

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 114**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2022 PCT/US2022/015113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2022 WO22169972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2022 E 22706451 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 4288562**

54 Título: **Generación de lecturas indexadas-unidas prolongadas en perlas unidas a transposomas**

30 Prioridad:

04.02.2021 US 202163145902 P

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

29.04.2025

73 Titular/es:

**ILLUMINA, INC. (100.00%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**CHRISTIANSEN, LENA;
STEEMERS, FRANK J.;
SCHROTH, GARY;
THOMAS, JERUSHAH y
POKHOLOK, DMITRY K.**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 015 114 T3

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

DESCRIPCIÓN

Generación de lecturas indexadas-unidas prolongadas en perlas unidas a transposomas

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional US-63/145,902 presentado el 4 de febrero de 2021 titulado "GENERACIÓN DE LECTURAS INDEXADAS-UNIDAS PROLONGADAS EN PERLAS UNIDAS A TRANSPOSOMAS".

10

Campo

Los sistemas, métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria se refieren a composiciones, sistemas y métodos para la secuenciación de índices espaciales y la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos.

15

Antecedentes

La detección de secuencias específicas de ácido nucleico presentes en una muestra biológica se ha utilizado, por ejemplo, como un método para identificar y clasificar microorganismos, diagnosticar enfermedades infecciosas, detectar y caracterizar anomalías genéticas, identificar cambios genéticos asociados al cáncer, estudiar la susceptibilidad genética a la enfermedad y medir la respuesta a diversos tipos de tratamiento. Una técnica común para detectar secuencias específicas de ácido nucleico en una muestra biológica es la secuenciación de ácidos nucleicos.

20

Los secuenciadores de próxima generación son herramientas potentes que generan grandes cantidades de datos genómicos por ciclo de secuenciación. Interpretar y analizar esta gran cantidad de datos puede ser un desafío. La patente WO2018/118971 describe la tagmentación seguida de la división en microgotitas que comprenden perlas de cebador.

25

Resumen

La presente descripción se refiere a sistemas, métodos y composiciones para realizar lecturas indexadas-unidas utilizando transposomas unidos a perlas y un generador de gotitas.

30

La invención proporcionada en la presente memoria se refiere a un sistema de amplificación indexada de ácidos nucleicos, que comprende: una pluralidad de perlas de contigüidad, un grupo de cebadores indexados, y un detector para obtener datos de secuenciación. Cada perla de contigüidad está asociada a un transposoma y cada perla de contigüidad incluye una molécula de ácido nucleico unida a la perla. El grupo de cebadores indexados incluye una pluralidad de perlas de cebador y un cebador en solución. Cada perla de cebador incluye un adaptador, un código de barras, y un cebador. Las perlas de contigüidad y las perlas de cebador se dividen juntas dentro de las gotitas. En algunas realizaciones, el cebador es un cebador P5. En algunas realizaciones, el cebador en solución comprende adaptadores y cebadores. En algunas realizaciones, el cebador en solución comprende adaptadores B15 y cebadores P7. En algunas realizaciones, el transposoma comprende transposasa y transposón.

35

40

En algunas realizaciones, las perlas de contigüidad y/o las perlas de cebador son perlas de hidrogel que incluyen un polímero de hidrogel y un reticulante. En algunas realizaciones, el polímero de hidrogel incluye polietilenglicol (PEG)-tiol/PEG-acrilato, acrilamida/N,N'-bis(acrilóil)cistamina (BACy), PEG/óxido de polipropileno (PPO), ácido poliacrílico, poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), polilisina, agar, agarosa, alginato, heparina, sulfato de alginato, sulfato de dextrano, hialuronano, pectina, carragenano, gelatina, quitosano, celulosa, o colágeno. En algunas realizaciones, el reticulante incluye bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, dialilamina, divinilsulfona, éter dialil de dietilenglicol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetilolpropano trimetacrilato, trimetilol etoxilado triacrilato, o pentaeritritol etoxilado tetracrilato. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor.

45

50

55

La invención proporcionada en la presente memoria se refiere además a dispositivos de celdas de flujo para la amplificación indexada de ácidos nucleicos. El dispositivo incluye un soporte sólido que incluye una pluralidad de gotitas divididas. La pluralidad de gotitas divididas incluye una perla de contigüidad asociada a un transposoma, e incluye una molécula de ácido nucleico unido a la perla y una perla de cebador que comprende un adaptador, un código de barras, y un cebador. La pluralidad de gotitas divididas se distribuyen a lo largo de una superficie del soporte sólido.

