puede repetirse varias veces. Finalmente, se eliminan las capas acuosas en la parte superior de las perlas. Seguidamente las perlas se lavan con una mezcla de un solvente orgánico y tampón de hibridación (por ejemplo, se describe en los ejemplos un tampón de hibridación adecuado) y después se lavan nuevamente en tampón de hibridación. Entre los solventes orgánicos adecuados se incluyen alcoholes tales como metanol, etanol y similares.

Las perlas unidas a productos de amplificación seguidamente pueden resuspenderse en solución acuosa para la utilización, por ejemplo, en una reacción de secuenciación según tecnologías conocidas (ver Sanger F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5463-5467, (1977); Maxam A.M. y Gilbert W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560-564, (1977); Ronaghi M. *et al.*, Science 281:363-365, (1998); Lysov I. *et al.*, Dok. Akad. Nauk. SSSR 303:1508-1511, (1988); Bains W. y Smith G.C., J. Theor. Biol. 135:303-307, (1988); Drnanac R. *et al.*, Genomics 4:114-128, (1989); Khrapko K.R. *et al.*, FEBS Lett. 256:118-122, (1989); Pevzner P.A., J. Biomol. Struct. Dyn. 7:63-73, (1989); Southern E.M. *et al.*, Genomics 13:1008-1017, (1992)).

En el caso de que las perlas deban utilizarse en una reacción de secuenciación (descrita, por ejemplo, en las patentes US Nos. 6.274.30, 6.258.568 y 6.210.891, e incorporadas *in toto* en la presente memoria como referencia), resulta necesario eliminar la segunda cadena del producto de PCR e hibridar un cebador de secuenciación al molde monocatenario que se encuentra unido a la perla. La segunda cadena puede disociarse utilizando cualquiera de entre varios métodos comúnmente conocidos, tales como la adición de NaOH, la aplicación de una fuerza iónica reducida (por ejemplo sal), la degradación enzimática o el desplazamiento de la segunda cadena, o el procesamiento térmico. Tras esta etapa de eliminación de la cadena, las perlas se peletizan y se descarta el sobrenadante. Las perlas se resuspenden en un tampón de hibridación y se añade un cebador de secuenciación u otro cebador no de amplificación. El cebador se hibrida al producto de amplificación monocatenario. Esto puede llevarse a cabo mediante la utilización de un tampón de hibridación y condiciones de temperatura apropiados, por ejemplo según procedimientos estándares de la técnica.

Purificación de las perlas

En este punto, el ácido nucleico amplificado en la perla puede secuenciarse directamente en la perla o en un recipiente de reacción diferente. En una realización de la presente invención, el ácido nucleico se secuencia directamente en la perla mediante la transferencia de la perla a un recipiente de reacción y sometiendo el ácido nucleico a una reacción de secuenciación (por ejemplo la secuenciación de pirofosfato o la secuenciación de Sanger). Alternativamente, las perlas pueden aislarse y el ácido nucleico puede separarse de cada perla y secuenciarse. En cualquiera de los dos casos, las etapas de secuenciación pueden llevarse a cabo en cada perla individual. Sin embargo, este método, aunque comercialmente viable y técnicamente factible, podría no ser el más efectivo debido a que muchas de las perlas serán perlas "negativas" (es decir, perlas sin ácido nucleico amplificado ligado a las mismas). En estos casos, pueden utilizarse el procedimiento opcional indicado de manera general posteriormente, con el fin de eliminar las perlas negativas antes de la distribución en las placas multipocillo (por ejemplo en placas PicoTiter).

Un porcentaje elevado de las perlas puede ser negativo en el caso de que el objeto sea minimizar el número de perlas que se asocian a dos o más especies diferentes de ácidos nucleicos de molde. Para una secuenciación de pirofosfato óptima, cada perla debería contener múltiples copias de una única especie de ácido nucleico. Esto puede llevarse a cabo mediante la maximización del número total de perlas en combinación con un único fragmento de ácido nucleico antes de la amplificación. Por ejemplo, puede utilizarse el modelo matemático siguiente.

Para el caso general de un número N de ADNs distribuido aleatoriamente con M número de perlas, la población relativa de perlas asociada a cualquier número de ADNs depende de la proporción N/M. La fracción de perlas asociada a N ADNs, R(N), puede calcularse utilizando la distribución de Poisson:

$$R(N) = \exp(-N/M) \times (N/M)^N / N!$$

en la que x es el símbolo de multiplicación.

La Tabla 2, a continuación, muestra algunos valores calculados para diversos N/M (la proporción media de fragmento de ADN a perla) y N (el número de fragmentos asociados a una perla).

Tabla 2

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

En la Tabla 2, la fila superior muestra las diversas proporciones de N/M. R(0) indica la fracción de perlas sin ADN, R(1) indica la fracción de perlas con un ADN (antes de la amplificación) y R(N>1) indica la fracción de ADN con más de un ADN (antes de la amplificación).

La Tabla 2 indica que la fracción máxima de perlas asociada a un único fragmento de ADN es 0,37 (37%) y esto ocurre a una proporción de fragmento a perla de uno a uno. En esta mezcla, aproximadamente 63% de las perlas no puede utilizarse para la secuenciación debido a que no se encuentran asociadas a ADN o se encuentran asociadas

a más de una especie de ADN. Sin embargo, el control de la proporción de fragmento a perla requiere cálculos complejos, y la variabilidad produce lotes de perlas con una fracción significativamente menor de perlas utilizables.

Esta ineficiencia puede mejorarse significativamente separando las perlas que contienen amplicón (originado de la asociación con por lo menos un fragmento) de aquéllas sin amplicón (originadas de perlas sin fragmentos asociados). Se define “amplicón” como cualquier molécula de ácidos nucleicos producida mediante una técnica *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos. Para incrementar la eficiencia, puede llevarse a cabo la unión utilizando proporciones bajas de fragmento a perla ($N/M < 1$). Esto minimiza el número de perlas asociado a más de un ADN. Puede utilizarse una etapa de separación para eliminar la mayor parte o la totalidad de las perlas sin ADN, dejando una población enriquecida de perlas con una o más especies de ADN amplificado. Esta población enriquecida puede analizarse mediante cualquier método de secuenciación, tal como, por ejemplo, la secuenciación de pirofosfato. Debido a que la fracción de perlas con un amplicón ($N = 1$) se encuentra enriquecida, puede aplicarse cualquier método de secuenciación más eficientemente.

A título de ejemplo, con una proporción media de fragmento a perla de 0,1, el 90% de las perlas no portará amplicón, el 9% de las perlas portará un amplicón y el 0,5% de las perlas portará más de un amplicón. El enriquecimiento descrito posteriormente en la presente memoria eliminará el 90% de las perlas sin amplicón, dejando una población de perlas en la que la fracción disponible para la secuenciación ($N = 1$) es igual a:

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

La dilución de la mezcla de fragmento a perla, conjuntamente con la separación de las perlas que contienen amplicón puede proporcionar un enriquecimiento de 2,5 veces sobre el método no enriquecido óptimo. Por ejemplo, 94%/37% (ver la Tabla 2, anteriormente, $N/M = 1$) = 2,5. Un beneficio adicional del procedimiento de enriquecimiento descrito posteriormente en la presente memoria es que la fracción última de perlas útil para la secuenciación es relativamente insensible a la variabilidad de N/M . De esta manera, los complejos cálculos para derivar la proporción N/M óptima resultan innecesarios o pueden llevarse a cabo con niveles más bajos de precisión. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los métodos de la invención pueden adaptarse fácilmente para la utilización por personal menos formado o para la automatización. Un beneficio adicional de estos métodos es que las perlas sin amplicón pueden reciclarse y reutilizarse. Aunque el reciclado no resulta necesario, puede reducir el coste o el volumen total de reactivos, de manera que el método de la invención resulte más adecuado para algunos fines tales como, por ejemplo, el muestreo portátil, el muestreo robótico a distancia y similar. Además, los beneficios colectivos de los métodos dados a conocer (por ejemplo la adaptación para personal menos formado, la automatización y el reciclado de reactivos) reducirán el coste de los métodos. El procedimiento de enriquecimiento se describe en más detalle posteriormente.

El procedimiento de enriquecimiento puede utilizarse para tratar perlas que han sido amplificadas en el método de emulsión de perlas descrito anteriormente. La amplificación se diseña de manera que cada molécula de ácidos nucleicos amplificada contenga la misma secuencia en su extremo 3'. La secuencia de nucleótidos puede ser un 20-mero, aunque puede ser cualquier secuencia de 15 bases o más, tal como 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40 bases o más larga. Aunque los extremos de oligonucleótidos más largos son funcionales, no resultan necesarios. Un experto en la materia será capaz de introducir dicha secuencia 3' en el extremo de un ácido nucleico amplificado. Por ejemplo, en el caso de que se utilice PCR para la amplificación de un ADN molde, la secuencia puede incluirse como parte de un miembro de la pareja de cebadores de PCR.

En la figura 3 se ilustra un esquema del procedimiento de enriquecimiento. En este procedimiento, se mezcló la perla ligada a amplicón con cuatro perlas vacías para crear una mezcla de perlas de amplificación diluida en fragmentos. En la etapa 1, se hibridó con el amplicón un cebador biotinilado complementario al extremo 3' del amplicón. En la etapa 2, se añadió ADN polimerasa y los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) naturales a la mezcla de perlas y se extendió el cebador biotinilado. Esta extensión sirve para fortalecer la unión entre el cebador biotinilado y el ADN unido a perla. Esta etapa puede omitirse en el caso de que el enlace cebador biotinilado-ADN sea fuerte (por ejemplo en un ambiente altamente iónico). En la etapa 3, se introducen perlas recubiertas de estreptavidina susceptibles de atracción por un campo magnético (denominadas en la presente memoria “perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina”) en las mezclas de perlas. Las perlas magnéticas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo de Dynal (M290). Los grupos de captura de estreptavidina se unen a grupos biotina hibridados a los amplicones, uniendo de esta manera las perlas unidas a amplicón a las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina.

En la etapa 5, se aplicó un campo magnético (representado por un imán) en un área próxima a la mezcla de reacción, provocando que los complejos de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina/perlas unidas a amplicón se posicionasen a lo largo de la pared del tubo más próxima al campo magnético. Las perlas magnéticas sin unión de perlas con amplicón también se esperaba que se posicionasen a lo largo del mismo lado. Las perlas sin amplicones permanecen en solución. Se lavó la mezcla de perlas y las perlas no unidas al imán (es decir, las perlas vacías) se separaron y se descartaron. En la etapa 6, la cadena extendida por el cebador biotinilado se separó de la cadena de amplicón mediante “disociación”. Esta etapa puede llevarse a cabo, por ejemplo con calor o mediante una modificación del pH. El calor puede ser 60°C bajo condiciones de baja salinidad (por ejemplo en un ambiente poco

iónico, tal como 0,1xSSC). La modificación del pH puede llevarse a cabo mediante la adición de NaOH. A continuación, la mezcla se lava y el sobrenadante que contiene las perlas unidas a amplicón se recupera, mientras que las perlas magnéticas resultan retenidas por un campo magnético. Las perlas enriquecidas resultantes pueden utilizarse para la secuenciación del ADN. Se indica que el cebador en la perla de captura de ADN puede ser el mismo que el cebador de la etapa 2, anteriormente. En este caso, la hibridación de las cadenas complementarias de amplicón-cebador (con o sin extensión) es el origen de la afinidad de captura de la diana.

La pareja de biotina-estreptavidina podría sustituirse por una diversidad de parejas de captura-diana. Por ejemplo, las parejas de captura-diana pueden utilizar enlaces reversibles (por ejemplo cortables) o irreversibles. Entre los ejemplos no limitantes de enlaces reversibles se incluyen tiol-tiol, digoxigenina/anti-digoxigenina y enlaces utilizando VECTREX® avidina DLA (Vector Laboratories, Burlingame, CA), CaptAvidin™, NeutrAvidin™ y D-destiobiotina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR).

Tal como se ha descrito anteriormente, la etapa 2 del procedimiento de enriquecimiento es opcional. En el caso de que se omita la etapa 2, podría no resultar necesario separar las perlas magnéticas de las perlas con amplicón ligado. Las perlas con amplicón ligado, con las perlas magnéticas unidas, pueden utilizarse directamente para la secuenciación. Por ejemplo, la separación puede no resultar necesaria en el caso de que la secuenciación se lleve a cabo en una placa de microtitulación o en una placa PicoTiter y el complejo de perla con amplicón ligado-perla magnética quepa en el interior del pocillo de la placa.

Aunque la utilización de perlas de captura magnéticas resulta conveniente, los grupos de captura pueden comprender otras superficies ligantes. Por ejemplo, puede unirse químicamente estreptavidina a una superficie, tal como la superficie interior de un tubo. En este caso, la mezcla de perlas amplificadas puede hacerse fluir a través del tubo. Las perlas con amplicón ligado tenderán a resultar retenidas hasta la "disociación" mientras que las perlas vacías fluirán a través del tubo. Esta disposición puede resultar particularmente ventajosa para la automatización del procedimiento de preparación de perlas.