60

En algunas realizaciones, el soporte sólido está funcionalizado con un polímero de superficie. En algunas realizaciones, el polímero de superficie es poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-coacrilamida) (PAZAM) o acrilamida libre de silano (SFA). En algunas realizaciones, la celda de flujo incluye una superficie con patrones. En algunas realizaciones, la superficie con patrones comprende pocillos. En algunas realizaciones, los pocillos tienen un

65

diámetro de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 50 µm, tal como un diámetro de 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, o 50 µm, o dentro de un intervalo definido por cualquiera de los dos valores mencionados anteriormente, y en donde los pocillos tienen una profundidad de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm, tal como una profundidad de 0,5 µm, 0,6 µm, 0,7 µm, 0,8 µm, 0,9 µm, o 1 µm, o dentro de un intervalo definido por dos de los valores mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, los pocillos incluyen un material hidrófobo. En algunas realizaciones, el material hidrófobo comprende un fluoropolímero amorfo, tal como CYTOP, Fluoropel® o Teflon®. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor. En algunas realizaciones, el transposoma comprende transposasa y transposón.

La invención proporcionada en la presente memoria se refiere además a un método de indexación de ácidos nucleicos. Los métodos incluyen la generación de una pluralidad de perlas de contigüidad para la tagmentación de perlas, cada perla unida a un transposoma, y que comprende una molécula de ácido nucleico unida a la perla, la realización de una reacción de tagmentación en la molécula de ácido nucleico, la generación de una pluralidad de perlas cebadoras, cada perla cebadora que comprende un adaptador, un código de barras, y un cebador, dividiendo las perlas de contigüidad y las perlas cebadoras juntas en gotitas con un cebador en solución, amplificando la molécula de ácido nucleico dentro de las gotitas divididas, e indexando la molécula de ácido nucleico en cada gotita.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además realizar la amplificación del ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico antes de realizar la reacción de tagmentación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la reacción de tagmentación comprende poner en contacto el ácido nucleico con una mezcla de transposasas que comprende secuencias adaptadoras y transposomas. En algunas realizaciones, la indexación se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, las gotitas se dividen en más de 900.000 diferentes compartimentos de PCR indexados. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además dividir las gotitas sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un dispositivo de celda de flujo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de un aspecto de un sistema generador de gotitas microfluídicas que puede utilizarse para generar gotitas divididas de transposomas-perlas.

La figura 2 representa una representación esquemática de métodos ilustrativos para realizar la indexación de lectura prolongada unida, incluyendo la secuenciación de transposición que preserva la contigüidad (CPT-Seq) en perlas (paso 1), la PCR de partición/indexación (paso 2) y las lecturas indexadas-unidas (paso 3).

La figura 3 representa una representación esquemática de métodos ilustrativos para realizar la indexación de lecturas prolongadas, incluyendo CPT-seq en perlas, la división de gotitas y la indexación de grupos de cebadores indexados.

La figura 4 representa una representación esquemática de los resultados del desfase a nivel cromosómico utilizando los métodos descritos en la presente memoria.

La figura 5 representa los resultados del número de islas en comparación con la longitud de las islas utilizando los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria.

La figura 6 representa los resultados de los bloques de llamadas de variantes y desfase utilizando los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria (izquierda) en comparación con la secuenciación 10X (derecha).

La figura 7 representa los resultados de los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria realizados en una región del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés).

Las figuras 8A y 8B representan los resultados de los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria realizados en la región HLA-DPA1 (figura 8A) y HLA-A (figura 8B).

Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. En los dibujos, símbolos similares identifican normalmente componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones no pretenden ser limitativas. Se pueden utilizar otras realizaciones, y se pueden realizar otros cambios. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente descripción, tal como se describen en general en la presente memoria, y se ilustran en las figuras, pueden disponerse, sustituirse, combinarse, separarse, y diseñarse en una amplia variedad de configuraciones diferentes.

Los aspectos proporcionados en la presente memoria se refieren a sistemas, dispositivos, y métodos de indexación de lectura prolongada. Los sistemas incluyen la tagmentación de perlas. Las perlas pueden incluir cualquiera de las perlas descritas en la presente memoria, y tener un transposoma unido a las mismas, con moléculas de ácido nucleico unidas a las perlas.

5 En algunos aspectos, las perlas incluyen polímeros de hidrogel y reticulantes que se mezclan en presencia de un transposoma, y que forman perlas unidas al transposoma. En algunos aspectos, las perlas se preparan y, a continuación, se mezclan con el transposoma, que, a continuación, se unen a las perlas. En algunos aspectos, las perlas se preparan en presencia de moléculas de ácido nucleico, que se envuelven o se asocian a las perlas. En algunos aspectos, primero se preparan las perlas, se mezclan con el transposoma y, a continuación, se mezclan con moléculas de ácido nucleico. En algunos aspectos, las perlas permiten realizar coensayos en la misma muestra manteniendo la contigüidad. En particular, los métodos, sistemas, y composiciones proporcionados en la presente memoria permiten confinar y acceder a las biomoléculas unidas a las perlas. Por consiguiente, en algunos aspectos, las perlas descritas en la presente memoria se denominan partículas de contigüidad. Por lo tanto, el término "partícula de contigüidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una perla utilizada para la secuenciación de transposición que preserva la contigüidad (CPT-Seq).

20 Las partículas de contigüidad descritas en la presente memoria pueden utilizarse para enfoques de compartimentación de próxima generación y permiten realizar ensayos multianálisis en moléculas de ácido nucleico. Las partículas de contigüidad y los métodos de uso descritos en la presente memoria permiten analizar eficazmente millones de moléculas de ácido nucleico de forma individual, reduciendo de este modo el coste de preparación de las muestras y manteniendo la contigüidad de las muestras. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria mantienen la contigüidad sin el uso de estrategias de compartimentación externa (microfluídicas) tales como emulsiones, inmovilización, u otros microcompartimentos.

25 En algunos aspectos, las partículas de contigüidad descritas en la presente memoria pueden utilizarse en ensayos para analizar una molécula de ácido nucleico de interés. Los ensayos que se pueden realizar en la molécula de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, el análisis de ADN, el análisis de ARN, la secuenciación de ácidos nucleicos, la tagmentación, la amplificación de ácidos nucleicos, la preparación de bibliotecas de ADN, ensayo de transposasa cromática accesible utilizando la secuenciación (TACA-Seq), la secuenciación de transposición que preserva la contigüidad (CPT-Seq), o cualquier combinación de los mismos realizada secuencialmente.

35 El uso de partículas de contigüidad para realizar uno o más ensayos en una molécula de ácido nucleico puede utilizarse simultáneamente en múltiples partículas de contigüidad para realizar simultáneamente coensayos en un número de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, de 10.000 a 1 millón de moléculas de ácido nucleico, tales como 10.000, 50.000, 100.000, 500.000 o 1 millón de moléculas de ácido nucleico.

40 En algunos aspectos, los métodos descritos en la presente memoria incluyen métodos para realizar lecturas indexadas-unidas para una variedad de aplicaciones, incluyendo el desfase y el ensamblaje. En algunos aspectos, el método incluye combinar la tagmentación de perlas con la indexación de las gotitas. En algunos aspectos, la indexación de gotitas incluye cualquier indexación de compartimentos físicos, incluyendo emulsiones o placas. En algunos aspectos, las perlas proporcionadas en la presente memoria incluyen transposomas, que permiten la realización de la tagmentación de perlas en las moléculas de ácido nucleico. En algunos aspectos, cada molécula de ácido nucleico se envuelve alrededor de la perla, generando fragmentos de la molécula de ácido nucleico unidos a la perla. En algunos aspectos, los métodos se combinan con la indexación. En algunos aspectos, los métodos incluyen dividir las perlas en gotitas. En algunos aspectos, los métodos incluyen realizar una PCR indexada en cada gotita. En algunos aspectos, cada fragmento de una molécula de ácido nucleico individual recibe el mismo código de barras, generando de este modo lecturas indexadas-unidas.