Aunque las realizaciones descritas anteriormente resultan particularmente útiles, pueden contemplarse otros métodos para separar perlas. Por ejemplo, las perlas de captura pueden marcarse con un grupo fluorescente que provocaría que el complejo de perla de captura de diana fuese fluorescente. El complejo de perla de captura de diana puede separarse mediante citometría de flujo o con un separador celular de fluorescencia. La utilización de perlas de captura de gran tamaño permitiría la separación mediante filtración u otras técnicas de separación basadas en el tamaño de partícula. Debido a que las perlas tanto de captura como con diana son capaces de formar complejos con varias perlas, resulta posible aglutinar una masa de perlas de captura de diana entrecruzadas. El gran tamaño de la masa aglutinada permitiría la separación mediante el simple lavado de las perlas vacías no aglutinadas. Los métodos descritos se describen en mayor detalle en, por ejemplo, Bauer J., *J. Chromatography B*, 722:55-69, (1999), y en Brody *et al.*, *Applied Physics Lett.* 74:144-146, (1999).

En una realización, la invención comprende un método para amplificar uno o más ácidos nucleicos, que comprende las etapas siguientes: a) formar una emulsión de agua en aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos, en la que por lo menos uno de los microrreactores comprende un único ácido nucleico molde, una única perla capaz de unirse al ácido nucleico, uniéndose el molde monocatenario a la perla antes de formar la emulsión y solución de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos, b) amplificar los ácidos nucleicos en los microrreactores para formar copias amplificadas de los ácidos nucleicos mediante amplificación asimétrica, y c) unir las copias amplificadas a las perlas en los microrreactores, y tal como se define adicionalmente en la reivindicación 1.

La solución de reacción de amplificación utilizada con este método es una solución de reacción en cadena de polimerasa que comprende nucleótidos trifosfato, una polimerasa termoestable, y ácidos nucleicos cebadores suspendidos en un tampón compatible con condiciones de reacción en cadena de polimerasa. La reacción en cadena de polimerasa es una reacción en cadena de polimerasa asimétrica. La amplificación puede llevarse a cabo mediante amplificación en flujo continuo.

Para la utilización con este método, una mayoría de los microrreactores puede incluir un único ácido nucleico. El método puede ponerse en práctica con por lo menos 10.000 ácidos nucleicos, o con por lo menos 50.000 ácidos nucleicos. Cada perla utilizada con el método puede utilizarse para capturar más de 10.000 copias de amplificación de un ácido nucleico molde. En diversas realizaciones, la emulsión contiene además estabilizantes de emulsión. Los estabilizantes de emulsión pueden ser Atlox 4912, Span 80 o combinaciones o mezclas de los mismos. La emulsión puede ser estable frente al calor, por ejemplo a 95°C, y puede formarse mediante la adición gota a gota a un aceite de los ácidos nucleicos molde, perlas y la solución de reacción de amplificación. Los microrreactores pueden presentar un tamaño medio de entre 50 y 250 µm de diámetro.

La invención también comprende un método para amplificar un ácido nucleico, que comprende las etapas siguientes: a) proporcionar un ácido nucleico molde monocatenario que debe amplificarse, b) proporcionar un material de soporte sólido que comprende una perla generalmente esférica que presenta un diámetro de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 µm, en donde la perla es capaz de unirse al ácido nucleico molde, c)

mezclar el ácido nucleico molde y la perla en una solución de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en una emulsión de agua en aceite, uniéndose el molde a la perla antes de formar la emulsión; d) amplificar asimétricamente el ácido nucleico molde para formar copias amplificadas del ácido nucleico molde, y e) unir las copias amplificadas a la perla, y tal como se define adicionalmente en la reivindicación 14.

Opcionalmente, el método puede incluir una etapa de enriquecimiento para aislar perlas que se unen a copias amplificadas del ácido nucleico separándolas de perlas a las que no se ha unido ácido nucleico. Esta etapa de enriquecimiento puede llevarse a cabo mediante electroforesis, separación celular o purificación de afinidad (por ejemplo con perlas magnéticas que se ligan ácido nucleico). Preferentemente, por lo menos 100.000 copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla, por lo menos 1.000.000 copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla, o por lo menos 1 a 20.000.000 copias de cada molécula de ácido nucleico diana se unen a cada perla. En diversos aspectos, las perlas son perlas de sefarosa y las copias amplificadas se unen a las perlas mediante una pareja de unión, tal como antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, polihistidina/níquel o avidina/biotina. El método también puede incluir las etapas siguientes: f) separar las perlas que portan molde y perla magnética, y g) eliminar las perlas magnéticas utilizando un campo magnético. Esta separación puede conseguirse mediante incubación a una temperatura superior a 45°C o mediante incubación de las perlas portadoras de molde y las perlas magnéticas en una solución con un pH básico.

La divulgación comprende además un kit para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos de un ácido nucleico molde que comprende: a) una perla de captura de ácidos nucleicos, b) un aceite de emulsión, c) uno o más estabilizantes de emulsión, y d) instrucciones para utilizar el kit según los métodos proporcionados en las reivindicaciones 1 a 14 adjuntas.

Además, la invención comprende un método para producir una población clonal de ácidos nucleicos, que comprende: a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos molde monocatenarios de longitud comprendida entre 50 y 800 pb y perlas capaces de unirse a los ácidos nucleicos molde, b) mezclar los ácidos nucleicos molde y las perlas en una solución de reacción biológica que contiene reactivos necesarios para amplificar los ácidos nucleicos molde, y c) formar una emulsión para crear una pluralidad de microrreactores que comprenden los ácidos nucleicos molde, perlas y solución de reacción biológica, uniéndose el molde a la perla antes de formar la emulsión, en donde por lo menos uno de los microrreactores comprende un único ácido nucleico molde y una única perla encapsulada en la solución de reacción biológica, en donde los microrreactores se encuentran contenidos en el mismo recipiente, y tal como se define adicionalmente en la reivindicación 24.

Según este método, los ácidos nucleicos pueden transcribirse y traducirse para generar por lo menos 10.000 copias de un producto de expresión. El producto de expresión puede unirse a las perlas mediante una pareja de unión seleccionada de entre el grupo que consiste de parejas de unión antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, 6Xhis/níquel-ácido nitrilotriacético y etiqueta FLAG/anticuerpo FLAG. En determinados aspectos, el método produce una población clonal de proteínas, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos manipulados. La emulsión puede comprender una pluralidad de microrreactores termoestables, en la que los microrreactores presentan un diámetro de entre 50 y 200 μm y comprende una solución de reacción biológica. La solución de reacción biológica puede comprender reactivos para llevar a cabo reacciones de amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa o reacciones acopladas de transcripción y traducción. Preferentemente, una pluralidad de microrreactores comprende un ácido nucleico molde, por ejemplo uno o menos ácidos nucleicos molde, y uno o menos perlas que se unen a los ácidos nucleicos molde.

Ejemplos

PCR EN EMULSIÓN DE PERLAS

Los procedimientos siguientes, incluyendo la captura del ADN molde, la amplificación del ADN, y la recuperación de las perlas unidas al molde amplificado, pueden llevarse a cabo en un único tubo. El formato de emulsión garantiza la separación física de las perlas en "microrreactores" de entre 100 y 200 μm dentro de este único tubo, permitiendo de esta manera la amplificación clonal de los diversos moldes. La inmovilización del producto de amplificación se lleva a cabo mediante la extensión del molde a lo largo de los oligonucleótidos unidos a las perlas de captura de ADN. Típicamente, el número de copia del molde inmovilizado se encuentra comprendido entre 10 y 30 millones de copias por perla. Las perlas de captura de ADN con fijación de múltiples copias de una única especie de ácido nucleico molde se encuentran listas para la distribución en PTPs.

Los 300.000 pocillos de 75 picolitros grabados en la superficie de la PTP proporcionan una matriz única para la secuenciación de ADNs molde cortos de una manera masivamente paralela, eficiente y económica. Sin embargo, ello requiere cantidades bastante grandes (millones de copias) de moldes clonales en cada pocillo de reacción. Los métodos de la invención permiten al usuario amplificar clonalmente especies de molde genómico monocatenarias mediante reacciones de PCR llevadas a cabo en tubos estándares o en placas de microtitulación. Pueden mezclarse copias únicas de las especies de molde y unirse a perlas de captura, resuspenderse en solución de amplificación por PCR completa y emulsionarse en microrreactores (de entre 100 y 200 μm de diámetro), después de lo cual la

amplificación por PCR asimétrica genera una amplificación de 10^7 veces de la especie de molde inicial. Este procedimiento resulto mucho más simple y más económico que los métodos anteriores.

Ejemplo 1: unión de ácido nucleico molde a perlas de captura

El presente ejemplo describe la preparación de una población de perlas que preferentemente presenta únicamente un ácido nucleico molde unido a las mismas. La amplificación clonal con éxito depende de la administración de un número controlado de especies molde (0,5 a 1) en cada perla. La administración de un exceso de especies puede resultar en la amplificación por PCR de una población mixta de moldes, evitando la generación de datos de secuencia con sentido, mientras que una deficiencia de especies resultará en que menos pocillos contendrán molde para la secuenciación. Esto puede reducir el grado de cobertura del genoma proporcionado por la etapa de secuenciación. En consecuencia, resulta preferente que se determine con exactitud la concentración de molde mediante cuantificación replicada y que se siga el protocolo de unión tal como se describe de manera general posteriormente.

Control de calidad de los moldes

El éxito de la reacción de PCR en emulsión se relaciona con la calidad de las especies de molde. Con independencia del cuidado y atención prestados a la etapa de amplificación, los moldes de mala calidad impedirán la amplificación exitosa y la generación de datos de secuencia con sentido. Para evitar la pérdida innecesaria de tiempo y dinero, resulta importante comprobar la calidad del material de molde antes de iniciar la etapa de PCR en emulsión del procedimiento. Preferentemente, la biblioteca debe pasar dos etapas de control de calidad antes de que se utilice en la PCR en emulsión. Debería determinarse su concentración y la distribución de los productos que contiene. Idealmente, la biblioteca debería ser una población heterogénea de fragmentos con pocos o ningún dímero (por ejemplo ~90 bases) adaptador visible. Además, la amplificación con cebadores de PCR debería resultar en una extensión del producto comprendida entre, por ejemplo, 300 y 500 pb. La ausencia de producto de amplificación podría reflejar la incapacidad de ligar correctamente los adaptadores al molde, mientras que la presencia de una única banda de cualquier tamaño podría reflejar la contaminación del molde.

Preparación de la solución de PCR

La consideración principal en esta etapa es evitar la contaminación de la mezcla de reacción de PCR con amplicones dispersos. La contaminación de las reacciones de PCR con un amplicón residual es una de las cuestiones críticas que pueden provocar el fracaso de una secuenciación. Para reducir la posibilidad de contaminación, deberían seguirse prácticas adecuadas en el laboratorio y la preparación de la mezcla de reacción debería llevarse a cabo en una sala limpia en una campana de flujo laminar tratada por UV.

Mezcla de reacción de PCR

Para 200 μ l de mezcla de reacción de PCR (suficiente para amplificar 600.000 perlas), se combinaron los reactivos siguientes en un tubo de PCR de 0,2 ml:

Tabla 3

	Solución madre	Final	Microlitros
Tampón HIFI	10X	1X	20
nucleótidos tratados	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	al 10%	al 0,1%	2
Tween 80	al 1%	al 0,01%	2
Ppasa	2 U	0,003 U	0,333333
Cebador MMP1a	100 μ M	0,625 μ M	1,25
Cebador MMP1b	10 μ M	0,078 μ M	1,56
Polimerasa Taq	5 U	0,2 U	8
Agua			136,6
Total			200

El tubo se agitó con vórtex intensamente y se almacenó en hielo hasta la hibridación de las perlas con molde.

Perlas de captura de ADN

- Se transfirieron 600.000 perlas de captura de ADN desde el tubo de solución madre hasta un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. La cantidad exacta utilizada dependía de la concentración en perlas de reactivo

formalizado.

2. Las perlas se peletizaron en una minicentrífuga de laboratorio y se separó el sobrenadante.
- 5 3. Se llevaron a cabo las etapas 4 a 11 en una sala limpia de PCR.
4. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de hibridación 1X.
- 10 5. Las perlas de captura se peletizaron en la microcentrífuga. El tubo se giró 180° y se centrifugó nuevamente.
6. La totalidad excepto 10 µl del sobrenadante se extrajeron del tubo que contenía las perlas. Las perlas no resultaron perturbadas.
- 15 7. Se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X y esta mezcla se incubó durante 1 minuto. A continuación, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 5.
8. Se extrajo del tubo la totalidad del material excepto aproximadamente 100 µl.
- 20 9. Las perlas restantes y la solución se transfirieron a un tubo de PCR.
10. El tubo de 1,5 ml se lavó con 150 µl de tampón de hibridación 1X mediante pipeteado varias veces. Se añadió lo anterior al tubo de PCR que contenía las perlas.
- 25 11. Las perlas se peletizaron tal como en la etapa 5 y se extrajo la totalidad excepto 10 µl de sobrenadante, procurando no perturbar el pellet de perlas.
12. Se extrajo una alícuota de ADN molde monocatenario cuantificado (ADNsst). La concentración final era de 200.000 moléculas de ADNsst/µl.
- 30 13. Se añadieron 3 µl del ADNsst diluido al tubo de PCR que contenía las perlas. Esto era equivalente a 600.000 copias de ADNsst.
14. El tubo se agitó con vórtex suavemente para mezclar el contenido.
- 35 15. El ADNsst se hibridó a las perlas de captura en un termociclador de PCR con el programa 80Anneal almacenado en la carpeta EPCR del termociclador MJ, utilizando el protocolo siguiente:
 - 5 minutos a 65°C,
 - 40 • reducción de 0,1°C/s hasta 60°C,
 - mantenimiento a 60°C durante 1 minuto,
 - 45 • reducción de 0,1°C/s hasta 50°C,
 - mantenimiento a 50°C durante 1 minuto,
 - reducción de 0,1°C/s hasta 40°C,
 - 50 • mantenimiento a 40°C durante 1 minuto,
 - reducción de 0,1°C/s hasta 20°C, y
 - mantenimiento a 10°C hasta la etapa siguiente.
- 55 En la mayoría de casos, las perlas se utilizaron para la amplificación inmediatamente después de la unión de molde. En el caso de que las perlas no se utilizaran inmediatamente, deberían almacenarse en la solución de molde a 4°C hasta necesitarlas. Tras el almacenamiento, las perlas se trataron de la manera siguiente.
- 60 16. Tal como en la etapa 6, las perlas se extrajeron del termociclador, se centrifugaron y se extrajo el tampón de hibridación sin perturbar las perlas.
17. Las perlas se almacenaron en un cubo de hielo hasta la emulsificación (Ejemplo 2).
- 65 18. Las perlas de captura incluían, de media, 0,5 a 1 copias de ADNsst unido a cada perla, y se encontraban listas

para la emulsificación.

Ejemplo 2: emulsificación

5 El presente ejemplo describe cómo crear una emulsión de agua en aceite termoestable que contiene aproximadamente 3.000 microrreactores de PCR por microlitro. A continuación se describe de manera general un protocolo para la preparación de la emulsión.

- 10 1. Se añadieron 200 µl de solución de PCR a las 600.000 perlas (ambos componentes del Ejemplo 1).
2. La solución se pipeteó varias veces para resuspender las perlas.
3. Se dejó incubar la mezcla de perlas para PCR a temperatura ambiente durante 2 minutos para equilibrar las perlas con la solución de PCR.
- 15 4. Se añadieron 400 µl de aceite de emulsión a un tubo de microcentrífuga de 2 ml irradiado con UV.
5. Se añadió una barra de agitación magnética de 1/4" "libre de amplicones" al tubo de aceite de emulsión.

20 Se preparó una barra de agitación libre de amplicones de la manera siguiente. Se utilizó una barra de agitación grande para sostener una barra de agitación de 1/4". A continuación, la barra de agitación:

- se lavó con DNA-Off (por goteo o por pulverización),
 - 25 • se enjuagó con agua picopura,
 - se secó con el borde de una toalla de papel Kimwipe, y
 - se irradió con UV durante 5 minutos.
- 30 6. Se extrajo la inserción magnética de un soporte de tubos Dynal MPC-S. El tubo de aceite de emulsión se acopló al soporte para tubos. El tubo se fijó en el centro de una placa de agitación con el dial a 600 rpm.
- 35 7. El tubo se agitó con vórtex intensamente para resuspender las perlas. Esto garantizó que se producía una agregación mínima de las perlas.
8. Utilizando una pipeta P-200, se añadió gota a gota la mezcla de perlas para PCR al aceite bajo agitación a una tasa de aproximadamente una gota cada 2 segundos, permitiendo que cada gota bajase hasta el nivel de la barra de agitación magnética y se emulsificase antes de añadir la gota siguiente. La solución se convirtió en un líquido blanco lechoso homogéneo con una viscosidad similar a la mayonesa.
- 40 9. Tras la adición de la mezcla de perlas para PCR entera, se dieron unos cuantos golpecitos al tubo de microcentrífuga para mezclar cualquier aceite en la superficie de la emulsión lechosa.
- 45 10. Se continuó con la agitación durante 5 minutos más.
11. Se repitieron las etapas 9 y 10.
- 50 12. Se extrajo la barra de agitación del material emulsificado extrayéndolo del tubo con una barra de agitación más grande.
13. Se extrajeron 10 µl de la emulsión y se situaron sobre un portaobjetos de microscopía. Se cubrió la emulsión con un cubreobjetos y se inspeccionó la emulsión a una magnificación de 50X (ocular de 10X y lente objetivo de 5X). Se esperaba que una "buena" emulsión incluyese principalmente perlas individuales en gotas aisladas (microrreactores) de solución de PCR en aceite.
- 55 14. Se preparó una mezcla de aceite en emulsión adecuada con estabilizantes de emulsión, de la manera siguiente. Los componentes de la mezcla en emulsión se muestran en la Tabla 4.

60

Tabla 4

Ingrediente	Cantidad requerida	Fuente	Número de ref.
Aceite mineral ligero de Sigma	94,5 g	Sigma	M-5904
Atlox 4912	1 g	Uniqema	NA
Span 80	4,5 g	Uniqema	NA

5 La mezcla de aceite en emulsión se preparó mediante precalentamiento de Atlox 4912 a 60°C en un baño de agua. A continuación, se añadieron 4,5 gramos de Span 80 a 94,5 gramos de aceite mineral para formar una mezcla. A continuación, se añadió a la mezcla un gramo del Atlox 4912 precalentado. Las soluciones se introdujeron en un recipiente cerrado y se mezclaron mediante agitación e inversión. Cualquier indicio de que Atlox sedimentaba o solidificaba se remedió mediante calentamiento de la mezcla a 60°C, seguido de agitación adicional.

Ejemplo 3: amplificación

10 El presente ejemplo describe la amplificación del ADN molde en la mezcla en emulsión de perlas. Según el presente protocolo de la invención, la duración de la etapa de amplificación del ADN del procedimiento es de entre 3 y 4 horas. Tras completar la amplificación, la emulsión puede dejarse en el termociclador durante 12 horas como máximo antes de iniciar el procedimiento de aislamiento de las perlas. Se llevó a cabo el termociclado de PCR introduciendo 50 a 100 µl de la mezcla de reacción emulsificada en cámaras de reacción PCR individuales (es decir, tubos para PCR). Se llevó a cabo la PCR de la manera siguiente:

- 15 1. Se transfirió la emulsión en cantidades de entre 50 y 100 µl a aproximadamente 10 tubos para PCR individuales o a una placa de 96 pocillos utilizando una única punta de pipeta. Para esta etapa, la emulsión de agua en aceite era altamente viscosa.
- 20 2. Se selló la placa, o se cerraron los tubos para PCR con los tapones, y los recipientes se introdujeron en un termociclador MJ con o sin adaptador de placa de 96 pocillos.
3. El termociclador de PCR se programó para que ejecutase el programa siguiente:
 - 25 • 1 ciclo (4 minutos a 94°C) - inicio en caliente,
 - 40 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 90 segundos a 68°C),
 - 30 • 25 ciclos (30 segundos a 94°C, 6 minutos a 58°C), y
 - almacenamiento a 14°C.
4. Tras completar la reacción de PCR, el material amplificado se extrajo con el fin de llevar a cabo la rotura de la emulsión y la recuperación de las perlas.

Ejemplo 4: rotura de la emulsión y recuperación de las perlas

40 El presente ejemplo describe cómo romper la emulsión y recuperar las perlas con molde amplificado sobre las mismas. Preferentemente, la emulsión posterior a la PCR debe seguir intacta. La fase inferior de la emulsión debería, según la inspección visual, seguir siendo una suspensión blanca lechosa. En el caso de que la solución se transparente, la emulsión podría haberse resuelto parcialmente en sus fase acuosa y aceitosa, y probablemente muchas de las perlas presentarán una mezcla de moldes. En el caso de que la emulsión se haya roto en uno o dos de los tubos, estas muestras no deberían agruparse con las demás. En el caso de que la emulsión se haya roto en todos los tubos, no debería continuarse el procedimiento.

- 45 1. Todas las reacciones de PCR a partir de la muestra original de 600 µl se agruparon en un único tubo de microcentrifugación de 1,5 ml utilizando una única punta de pipeta. Tal como se ha indicado anteriormente, la emulsión era bastante viscosa. En algunos casos, se repitió el pipeteado varias veces para cada tubo. Se transfirió la máxima cantidad posible de material al tubo de 1,5 ml.
- 50 2. El material emulsificado restante se recuperó de cada tubo para PCR mediante la adición de 50 µl de aceite mineral Sigma en cada muestra. Utilizando una única punta de pipeta, se mezcló cada tubo mediante pipeteado varias veces para resuspender el material restante.
- 55 3. Este material se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía la mayor parte del material emulsificado.
4. La muestra se agitó con vórtex durante 30 segundos.
- 60 5. La muestra se agitó durante 20 minutos en el tubo de microcentrífuga de laboratorio a 13,2 Krpm en la microcentrífuga Eppendorf.
6. La emulsión se separó en dos fases con una gran interfase blanca. Se extrajo la máxima cantidad posible de la fase superior de aceite transparente. El material turbio se dejó en el tubo. Con frecuencia, una capa blanca separaba las capas aceitosa y acuosa. Con frecuencia se observaron perlas peletizadas en el fondo del tubo.

65

7. Se eliminó la capa acuosa en la parte superior de las perlas y se guardó para su análisis (análisis en gel, Agilent 2100, y Taqman). En el caso de que persistiese una interfase de material blanco en la parte superior de la capa acuosa, se extraían 20 microlitros de la capa acuosa subyacente. Esto se llevó a cabo atravesando el material de la interfase con una punta de pipeta y succionando la solución de la parte inferior.
8. En la campana de humos de la sala de fabricación de PTP y de química superficial, se añadió 1 ml de hexanos al resto de la emulsión.
9. La muestra se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto.
10. En la campana de humos de la sala de fabricación de PTP y química superficial, se extrajo la fase superior de aceite/hexano y se introdujo en el recipiente para residuos orgánicos.
11. Se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X en etanol al 80% a la fase acuosa restante, interfase y perlas.
12. La muestra se agitó con vórtex durante 1 minuto o hasta la disolución de la sustancia blanca.
13. La muestra se centrifugó durante 1 minuto a alta velocidad. El tubo se hizo girar 180 grados y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto. Se extrajo el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas.
14. Las perlas se lavaron con 1 ml de tampón de hibridación 1X que contenía Tween-20 al 0,1% y se repitió esta etapa.

Ejemplo 5: extracción de cadenas únicas e hibridación de cebadores

- En el caso de que las perlas deban utilizarse en una reacción de secuenciación basada en pirofosfato, resulta necesario eliminar la segunda cadena del producto de PCR e hibridar un cebador de secuenciación al molde de una sola cadena que se encuentra unido a la perla. El presente ejemplo describe un protocolo para llevar a cabo lo anterior.
1. Las perlas se lavaron con 1 ml de agua y se centrifugaron dos veces durante 1 minuto. El tubo se hizo girar 180° entre centrifugaciones. Tras la centrifugación, se eliminó la fase acuosa.
 2. Las perlas se lavaron con 1 ml de EDTA 1 mM. El tubo se centrifugó tal como en la etapa 1 y se eliminó la fase acuosa.
 3. Se añadió 1 ml de NaOH 0,125 M y se incubó la muestra durante 8 minutos.
 4. La muestra se agitó con vórtex brevemente y se introdujo en una microcentrífuga.
 5. Tras 6 minutos, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1 y se eliminó la máxima cantidad posible de solución.
 6. Al completarse la incubación de 8 minutos con NaOH, se añadió 1 ml de tampón de hibridación 1X.
 7. La muestra se agitó con vórtex brevemente, y las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1. Se eliminó la máxima cantidad posible de sobrenadante y se añadió 1 ml adicional de tampón de hibridación 1X.
 8. La muestra se agitó con vórtex brevemente, las perlas se peletizaron tal como en la etapa 1, y se extrajeron 800 µl de tampón de hibridación 1X.
 9. Las perlas se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml.
 10. Las perlas se transfirieron y se eliminó la máxima cantidad posible de tampón de hibridación, sin perturbar las perlas.
 11. Se añadieron 100 µl de tampón de hibridación 1X.
 12. Se añadieron 4 µl de cebador de secuenciación 100 µM. La muestra se agitó con vórtex inmediatamente antes de la hibridación.
 13. La hibridación se llevó a cabo en un termociclador MH utilizando el programa "80Anneal".
 14. Las perlas se lavaron tres veces con 200 µl de tampón de hibridación 1X y se resuspendieron con 100 µl de tampón de hibridación 1X.

15. Las perlas se contaron en un hemocitómetro Hausser. Típicamente se recuperaron entre 300.000 y 500.000 perlas (3.000 a 5.000 perlas/ μ l).

16. Las perlas se almacenaron a 4°C y podrían utilizarse para la secuenciación durante 1 semana.

Ejemplo 6: etapa opcional de enriquecimiento

Las perlas se enriquecieron para perlas que contienen amplicón utilizando el procedimiento siguiente. El enriquecimiento no resulta necesario, pero podría utilizarse para hacer más eficientes técnicas posteriores de biología molecular, tales como la secuenciación de ADN.

Se añadieron cincuenta microlitros de cebador de secuenciación-biotina 10 μ M (total: 500 pmoles) a las perlas de sefarosa que contenía amplicones del Ejemplo 5. Las perlas se introdujeron en un termociclador. El cebador fue hibridado con el ADN en la perla por el programa de hibridación del termociclador del Ejemplo 2.