50 Los aspectos de los métodos, sistemas, y dispositivos descritos en la presente memoria tienen numerosas ventajas sobre los métodos anteriores. Por ejemplo, los métodos, sistemas, y dispositivos descritos en la presente memoria proporcionan un tamaño de inserción controlado y transfieren el ADN sin fragmentar el ADN a divisiones físicas donde se indexan de forma única mediante PCR. Además, la CPT-seq en la perla se puede realizar en más de 900.000 compartimentos diferentes de PCR indexados. Además, el CPT-seq en perlas da como resultado un mejor control de la inserción de la biblioteca (densidad del transposomas), una mayor eficiencia de la transferencia del ADN a la gotita, una preparación sólida del ADN, los pasos del ensayo que pueden realizarse antes de la gotita (incluyendo, por ejemplo, la eliminación del Tn5), y una menor fragmentación del ADN. Los aspectos de los métodos permiten la elución de la plantilla de las perlas, lo que da como resultado la elución libre de biotina de los productos tagmentados en las gotitas después del calentamiento. Además, las enzimas asociadas a los métodos proporcionan una alta amplificación con una polimerasa que desplaza la cadena y mayores cantidades de enzima. Finalmente, los aspectos de los métodos proporcionados en la presente memoria dan como resultado una mayor calidad del ADN y permiten la compatibilidad con el lisado.

65 Los métodos, sistemas, y dispositivos proporcionados en la presente memoria combinan la transposición en perlas con la transferencia de ácidos nucleicos tagmentados a divisiones físicas. En algunos aspectos, la producción de lecturas indexadas prolongadas incluye la generación de transposomas unidos a perlas y un generador de gotitas. En

algunos aspectos, el generador de gotitas incluye un dispositivo microfluídico o una emulsión. En algunos aspectos, la transposición en las perlas incluye la tagmentación y la frecuencia de los ácidos nucleicos, que pueden controlarse mediante la densidad del transposoma en las perlas. En algunos aspectos, las perlas se utilizan para transferir ácidos nucleicos tagmentados a divisiones físicas.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “reactivo” describe un agente o una mezcla de dos o más agentes útiles para reaccionar con, interactuar con, diluir o añadir a una muestra, y puede incluir agentes utilizados en los ensayos descritos en la presente memoria, incluyendo agentes para la lisis, análisis de ácido nucleico, reacciones de amplificación de ácido nucleico, análisis de proteínas, reacciones de tagmentación, reacciones de ATAC-seq, CPT-seq o SCI-seq, u otros ensayos. Por lo tanto, los reactivos pueden incluir, por ejemplo, tampones, productos químicos, enzimas, polimerasa, cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases, ácidos nucleicos molde, nucleótidos, marcadores, colorantes o nucleasas. En algunos aspectos, el reactivo incluye lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Φ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótidos trifosfato, tampones, o cationes divalentes.

Partículas de contigüidad

20 En algunos aspectos, la perla tiene una cubierta polimérica que se preparó a partir de una composición de hidrogel. Como se utiliza en la presente memoria, el término “hidrogel” se refiere a una sustancia formada cuando un polímero orgánico (natural o sintético) se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos, o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. En algunos aspectos, el hidrogel puede ser un hidrogel biocompatible. Como se utiliza en la presente memoria, el término “hidrogel biocompatible” se refiere a un polímero que forma un gel que no es tóxico para los materiales biológicos. En algunos aspectos, el material de hidrogel incluye alginato, acrilamida o polietilenglicol (PEG), PEG-acrilato, PEG-amina, PEG-carboxilato, PEG-ditiol, PEG-epóxido, PEG-isocianato, PEG-maleimida, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(metil metacrilato) (PMMA), poliestireno (PS), poliestireno sulfonato (PSS), polivinilpirrolidona (PVPON), N,N'-bis(acriloil)cistamina, óxido de polipropileno (PPO), poli(hidroxietil metacrilato) (PHEMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), polilisina, agar, agarosa, heparina, sulfato de alginato, sulfato de dextrano, hialuronano, pectina, carragenano, gelatina, quitosano, celulosa, colágeno, bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, trialilamina, divinil sulfona, dietilenglicol dialil éter, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetracrilato de trimetilpropoano, triacrilato de trimetilol etoxilado, o tetracrilato de pentaeritritol etoxilado, o combinaciones o mezclas de los mismos. En algunos aspectos, el hidrogel es un material basado en alginato, acrilamida o PEG. En algunos aspectos, el hidrogel es un material basado en PEG con productos químicos de reacción de acrilato-ditiol, epóxido-amina. En algunos aspectos, el hidrogel forma una cubierta polimérica que incluye PEG-maleido/ditiol, PEG-epóxido/aceite de amina, PEG-epóxido/PEG-amina o PEG-ditiol/acrilato de PEG. En algunos aspectos, el material de hidrogel se selecciona para evitar la generación de radicales libres que tienen el potencial de dañar biomoléculas intracelulares. En algunos aspectos, el polímero de hidrogel incluye 60-90 % de líquido, tal como agua y 10-30 % de polímero. En ciertos aspectos, el contenido acuoso de hidrogel es de aproximadamente 70-80 %. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “alrededor de” o “aproximadamente”, cuando se modifica un valor numérico, se refiere a variaciones que pueden producirse en el valor numérico. Por ejemplo, las variaciones pueden producirse a través de las diferencias en la fabricación de un sustrato o componente particular. En un aspecto, el término “aproximadamente” significa dentro de 1 %, 5 % o hasta 10 % del valor numérico mencionado.