Tras la hibridación, las perlas de sefarosa se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1%. Las perlas, que ahora contienen fragmentos de ADNss hibridados con cebadores de secuenciación-biotina, se concentraron mediante centrifugación y se resuspendieron en 200 μ l de tampón de unión BST. Se añadieron 10 microlitros de 50.000 unidades/ml de polimerasa Bst a las perlas resuspendidas y se introdujo el recipiente que contenía las perlas en un agitador durante cinco minutos. Se añadieron dos microlitros de mezcla de dNTP 10 mM (es decir, 2,5 μ l de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP 10 mM) y la mezcla se incubó durante 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación.

Cincuenta microlitros de perlas Dynal recubiertas de estreptavidina (Dynal Biotech INC., Lake Success, NY; perlas M270 o MyOne™ a una concentración de 10 mg/ml) se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1%. A continuación, se añadió la mezcla de perlas Dynal a las perlas de sefarosa resuspendidas. La mezcla se agitó con vórtex y se introdujo en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Las perlas se recogieron en el fondo del tubo de ensayo mediante centrifugación a 2.300 g (500 rpm para la centrífuga Eppendorf 5415D). Las perlas se resuspendieron en el volumen original de tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1%. La mezcla, en un tubo de ensayo, se introdujo en un separador magnético (Dynal). Las perlas se lavaron tres veces con tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1% y se resuspendieron en el volumen original en el mismo tampón. Las perlas sin amplicones se eliminaron mediante etapas de lavado, tal como se ha indicado anteriormente. Únicamente se retuvieron las perlas de sefarosa que contenían los fragmentos de ADN apropiados.

Las perlas magnéticas se separaron de las perlas de sefarosa mediante la adición de 500 μ l de NaOH 0,125 M. La mezcla se agitó con vórtex y se separaron las perlas magnéticas mediante separación magnética. Las perlas de sefarosa que quedaban en solución se transfirieron a otro tubo y se lavaron con 400 μ l de Tris-acetato 50 mM hasta estabilizar el pH a 7,6.

Ejemplo 7: secuenciación de ácidos nucleicos mediante PCR en emulsión de perlas

Se llevó a cabo el experimento siguiente para someter a ensayo la eficacia de la PCR en emulsión de perlas. Para el presente protocolo, se unieron covalentemente 600.000 perlas de sefarosa, con un diámetro medio de entre 25 y 35 μ m (tal como son suministradas por el fabricante) a cebadores de captura a una proporción de 30 a 50 millones de copias por perla. Las perlas con cebadores de captura covalentemente unidos se mezclaron con 1,2 millones de copias de ADN monocatenario de una biblioteca de adenovirus. Los constructos de biblioteca incluían una secuencia que era complementaria al cebador de captura en las perlas.

La biblioteca de adenovirus se hibridó a las perlas utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. A continuación, las perlas se resuspendieron en solución de PCR completa. La solución de PCR y las perlas se emulsionaron en 2 volúmenes de aceite de emulsificación bajo centrifugación utilizando el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Las perlas emulsificadas (encapsuladas) se sometieron a amplificación mediante PCR tal como se indica de manera general en el Ejemplo 3. La emulsión se rompió tal como se indica de manera general en el Ejemplo 4. El ADN en las perlas se separó en cadenas individuales, y se hibridó cebador de secuenciación utilizando el procedimiento del Ejemplo 5.

A continuación, se secuenciaron 70.000 perlas simultáneamente mediante secuenciación basada en pirofosfato utilizando un secuenciador pirofosfato de 454 Life Sciences (New Haven, CT) (ver solicitud copendiente de Lohman *et al.*, presentada simultáneamente con la presente, titulada "Methods of Amplifying and Sequencing Nucleic Acids", USSN 60/476, presentada el 6 de junio de 2003). Se secuenciaron múltiples lotes de 70.000 perlas y los datos se proporcionan en la Tabla 5, a continuación.

Tabla 5

Tolerancia de error de alineación	Alineaciones				Cobertura	Error de lectura inferido
	Ninguna	Individual	Múltiple	Única		
0%	47.916	1.560		1.110	54,98%	0,00%
5%	46.026	3.450		2.357	83,16%	1,88%
10%	43.474	6.001	1	3.742	95,64%	4,36%

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos del análisis BLAST de comparación de las secuencias obtenidas del secuenciador pirofosfato con la secuencia de adenovirus. La primera columna muestra la tolerancia de error utilizada en el programa BLAST. La última columna muestra el error real determinado mediante comparación directa con la secuencia conocida.

PCR EN EMULSIÓN DE PERLAS PARA LA SECUENCIACIÓN DESDE DOS EXTREMOS

Ejemplo 8: control de calidad de moldes

Tal como se ha indicado anteriormente, se ha encontrado que el éxito de la reacción de PCR en emulsión se relaciona con la calidad de la especie molde monocatenaria. Por consiguiente, la calidad del material de molde se evaluó mediante dos controles de calidad independientes antes de iniciar el protocolo de PCR en emulsión. En primer lugar, se corrió una alícuota del molde monocatenario en el 2100 BioAnalyzer (Agilent). Se utilizó un PicoChip de ARN para verificar que la muestra incluía una población heterogénea de fragmentos, de tamaño comprendido entre aproximadamente 200 y 500 bases. En segundo lugar, se cuantificó la biblioteca utilizando el ensayo de fluorescencia RiboGreen en un fluorímetro de placas Bio-Tek FL600. Las muestras que se determinó que presentaban concentraciones de ADN inferiores a 5 ng/μl se consideraron excesivamente diluidas para ser utilizadas.

Ejemplo 9: síntesis de perlas de captura de ADN

Se extrajeron de la columna perlas empaquetadas de una columna de afinidad HP de sefarosa activada con 1 ml de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las perlas de tamaño comprendido entre 30 y 25 μm se seleccionaron mediante pase seriado a través de secciones de filtro de malla de 30 y 25 μm de poro (Sefar America, Depew, NY, USA). Las perlas que pasaron a través del primer filtro, pero que resultaron retenidas por el segundo se recogieron y se activaron tal como se describe en la literatura del producto (Amersham Pharmacia nº de protocolo 71700600AP). Se obtuvieron dos cebadores de captura largos diferentes marcados con amina HEG (hexaetilenglicol), correspondientes al extremo 5' de las cadenas sentido y antisentido del molde que debía amplificarse (espaciadores 5'-amina-3-HEG gcttacctgaccgacctgtgctatcccctgttgctgctc-3'; SEC ID nº 1, y espaciadores 5'-amina-3-HEG ccattccccagctcgtctgcatctgtccctcccctgctc-3'; SEC ID nº 2) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA). Se diseñaron los cebadores para capturar ambas cadenas de los productos de amplificación. Los cebadores de captura se disolvieron en tampón fosfato 20 mM, pH 8,0, para obtener una concentración final de 1 mM. Se unieron tres microlitros de cada cebador a las perlas tamizadas de entre 30 y 25 μm. A continuación, las perlas se almacenaron en un tampón de almacenamiento de perlas (Tris 50 mM, Tween al 0,02% y azida sódica al 0,02%, pH 8). Las perlas se cuantificaron con un hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Ejemplo 10: preparación y formulación de mezcla de reacción PCR

Al igual que con cualquier técnica de amplificación de moléculas individuales, la contaminación de las reacciones con amplicones foráneos o residuales procedentes de otros experimentos podría interferir con una secuenciación. Para reducir la probabilidad de contaminación, se preparó la mezcla de reacción de PCR en una campana de flujo laminar tratada con UV situada en una sala limpia para PCR. Por cada reacción de PCR en una emulsión de 600.000 perlas se mezclaron en un tubo de 1,5 ml los reactivos siguientes: 225 μl de mezcla de reacción (tampón HiFi Platinum 1X (Invitrogen), dNTPs 1 mM, MgSO₄ 2,5 mM (Invitrogen), BSA al 0,1%, Tween al 0,01%, 0,003 U/μl de PPI-asa termoestable (NEB), 0,125 μM de cebador directo (5'-gcttacctgaccgacctgtg-3'; SEC ID nº 3) y 0,125 μM de cebador inverso (5'-ccattccccagctcgtctg-3'; SEC ID nº 4) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA) y 0,2 U/μl de polimerasa Taq Hi-Fi Platinum 0,2 U/μl (Invitrogen). Se extrajeron veinticinco microlitros de la mezcla de reacción y se almacenaron en un tubo individual para PCR de 200 μl para la utilización como control negativo. Se almacenaron en hielo tanto la mezcla de reacción como los controles negativos hasta la utilización.

Ejemplo 11: unión de especies de molde a perlas de captura de ADN

La amplificación clonal con éxito del ADN para la secuenciación se refiere al transporte de un número controlado de especies de molde hasta cada perla. Para los experimentos descritos posteriormente en la presente memoria, se determinó que la concentración de molde diana típica era de 0,5 copias de molde por perla de captura. A esta concentración, la distribución de Poisson dicta que 61% de las perlas no presentan molde asociado, que 30%

presentan una especie de molde y 9% presenta dos o más especies de molde. El transporte de un exceso de especies puede resultar en la unión y posterior amplificación de una población mixta (2 ó más especies) en una perla individual, evitando la generación de datos de secuencia con sentido. Sin embargo, el transporte de un número excesivamente bajo de especies resultará en menos pocillos que contengan molde (una especie por perla), reduciendo el grado de cobertura de la secuenciación. En consecuencia, se consideró que era importante la concentración de molde de la biblioteca monocatenaria.

Se hibridaron moléculas de ácidos nucleicos de molde a cebadores complementarios en las perlas de captura de ADN mediante el método siguiente, puesto en práctica en una campana de flujo laminar tratada con UV. Se transfirieron a un tubo para PCR de 200 μ l seiscientas mil perlas de captura de ADN suspendidas en tampón de almacenamiento de perlas (ver el Ejemplo 9, anteriormente). El tubo se centrifugó en una minicentrífuga de laboratorio durante 10 segundos, se hicieron girar 180° y se centrifugaron durante 10 segundos adicionales para garantizar una formación uniforme del pellet. Se extrajo el sobrenadante y las perlas se lavaron con 200 μ l de tampón de hibridación (Tris 20 mM, pH 7,5 y acetato de magnesio 5 mM). El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos para resuspender las perlas, y las perlas se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se extrajo la totalidad menos 10 μ l del sobrenadante en la parte superior de las perlas, y se añadieron 200 μ l adicionales de tampón de hibridación. Las perlas se agitaron con vórtex nuevamente durante 5 segundos, se dejaron reposar durante 1 minuto y después se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se descartó la totalidad menos 10 μ l del sobrenadante.

A continuación, se añadieron a las perlas 1,5 μ l de 300.000 moléculas/ μ l de biblioteca de moldes. El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos para mezclar el contenido y los moldes se hibridaron a las perlas en un programa de desnaturalización/hibridación controlada en un termociclador MJ. El programa permitió la incubación durante 5 minutos a 80°C, seguido de una reducción de 0,1°C/s hasta 70°C, la incubación durante 1 minuto a 70°C, la reducción de 0,1°C/s hasta 60°C, el mantenimiento a 60°C durante 1 minuto, la reducción de 0,1°C/s hasta 50°C, el mantenimiento a 50°C durante 1 minuto, la reducción de 0,1°C/s hasta 20°C y el mantenimiento a 20°C. Tras completar el procedimiento de hibridación, se extrajeron las perlas del termociclador, se centrifugaron tal como se ha indicado anteriormente y se decantó cuidadosamente el tampón de hibridación. Las perlas de captura incluían, de media, 0,5 copias de ADN molde monocatenario unido a cada perla, y se almacenaron en hielo hasta que fueron utilizadas.

Ejemplo 12: emulsificación

El procedimiento de emulsificación crea una emulsión termoestable de agua en aceite que contiene 10.000 microrreactores de PCR discretos por microlitro. Ésta sirve como matriz para la amplificación clonal de las moléculas individuales de la biblioteca de dianas. La mezcla de reacción y las perlas de captura de ADN para una única reacción se emulsificaron de la manera siguiente. En una campana de flujo laminar tratada con UV, se añadieron 200 μ l de solución para PCR (del Ejemplo 10) al tubo que contenía 600.000 perlas de captura de ADN (del Ejemplo 11). Las perlas se resuspendieron mediante pipeteado repetido. A continuación, se incubó la mezcla de perlas para PCR a temperatura ambiente durante por lo menos 2 minutos, permitiendo que las perlas se equilibrasen con la solución de PCR. Simultáneamente, 450 μ l de aceite de emulsión (Span 80 al 4,5% (p/p), Atlox 4912 al 1% (p/p) (Uniqema, Delaware) en aceite mineral ligero (Sigma)) se dividió en alícuotas en un tubo de centrifuga de 2 ml de tapón plano (Dot Scientific) que contenía una barra de agitación magnética de ¼ pulgada estéril (Fischer). Este tubo seguidamente se introdujo en un dispositivo de soporte de tubos de plásticos diseñado al efecto, que después se centró en una placa caliente de agitación digital Fisher Isotemp (Fisher Scientific) con el dial fijo en 450 rpm.

La solución de perlas para PCR se agitó con vórtex durante 15 segundos para resuspender las perlas. A continuación, la solución se aspiró en una jeringa plástica desechable de 1 ml (Benton, Dickinson) acoplada a una aguja de jeringa de seguridad de plástico (Henry Schein). La jeringa se introdujo en una bomba de jeringa (Cole-Parmer) modificada con una unidad de base de aluminio que orientaba la bomba verticalmente y no horizontalmente (por ejemplo figuras 4 a 6). El tubo con el aceite en emulsión se alineó con la placa de agitación de manera que se encontrase centrado bajo la aguja de la jeringa de plástico y la barra de agitación magnética girase correctamente. Se fijó la bomba de jeringa para que dispensase 0,6 ml a una tasa de 5,5 ml/hora. Se añadió la solución de perlas para PCR al aceite en emulsión gota a gota. Se procuró garantizar que las gotas no entrasen en contacto con las paredes del tubo a medida que caían en el aceite en rotación.