50 Como se utiliza en la presente memoria, la cubierta polimérica es una superficie polimérica de una perla. Debido a la naturaleza de las perlas descritas en la presente memoria, las partículas de contigüidad pueden retener material genético después de múltiples ensayos y pueden ser liberadas por fuerza física, productos químicos de escisión o generando un desequilibrio osmótico dependiendo del grosor de la cubierta polimérica.

55 Los hidrogeles pueden prepararse mediante la reticulación de biopolímeros hidrófilos o polímeros sintéticos. Por lo tanto, en algunos aspectos, el hidrogel puede incluir un reticulante. Como se utiliza en la presente descripción, el término “reticulante” se refiere a una molécula que puede formar una red tridimensional cuando reacciona con los monómeros base apropiados. Como ejemplos de polímeros de hidrogel, que pueden incluir uno o más reticulantes, se incluyen, pero sin limitación, hialuronanos, quitosanos, agar, heparina, sulfato, celulosa, alginatos (incluyendo sulfato de alginato), colágeno, dextranos (incluyendo sulfato de dextrano), pectina, carragenano, polilisina, gelatinas (incluyendo gelatina tipo A), agarosa, copolímeros de (met)acrilato-oligoláctida-PEO-oligoláctida-(met)acrilato, copolímeros de PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(fosfaceno), poli(metacrilatos), poli N-vinilpirrolidona, copolímeros de PL(G)A-PEO-PL(G)A, poli(etilenimina), polietilenglicol (PEG)-tiol, PEG-acrilato, acrilamida, N,N'-bis(acriloil)cistamina, PEG, óxido de polipropileno (PPO), ácido poliacrílico, poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, trialilamina, divinilsulfona, éter dialílico de dietilenglicol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetracrilato de trimetilpropoano, triacrilato de trimetilol etoxilado o tetracrilato de pentaeritritol etoxilado, o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, una

combinación puede incluir un polímero y un reticulante, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)-tiol/PEG-acrilato, acrilamida/N,N'-bis(acriloil)cistamina (BACy) o PEG/óxido de polipropileno (PPO). En algunos aspectos, la cubierta polimérica incluye un polietilenglicol (PEG) de cuatro brazos. En algunos aspectos, el polietilenglicol (PEG) de cuatro brazos se selecciona del grupo que consiste en PEG-acrilato, PEG-amina, PEG-carboxilato, PEG-ditiol, PEG-epóxido, PEG-isocianato y PEG-maleimida

En algunos aspectos, el reticulante es un reticulante instantáneo o un reticulante lento. Un reticulante instantáneo es un reticulante que reticula instantáneamente el polímero de hidrogel, y en la presente memoria también se denomina química de clic. Los reticulantes instantáneos pueden incluir aceite de ditiol + PEG-maleimida o epóxido de PEG + aceite de amina. Un reticulante lento es un reticulante que reticula lentamente el polímero de hidrogel, y puede incluir PEG-epóxido + PEG-amina o PEG-ditiol + PEG-acrilato. Un reticulante lento puede tardar más de varias horas en reticular, por ejemplo, más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 horas en reticular. En algunos aspectos proporcionados en la presente memoria, las partículas de contigüidad se formulan mediante un reticulante instantáneo y, de este modo, conservan el estado de la molécula de ácido nucleico mejor en comparación con un reticulante lento.