Tras la formación de la emulsión, se procuró minimizar la agitación de la emulsión tanto durante el procedimiento de emulsificación como durante las etapas de división en alícuotas posteriores a la emulsificación. Se encontró que la agitación con vórtex, el pipeteado rápido o la mezcla excesiva podían provocar la rotura de la emulsión, destruyendo los microrreactores discretos. Durante la formación de la emulsión, las dos soluciones se convirtieron en mezclas blancas lechosas homogéneas con la viscosidad de la mayonesa. Se vació el contenido de la jeringa en el aceite en rotación. A continuación, se retiró el tubo de emulsión del dispositivo de soporte y se golpeó suavemente con los dedos hasta desaparecer cualquier capa de aceite residual en la parte superior de la emulsión. Se colocó nuevamente el tubo en el dispositivo de soporte y se agitó utilizando la barra de agitación magnética durante un minuto adicional. Se sacó la barra de agitación de la emulsión pasando una herramienta de extracción magnética

por el exterior del tubo, y se descartó.

Se extrajeron veinte microlitros de la emulsión procedentes de la parte intermedia del tubo mediante la utilización de un pipeteador P100 y se pusieron sobre un portaobjetos de microscopía. Se utilizaron las puntas de pipeta más grandes para minimizar las fuerzas de cizalla. Se inspeccionó la emulsión a una magnificación de 50X para comprobar que comprendía predominantemente perlas individuales en microrreactores de solución para PCR en aceite de 30 a 150 micrómetros de diámetro (figura 7). Tras el examen visual, se amplificaron inmediatamente las emulsiones.

Ejemplo 13: amplificación

La emulsión se dividió en alícuotas en 7 a 8 tubos para PCR separados. Cada tubo incluía aproximadamente 75 μ l de la emulsión. Se sellaron los tubos y se introdujeron en un termociclador MJ conjuntamente con los 25 μ l de control negativo indicados anteriormente. Se utilizaron los tiempos de ciclado siguientes: 1 ciclo de incubación durante 4 minutos a 94°C (inicio en caliente), 30 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C y 150 segundos a 68°C (amplificación), y 40 ciclos de incubación durante 30 segundos a 94°C, y 360 segundos a 68°C (hibridación y extensión). Tras completar el programa de PCR, se extrajeron los tubos y se rompieron inmediatamente las emulsiones o se almacenaron las reacciones a 10°C durante como máximo 16 horas antes de iniciar el procedimiento de rotura.

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

Tras la amplificación, se examinaron las emulsiones para rotura (separación de las fases de aceite y de agua). Las emulsiones no rotas se agruparon en un único tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, mientras que las emulsiones rotas, encontradas ocasionalmente, se descartaron. Debido a que las muestras de emulsión eran bastante viscosas, quedaron cantidades significativas en cada tubo para PCR. La emulsión que quedaba en los tubos se recuperó mediante la adición de 75 μ l de aceite mineral en cada tubo para PCR y el pipeteado de esta mezcla. La mezcla se añadió al tubo de 1,5 ml que contenía la mayor parte del material emulsificado. A continuación, se agitó con vórtex el tubo de 1,5 ml durante 30 segundos. Seguidamente, el tubo se centrifugó durante 20 minutos en la microcentrífuga de laboratorio a 13,2 Krpm (velocidad máxima).

Tras la centrifugación, la emulsión se separó en dos fases con una gran interfase blanca. La fase aceitosa transparente en la parte superior se descartó, mientras que el material turbio de interfase se dejó en el tubo. En una campana de humos química, se añadió 1 ml de hexanos a la fase inferior y a la capa de interfase. La mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto en una microcentrífuga de laboratorio. La fase superior de aceite/hexano se extrajo y se descartó. A continuación, se añadió 1 ml de etanol al 80%/tampón de hibridación 1X a la fase acuosa, interfase y perlas restantes. Esta mezcla se agitó con vórtex durante 1 minuto o hasta que el material blanco de la interfase se hubiese disuelto. Seguidamente la muestra se centrifugó en una microcentrífuga de laboratorio durante 1 minuto a velocidad máxima. Se giró el tubo 180 grados y se centrifugó nuevamente durante un minuto adicional. A continuación, se extrajo cuidadosamente el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas.

El pellet blanco de perlas se lavó dos veces con 1 ml de tampón de hibridación que contenía Tween-20 al 0,1%. Se descartó la solución de lavado y las perlas se peletizaron después de cada lavado tal como se ha indicado anteriormente. El pellet se lavó con 1 ml de agua picopura. Las perlas se peletizaron mediante el método de centrifugación-giro-centrifugación utilizado anteriormente. Se extrajo cuidadosamente la fase acuosa. Seguidamente se lavaron las perlas con 1 ml de EDTA 1 mM tal como se ha indicado anteriormente, excepto que las perlas se agitaron con vórtex brevemente a una velocidad intermedia durante 2 segundos antes de peletizar y retirar el sobrenadante.

El ADN amplificado, inmovilizado sobre las perlas de captura, se sometió a tratamiento para obtener ADN monocatenario. Se extrajo la segunda cadena mediante incubación en una solución de disociación básica. Posteriormente se añadió a las perlas un ml de solución de disociación (NaOH 0,125 M, NaCl 0,2 M). El pellet se resuspendió mediante agitación con vórtex a velocidad intermedia durante 2 segundos y el tubo se introdujo en un agitador orbital para tubos Thermolyne LabQuake durante 3 minutos. A continuación, las perlas se peletizaron tal se ha indicado como anteriormente, y se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se descartó. La solución residual de disociación se neutralizó mediante la adición de 1 ml de tampón de hibridación. Seguidamente, las perlas se agitaron con vórtex a velocidad intermedia durante 2 segundos. Las perlas se peletizaron y el sobrenadante se extrajo tal como se ha indicado anteriormente. Se repitió el lavado con tampón de hibridación, excepto en que únicamente se extrajeron 800 μ l del tampón de hibridación tras la centrifugación. Las perlas y el tampón de hibridación remanente se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml. Las perlas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a 4°C durante, como máximo, 48 horas antes de continuar con el procedimiento de enriquecimiento.

Ejemplo 15: enriquecimiento en perlas

La masa de perlas incluía perlas sin cadenas de ADN inmovilizadas amplificadas, y perlas vacías o nulas. Tal como

se ha indicado anteriormente, se calculó que 61% de las perlas no presentaba ADN molde durante el procedimiento de amplificación. Se realizó un enriquecimiento para aislar selectivamente las perlas que presentaban ADN molde, maximizando de esta manera la eficiencia de la secuenciación. A continuación, se describe el procedimiento de enriquecimiento en detalle.

5 Las perlas con ADN monocatenario del Ejemplo 14 se peletizaron mediante el método de centrifugación-giro-centrifugación y se extrajo la máxima cantidad posible de sobrenadante sin perturbar las perlas. Se añadieron quince microlitros de tampón de hibridación a las perlas, seguido de 2 μ l de cebador de enriquecimiento de 40 bases biotinilado 100 μ M (espacedores 5'-biotina-tetraetilenglicol ccatccccagctcgtcttgccatctgtccctccctgtctcag-3'; SEC ID nº 5). El cebador era complementario a la combinación de sitios de amplificación y secuenciación (cada uno de 20 bases de longitud) en el extremo 3' del molde inmovilizado en una perla. La solución se mezcló con vórtex a velocidad intermedia durante 2 segundos, y los cebadores de enriquecimiento se hibridaron a las cadenas de ADN inmovilizadas utilizando un programa de desnaturalización/hibridación controladas en un termociclador MJ. El programa consistía de los tiempos de ciclado y temperaturas siguientes: incubación durante 30 segundos a 65°C, reducción de 0,1°C/s hasta 58°C, incubación durante 90 segundos a 58°C, y mantenimiento a 10°C.

20 Aunque los cebadores se hibridaban, se resuspendieron las perlas recubiertas de estreptavidina Dynal MyOne™ haciendo girar suavemente los tubos. A continuación, se añadieron 20 μ l de las perlas MyOne™ a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml que contenía 1 ml de líquido potenciador (NaCl 2 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La mezcla de perlas MyOne se agitó con vórtex durante 5 segundos y el tubo se introdujo en un imán MPC-S de Dynal. Las perlas paramagnéticas se peletizaron contra las paredes del tubo de microcentrifuga. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se descartó sin perturbar las perlas MyOne™. Se retiró el tubo del imán y se añadieron 100 μ l de líquido potenciador. El tubo se agitó con vórtex durante 3 segundos para resuspender las perlas y se almacenó en hielo hasta su utilización.

25 Tras completar el programa de hibridación, se añadieron 100 μ l de tampón de hibridación al tubo para PCR que contenía las perlas de captura de ADN y el cebador de enriquecimiento. El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos y el contenido se transfirió a un tubo fresco de microcentrifuga de 1,5 ml. El tubo para PCR en el que se hibridaba el cebador de enriquecimiento con las perlas de captura se lavó una vez con 200 μ l de tampón de hibridación, y se añadió la solución de lavado al tubo de 1,5 ml. Las perlas se lavaron tres veces con 1 ml de tampón de hibridación, se agitaron con vórtex durante 2 segundos y se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante. Tras el tercer lavado, las perlas se lavaron dos veces con 1 ml de líquido potenciador helado. Las perlas se agitaron con vórtex, se peletizaron y se extrajo el sobrenadante tal como se ha indicado anteriormente. Las perlas se resuspendieron en 150 μ l de líquido potenciador helado. El líquido potenciador y la solución de perlas se añadieron a las perlas MyOne™ lavadas.

30 La mezcla de perlas se agitó con vórtex durante 3 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos en un agitador orbital para tubos LabQuake. Las perlas MyOne™ recubiertas de estreptavidina se unieron a los cebadores de enriquecimiento biotinilados que se encontraban hibridados a moldes inmovilizados en las perlas de captura de ADN. A continuación, las perlas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos, después de lo cual se agitaron con vórtex aplicando pulsos de 2 segundos hasta la resuspensión. Las perlas resuspendidas se dejaron sobre hielo durante 5 minutos. Seguidamente, se añadieron 500 μ l de líquido potenciador frío a las perlas y el tubo se insertó en un imán MPC-S de Dynal. Las perlas se dejaron en reposo durante 60 segundos, para permitir que se produjera la peletización contra el imán. A continuación, se retiró cuidadosamente el sobrenadante con exceso de MyOne™ y perlas de captura de ADN nulas y se descartó.

35 El tubo se sacó del imán MPC-S y se añadió 1 ml de líquido potenciador frío a las perlas. Las perlas se resuspendieron con golpecitos suaves de los dedos. Resultaba importante no someter a agitación con vórtex a las perlas en este punto, debido a que la mezcla vigorosa podría romper el enlace entre las perlas MyOne™ y las perlas de captura de ADN. Se devolvieron las perlas al imán y se eliminó el sobrenadante. Este lavado se repitió tres veces más para garantizar la eliminación de todas las perlas de captura nulas. Para extraer los cebadores de enriquecimiento hibridados y las perlas MyOne™, las perlas de captura de ADN se resuspendieron en 400 μ l de solución de disociación, se agitaron con vórtex durante 5 segundos y se peletizaron con el imán. El sobrenadante con las perlas enriquecidas se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml separado. Para la máxima recuperación de perlas enriquecidas, se añadió al tubo que contenía las perlas MyOne™ una segunda alícuota de 400 μ l de solución de disociación. Las perlas se agitaron con vórtex y se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se extrajo el sobrenadante del segundo lavado y se agrupó con el primer bolo de perlas enriquecidas. El tubo de perlas MyOne™ ya utilizadas se descartó.

40 El tubo de microcentrifuga de perlas de captura de ADN enriquecidas se introdujo en el imán MPC-S de Dynal para peletizar cualquier perla MyOne™ residual. Las perlas enriquecidas en el sobrenadante se transfirieron a un segundo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugaron. Se retiró el sobrenadante y las perlas se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón de hibridación para neutralizar la solución residual de disociación. Tras el tercer lavado, se extrajeron 800 μ l del sobrenadante, y las perlas y solución remanentes se transfirieron a un tubo para PCR de 0,2 ml. Las perlas enriquecidas se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos y se decantó el sobrenadante. A

5 continuación, se añadieron 20 µl de tampón de hibridación y 3 µl de dos cebadores de secuenciación 100 µM diferentes (5'-ccatctgttcctccctgtgc-3'; SEC ID nº 6, y 5'-cctatccctgttcgtgtgc-3' fosfato; SEC ID nº 7). El tubo se agitó con vórtex durante 5 segundos y se introdujo en un termociclador MJ para someterlo al programa de hibridación en 4 etapas siguiente: incubación durante 5 minutos a 65°C, reducción de 0,1°C/s hasta 50°C, incubación durante 1 minuto a 50°C, reducción de 0,1°C/s hasta 40°C, mantenimiento a 40°C durante 1 minuto, reducción de 0,1°C/s hasta 15°C y mantenimiento a 15°C.

10 Tras completar el programa de hibridación, se extrajeron las perlas del termociclador y se peletizaron mediante centrifugación durante 10 segundos. Se hizo girar el tubo 180° y se centrifugó durante 10 segundos adicionales. Se decantó el sobrenadante y se descartó, y se añadieron 200 µl de tampón de hibridación al tubo. Las perlas se resuspendieron con una segunda agitación con vórtex de 5 segundos y se peletizaron tal como se ha indicado anteriormente. Se extrajo el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 100 µl de tampón de hibridación. En este punto se cuantificaron las perlas utilizando un contador Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter). Las perlas se almacenaron a 4°C y fueron estables durante por lo menos 1 semana.

15 LISTADO DE SECUENCIA

<110> Berka, Jan

20 Chen, Yi-Ju

Leamon, John H.

Lefkowitz, Steve

25 Lohman, Kenton

Makhijani, Vinod

30 Sarkis, Gary J.

Rothberg, Jonathan

Weiner, Michael

35 Srinivasan, Maithreyan

<120> Amplificación de ácidos nucleicos en emulsión de perlas

40 <130> 21465-508 UTIL

<150> documento US nº 60/443.471

<151> 2003-01-29

45 <150> documento US nº 60/465.071

<151> 2003-04-23

50 <150> documento US nº 60/476.592

<151> 2003-06-06

<150> documento US nº 60/476.504

55 <151> 2003-06-06

<150> documento US nº 60/476.592

60 <151> 2003-06-06

<150> documento US nº 60/476.602

<151> 2003-06-06

65 <150> documento US nº 60/497.985

<151> 2003-08-25
 <160> 7
 5 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido
 20 <400> 1
 gcttacctga ccgacctctg cctatcccct gttgcgtgctc 40
 <210> 2
 25 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 2
 ccattcccca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgctc 40
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Oligonucleótido
 <400> 3
 gcttacctga ccgacctctg 20
 55 <210> 4
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 65 <223> Oligonucleótido

ES 2 338 654 T5

<400> 4
 5 ccatcctcca gctcgtcttg 20
 <210> 5
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido
 <400> 5
 20 ccatcctcca gctcgtcttg ccatctgttc cctccctgtc tcag 44
 <210> 6
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido
 <400> 6
 35 ccatctgttc cctccctgtc 20
 <210> 7
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50 <400> 7
 cctatcccct gttcgtgctc 20

REIVINDICACIONES

1. Método para la amplificación de uno o más ácidos nucleicos sobre una perla, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) formar una emulsión de agua en aceite para crear una pluralidad de microrreactores acuosos, en la que por lo menos uno de los microrreactores comprende un ácido nucleico molde monocatenario, una única perla con una primera población que comprende una pluralidad de moléculas de una primera especie de cebador dispuesta sobre la misma, uniéndose el molde de ácido nucleico monocatenario a la perla antes de formar la emulsión, y una solución de reacción de amplificación que comprende una segunda población que comprende una pluralidad de moléculas de la primera especie de cebador, una pluralidad de moléculas de una segunda especie de cebador, y reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos, en donde la primera especie de cebador es capaz de unirse al ácido nucleico molde monocatenario, la segunda especie de cebador es capaz de unirse a una cadena complementaria del ácido nucleico molde monocatenario, y la concentración de la segunda especie de cebador es mayor que la de la segunda población de la primera especie de cebador en la solución de reacción de amplificación,
 - (b) amplificar asimétricamente el molde de ácido nucleico monocatenario y la cadena complementaria a la cadena molde en la solución de reacción de amplificación, para formar una población de copias amplificadas del ácido nucleico molde monocatenario, en el que la amplificación asimétrica se lleva a cabo mediante reacción en cadena de polimerasa asimétrica; y
 - (c) unir una pluralidad de las copias amplificadas asimétricamente de ácido nucleico molde monocatenario a la primera población de la primera especie de cebador sobre la perla en el microrreactor, en el que una cadena complementaria unida a perla se extiende a partir de la primera especie de cebador.
2. Método según la reivindicación 1, en el que una mayoría de los microrreactores incluye un único ácido nucleico.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha solución de reacción de amplificación es una solución de reacción en cadena de polimerasa que comprende además nucleótidos trifosfato, una polimerasa termoestable, y tampón compatible con las condiciones de reacción en cadena de polimerasa.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha emulsión contiene además estabilizantes de emulsión.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dichos estabilizantes de emulsión se seleccionan de entre el grupo que consiste de Atlox 4912, Span 80 y combinaciones y mezclas de los mismos.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha emulsión es termoestable.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha emulsión es termoestable hasta 95°C.
8. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación se lleva a cabo mediante amplificación en flujo continuo.
9. Método según la reivindicación 1, en el que la emulsión se forma mediante la adición gota a gota de los ácidos nucleicos molde, perlas y solución de reacción de amplificación en un aceite.
10. Método según la reivindicación 1, puesto en práctica con por lo menos 10.000 ácidos nucleicos.
11. Método según la reivindicación 1, puesto en práctica con por lo menos 50.000 ácidos nucleicos.
12. Método según la reivindicación 1, en el que los microrreactores presentan un tamaño medio comprendido entre 50 y 250 μm de diámetro.
13. Método según la reivindicación 1, en el que cada perla se una a más de 10.000 copias amplificadas asimétricamente del ácido nucleico molde monocatenario.
14. Método para la amplificación de un ácido nucleico, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) proporcionar un ácido nucleico molde monocatenario que debe amplificarse;
 - (b) proporcionar un material de soporte sólido que comprende una perla generalmente esférica que presenta un diámetro de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 μm , en el que la perla comprende una pluralidad de moléculas de una primera población de una primera especie de cebador

dispuesta sobre las mismas y que es capaz de unirse al ácido nucleico molde,

- 5 (c) mezclar los ácidos nucleicos de molde y las perlas en una solución de reacción de amplificación que comprende una pluralidad de moléculas de una segunda población de la primera especie de cebador, una segunda especie de cebador y reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en una emulsión de agua en aceite, uniéndose el molde de ácido nucleico monocatenario a la perla antes de formar la emulsión, en donde la primera especie de cebador es capaz de unirse al ácido nucleico molde monocatenario, la segunda especie de cebador es capaz de unirse a una cadena complementaria del ácido nucleico molde monocatenario, y la concentración de la segunda especie de cebador es mayor que la de la segunda población de la primera especie de cebador en la solución de reacción de amplificación,
- 10
- 15 (d) amplificar asimétricamente el ácido nucleico molde monocatenario y la cadena complementaria del ácido nucleico molde monocatenario en la solución de reacción de amplificación presente en la fase acuosa de la emulsión de agua en aceite utilizando la segunda población de la primera especie de cebador y la segunda especie de cebador para formar una población de copias amplificadas del ácido nucleico molde monocatenario, en el que la amplificación asimétrica se lleva a cabo mediante reacción en cadena de polimerasa asimétrica; y
- 20 (e) unir una pluralidad de las copias asimétricamente amplificadas del ácido nucleico molde monocatenario a la primera población de la primera especie de cebador sobre la perla, en donde una cadena complementaria unida a una perla se extiende a partir de la primera especie de cebador.
- 25 15. Método según la reivindicación 1 ó 14, que comprende además la etapa de enriquecer en perlas que se unen a copias amplificadas del ácido nucleico respecto a perlas a las que no se une ningún ácido nucleico, seleccionando la etapa de enriquecimiento de entre el grupo que consiste de purificación por afinidad, electroforesis y separación celular.
- 30 16. Método según la reivindicación 15, en el que la etapa de enriquecimiento se lleva a cabo mediante purificación por afinidad con perlas magnéticas que se unen a ácidos nucleicos.
- 35 17. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que se unen a cada perla por lo menos 100.000 copias de cada molécula de ácido nucleico diana.
- 40 18. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que se unen a cada perla por lo menos 1.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana.
19. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que se unen a cada perla por lo menos 1 a 20.000.000 de copias de cada molécula de ácido nucleico diana.
- 45 20. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que las perlas son perlas de sefarosa.
21. Método según la reivindicación 16, que comprende además las etapas siguientes:
- 50 separar las perlas portadoras de molde y las perlas magnéticas, y extraer las perlas magnéticas con un campo magnético.
22. Método según la reivindicación 21, en el que la separación se lleva a cabo mediante incubación a una temperatura superior a 45°C o mediante la incubación de las perlas portadoras de molde y las perlas magnéticas en una solución con un pH básico.
- 55 23. Método para la producción de una población clonal de ácidos nucleicos, que comprende:
- 60 (a) proporcionar una pluralidad de ácidos nucleicos molde monocatenarios de longitud comprendida entre 150 y 750 pb, y perlas, comprendiendo, cada una, una primera población de una pluralidad de moléculas de una primera especie de cebador dispuesta sobre las mismas,
- 65 (b) mezclar los ácidos nucleicos molde monocatenarios y las perlas en una solución de reacción de amplificación que comprende una segunda población de una pluralidad de moléculas de la primera especie de cebador, una pluralidad de moléculas de una segunda especie de cebador y reactivos necesarios para amplificar los ácidos nucleicos de molde, y una concentración de la segunda especie de cebador superior a la de la segunda población de la primera especie de cebador en la solución de reacción de amplificación, en donde la primera especie de cebador es capaz de unirse al ácido nucleico molde monocatenario y la segunda especie de cebador es capaz de unirse a una cadena complementaria del ácido nucleico molde monocatenario,

- 5 (c) formar una emulsión para crear una pluralidad de microrreactores que comprende ácidos nucleicos molde, perlas y solución de reacción de amplificación, uniéndose el ácido nucleico monocatenario a la perla antes de formar la emulsión, en donde por lo menos uno de los microrreactores comprende un ácido nucleico molde y una única perla encapsulada en la solución de reacción de amplificación, en donde los microrreactores se encuentran contenidos en el mismo recipiente,
- 10 (d) amplificar asimétricamente el ácido nucleico molde monocatenario y la cadena complementaria del ácido nucleico molde monocatenario en la solución de reacción de amplificación utilizando la segunda población de la primera especie de cebador y la segunda especie de cebador para formar una población de copias amplificadas del ácido nucleico molde monocatenario, en el que la amplificación asimétrica se lleva a cabo mediante reacción en cadena de polimerasa asimétrica; y
- 15 (e) unir una pluralidad de las copias amplificadas asimétricamente del ácido nucleico molde monocatenario a la primera población de la primera especie de cebador sobre la perla, en donde se extiende una cadena complementaria unida a perla a partir de la primera especie de cebador.
- 20 24. Método según la reivindicación 23, que comprende además transcribir y traducir los ácidos nucleicos para generar por lo menos 10.000 copias de un producto de expresión.
- 25 25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho producto de expresión se encuentra unido a dichas perlas mediante una pareja de unión seleccionada de entre el grupo que consiste de las parejas de unión antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, 6Xhis/níquel-ácido nitriloacético y etiqueta FLAG/anticuerpo de FLAG.
- 25 26. Método según la reivindicación 24, en el que el método produce una población clonal de proteínas.
- 30 27. Método según la reivindicación 26, en el que las proteínas se seleccionan de entre el grupo que consiste de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos manipulados.
- 35 28. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que el método comprende además las etapas siguientes:
 - romper los microrreactores acuosos para liberar por lo menos una de las perlas unidas a ácido nucleico, comprendiendo la solución de reacción de amplificación productos de amplificación no unidos, y
 - recuperar las perlas unidas a ácido nucleico.
- 40 29. Método según la reivindicación 1 ó 14, en el que, en la etapa (b) o (d), respectivamente, la solución de reacción se encuentra empobrecida en moléculas de la segunda población de la primera especie de cebador.

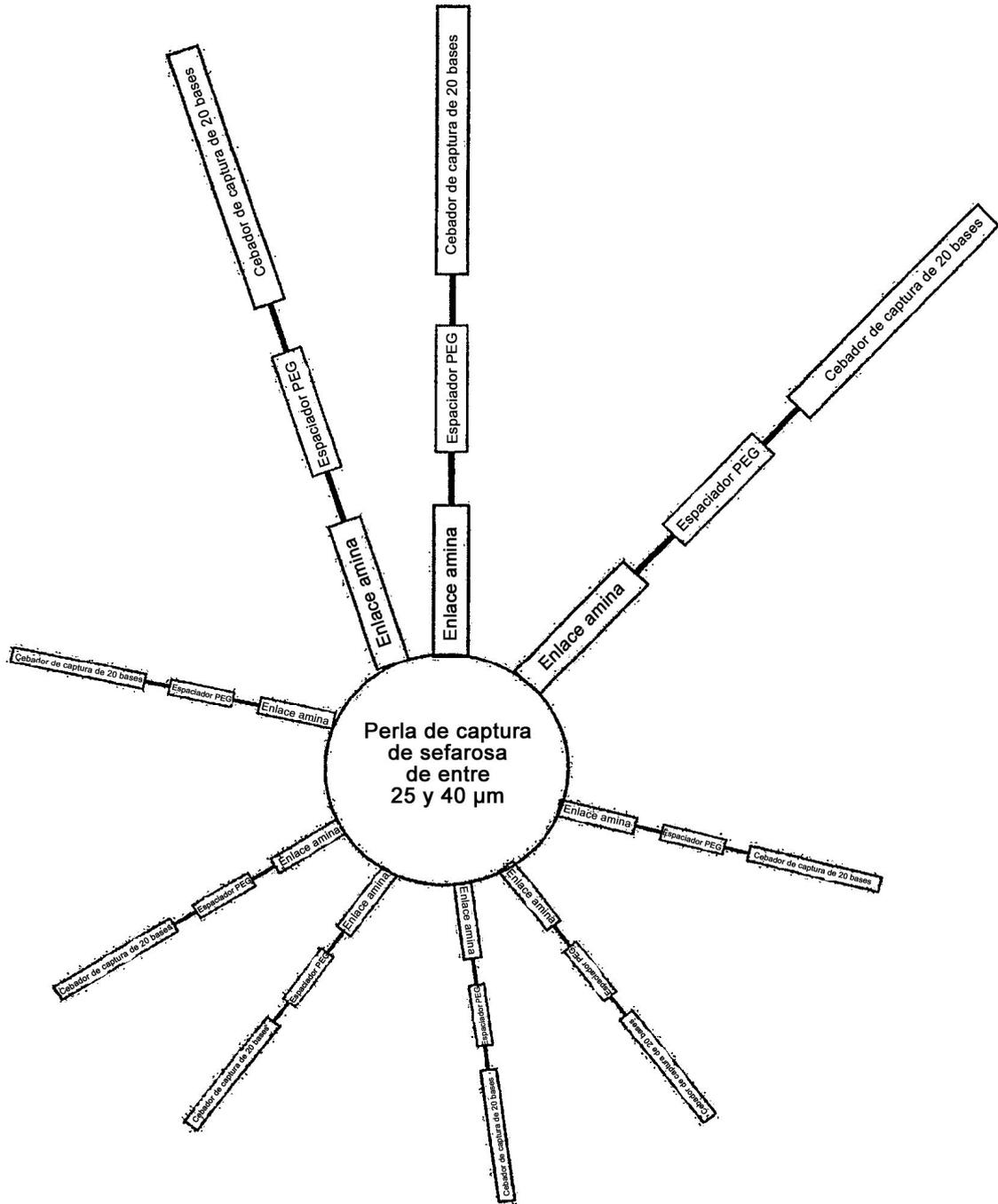


FIG. 1

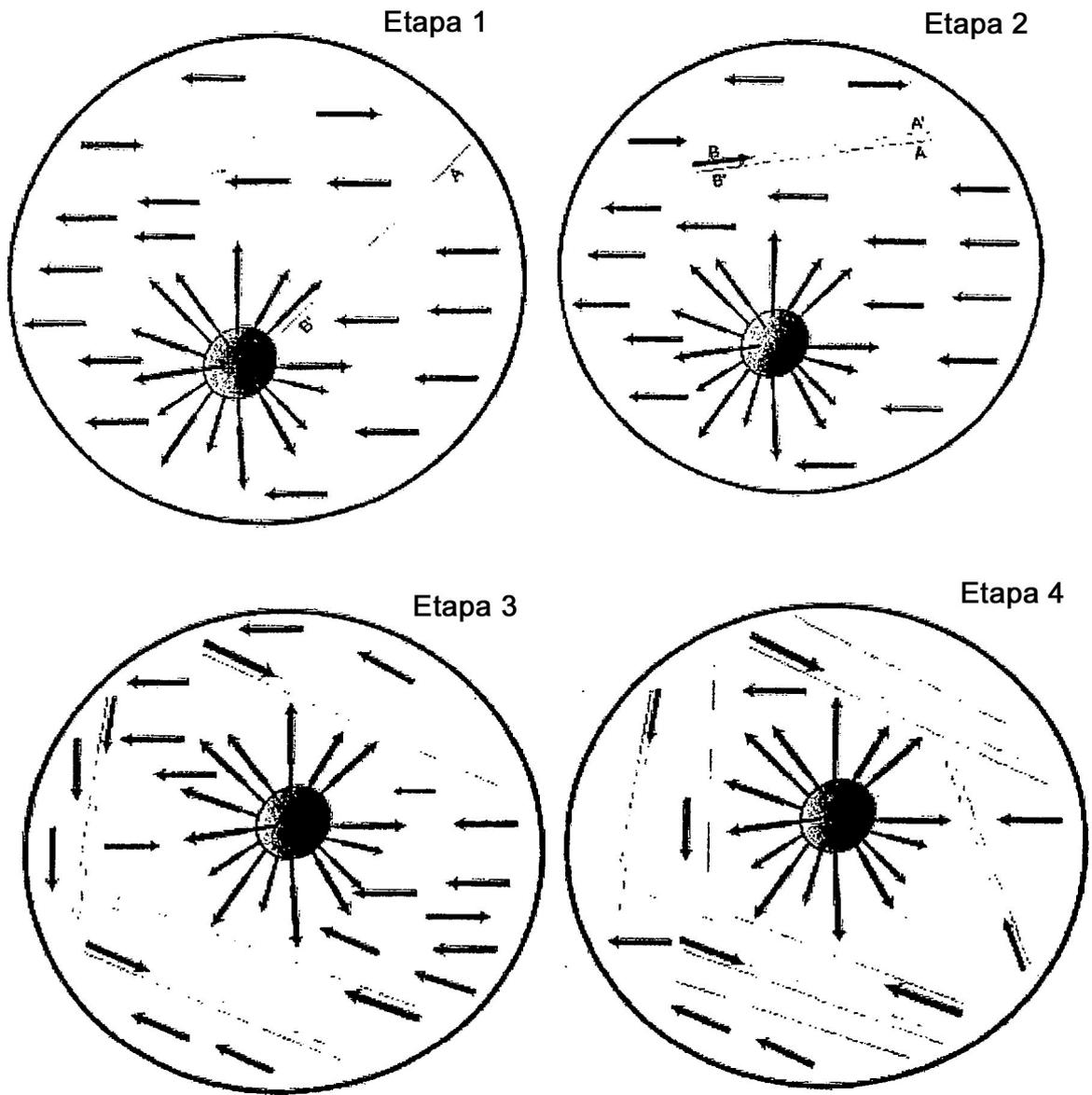


FIG. 2A

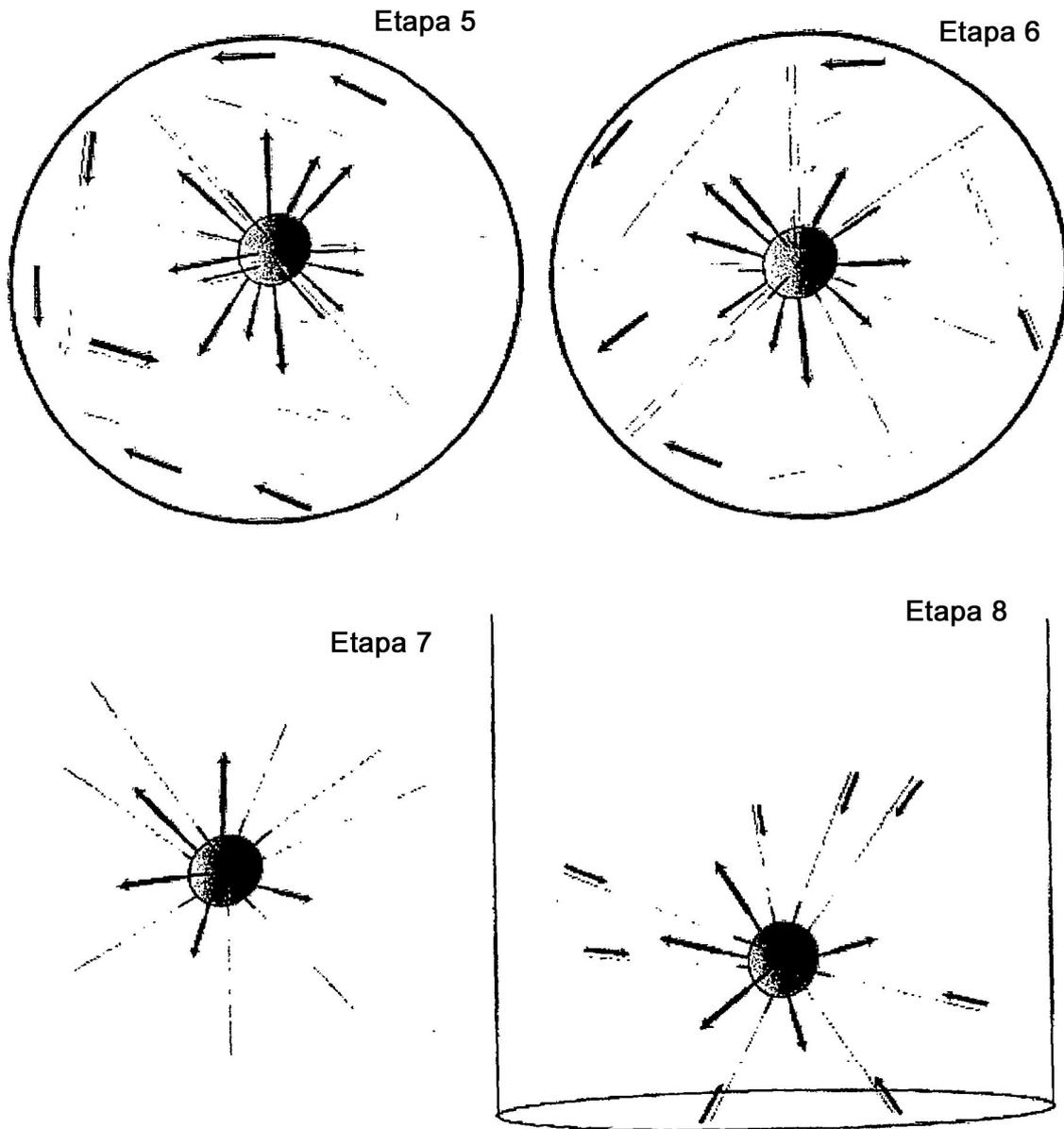


FIG. 2B

Diagrama de flujo esquemático de la separación de las perlas

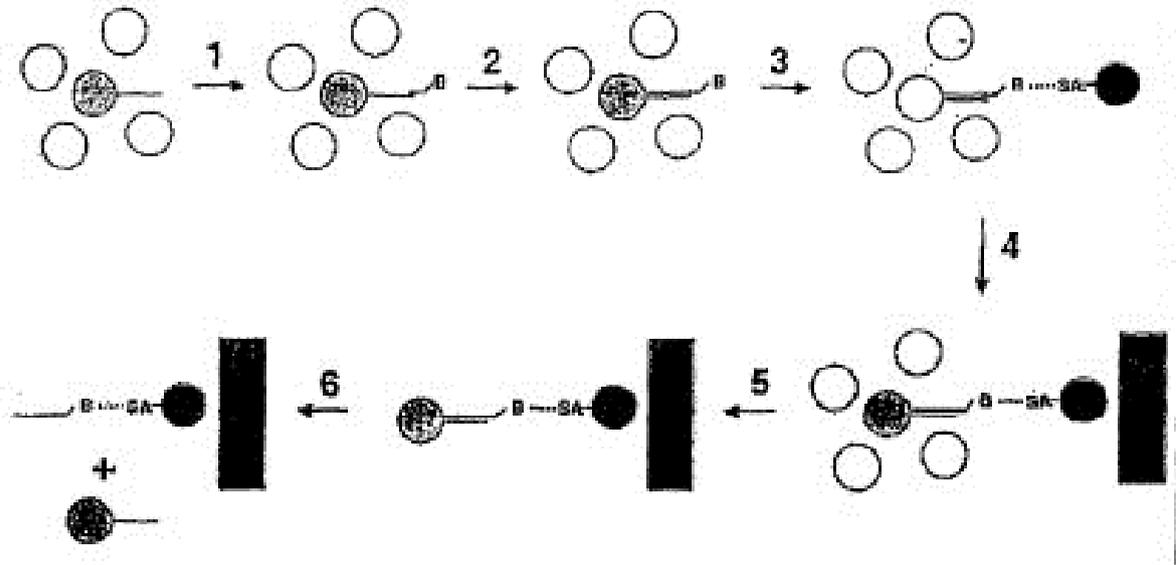


FIG. 3

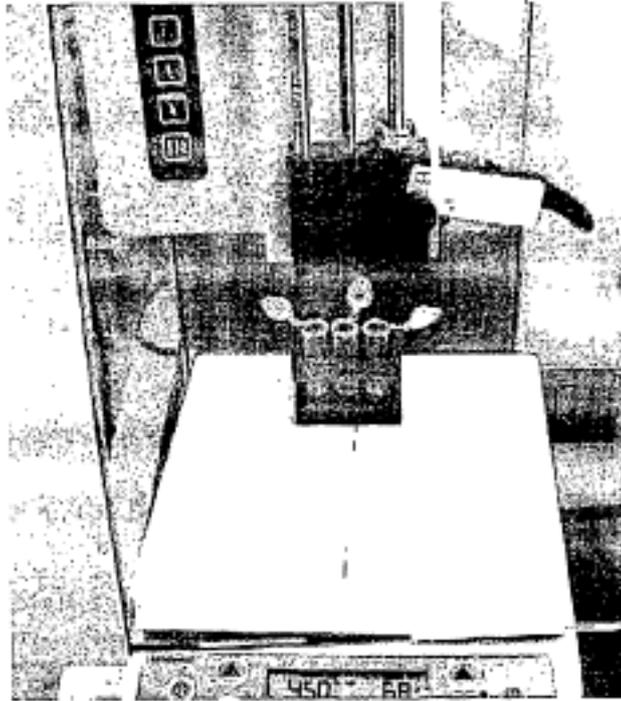


FIG. 4

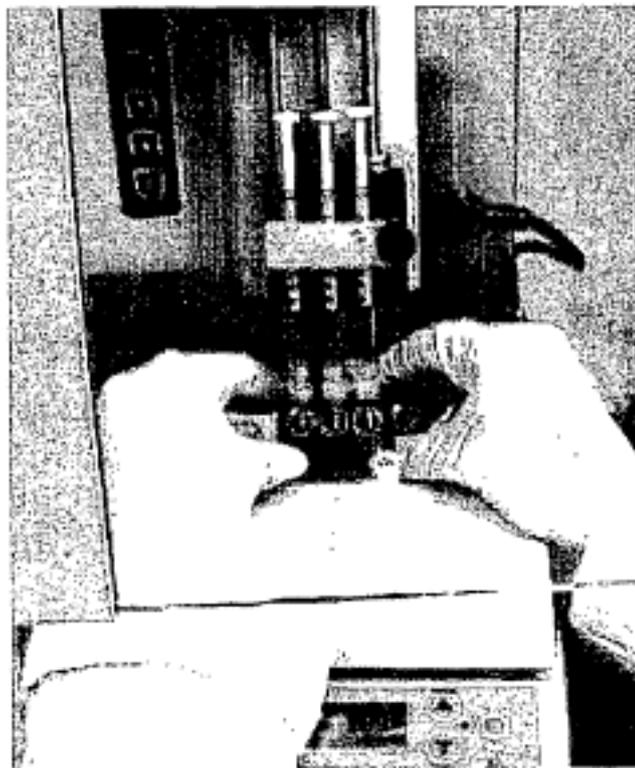


FIG. 5

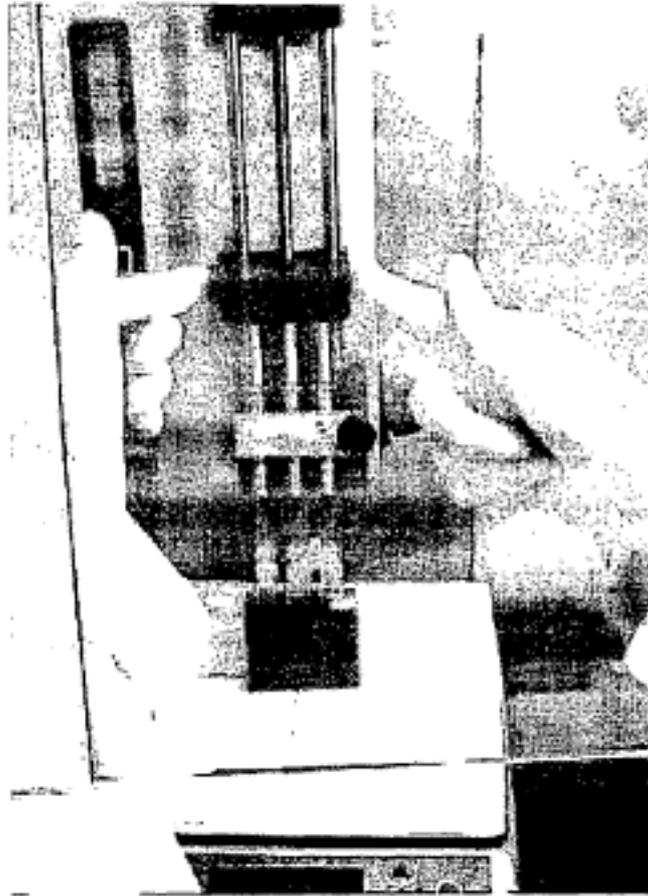


FIG. 6

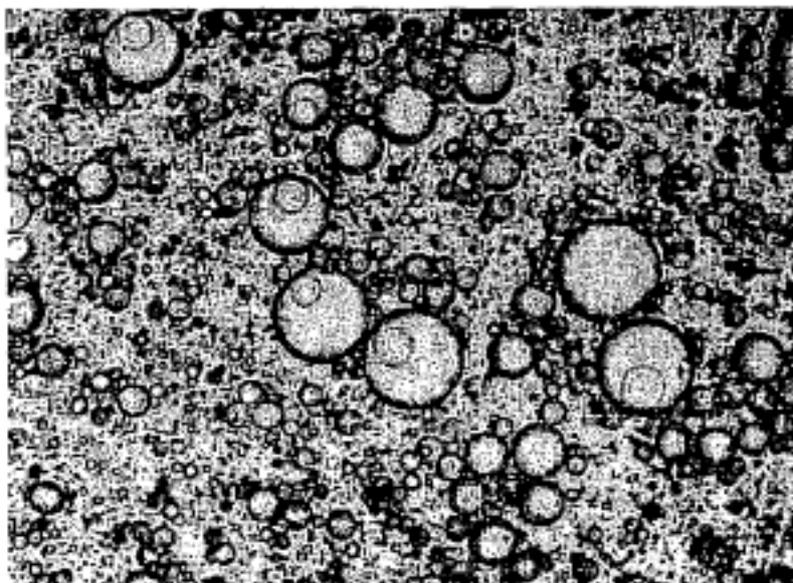


FIG. 7

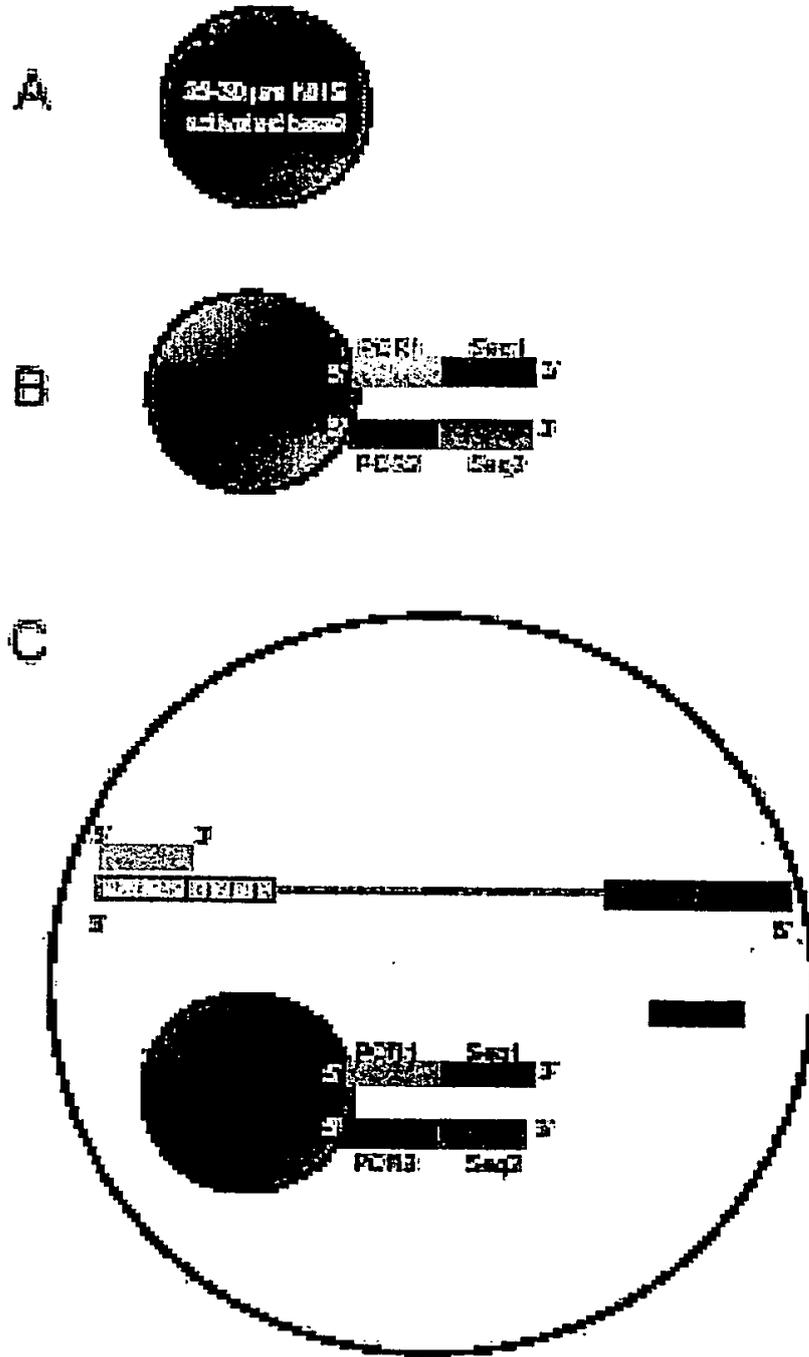


FIG. 8

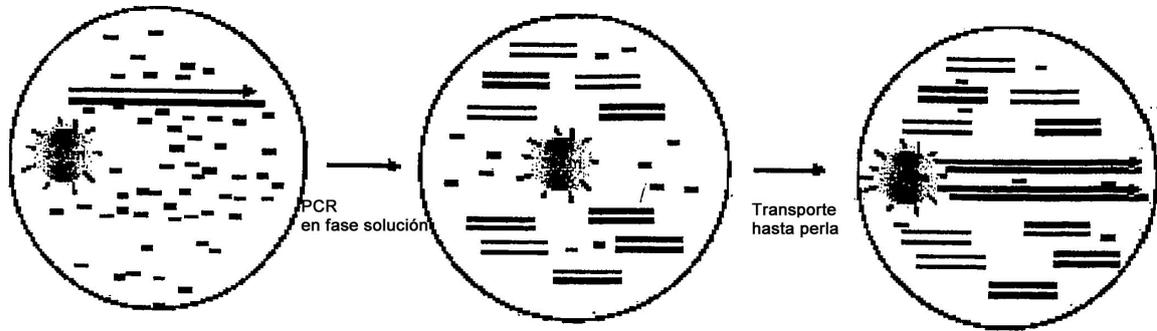


FIG. 9

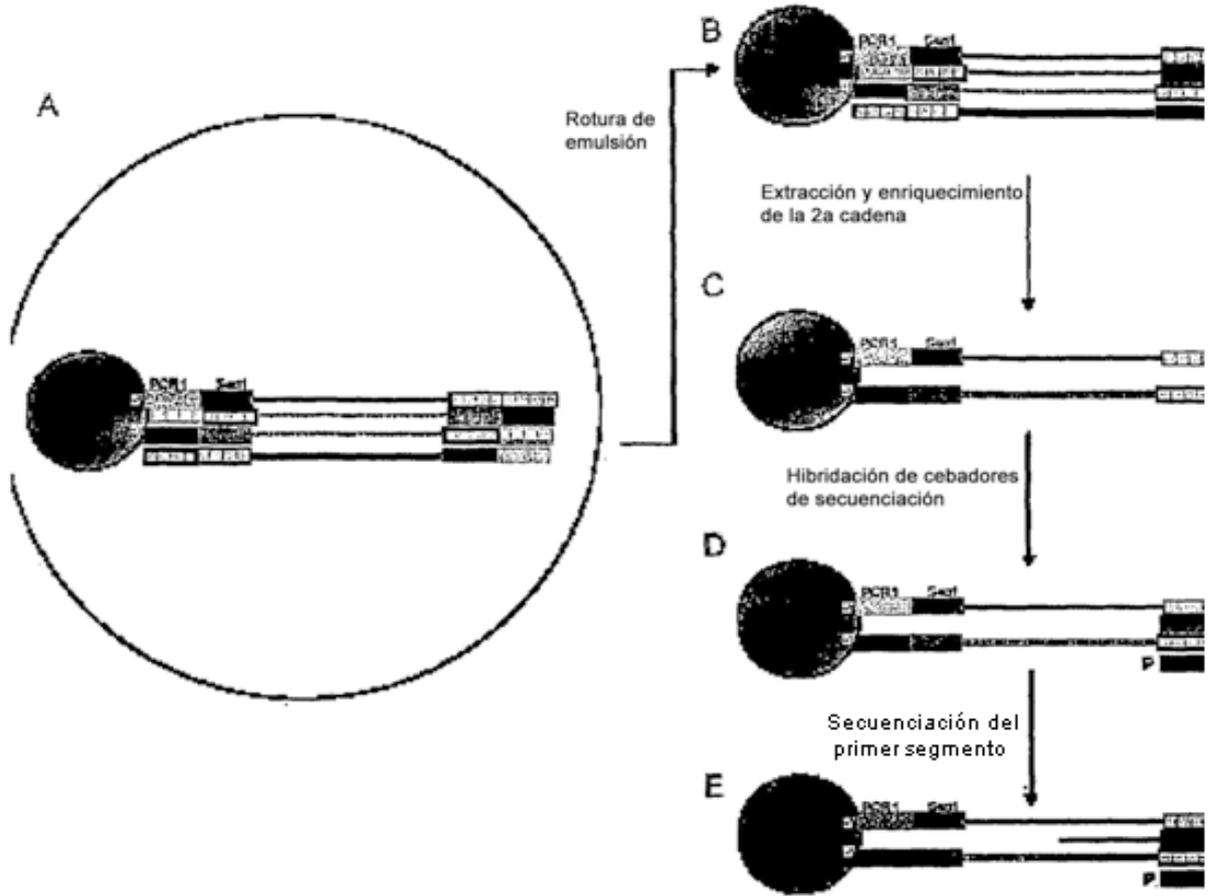


FIG. 10