En algunos aspectos, un reticulante forma un enlace disulfuro en el polímero de hidrogel, uniendo de este modo polímeros de hidrogel. En algunos aspectos, los polímeros de hidrogel forman una matriz de hidrogel que tiene poros (por ejemplo, una matriz de hidrogel porosa). Estos poros pueden retener partículas suficientemente grandes, tal como ácidos nucleicos extraídos de la misma dentro de la cubierta polimérica, pero permiten que otros materiales, tales como reactivos, pasen a través de los poros, pasando de este modo dentro y fuera de las perlas. En algunos aspectos, el tamaño de poro de la cubierta polimérica se afina meticulosamente modificando la relación de la concentración entre el polímero y la concentración de reticulante. En algunos aspectos, la relación entre el polímero y el reticulante es de 30:1, 25:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20 o 1:30, o una relación dentro de un intervalo definido por dos relaciones cualquiera de las mencionadas anteriormente. En algunos aspectos, en la matriz polimérica pueden injertarse funciones adicionales, tales como cebadores de ADN, o grupos químicos con carga, para satisfacer las necesidades de las diferentes aplicaciones.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “porosidad” significa el volumen fraccionario (adimensional) de un hidrogel que está compuesto por espacio abierto, por ejemplo, poros u otras aberturas. Por lo tanto, la porosidad mide los espacios vacíos en un material y es una fracción del volumen de vacíos sobre el volumen total, como un porcentaje entre 0 y 100 % (o entre 0 y 1). La porosidad del hidrogel puede variar de 0,5 a 0,99, de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 0,99 o de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 0,95.

La cubierta polimérica puede tener cualquier tamaño de poro que permita una difusión suficiente de reactivos mientras se retiene simultáneamente los ácidos nucleicos. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “tamaño de poro” se refiere a un diámetro o a un diámetro eficaz de una sección transversal de los poros. La expresión “tamaño de poro” también puede referirse a un diámetro promedio o a un diámetro eficaz promedio de una sección transversal de los poros, basándose en las mediciones de una pluralidad de poros. El diámetro eficaz de una sección transversal que no es circular es igual al diámetro de una sección transversal circular que tiene la misma área transversal que la de la sección transversal no circular. En algunos aspectos, el hidrogel puede hincharse cuando el hidrogel se hidrata. Los tamaños del tamaño de los poros pueden cambiar dependiendo del contenido acuoso en el hidrogel. En algunos aspectos, los poros del hidrogel pueden tener un poro de tamaño suficiente para retener la integridad del hidrogel pero permite paso a través de los reactivos. En algunos aspectos, el interior de la cubierta polimérica es un ambiente acuoso. En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico asociada a la cubierta polimérica no interacciona con la cubierta polimérica y/o no está en contacto con la cubierta polimérica.

En algunos aspectos, la partícula de contigüidad tiene un diámetro de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 200 μm , tal como 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 μm , o un diámetro dentro de un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente. El tamaño de la partícula de contigüidad puede cambiar debido a factores ambientales. En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se expande cuando se separan de la fase oleaginosa continua y se sumergen en una fase acuosa. En algunos aspectos, la expansión de las partículas de contigüidad aumenta la eficacia a la hora de realizar ensayos sobre el material genético. En algunos aspectos, la expansión de las partículas de contigüidad crea un ambiente más grande para insertos indexados a amplificar durante la PCR, que de cualquier otro modo puede restringirse en ensayos actuales basados en células.

En algunos aspectos, el tamaño de los poros permite que los ácidos nucleicos extraídos se difundan a través de la cubierta polimérica. En algunos aspectos, el tamaño de poro de las partículas de contigüidad se puede controlar alterando la química de reticulación. El tamaño final de los poros reticulados puede alterarse además cambiando el ambiente de la partícula de contigüidad, por ejemplo, cambiando la concentración de sal, el pH, o la temperatura, permitiendo de este modo que las moléculas inmovilizadas se liberen de la partícula de contigüidad.

En algunos aspectos, el reticulante es un reticulante reversible. En algunos aspectos, un reticulante reversible es capaz de reticular reversiblemente el polímero de hidrogel y es capaz de desreticularse en presencia de una escisión. En algunos aspectos, un reticulante se puede escindir por la presencia de un agente reductor, por temperatura elevada,

o por un campo eléctrico. En algunos aspectos, el reticulante reversible puede ser N,N'-bis(acrilil)cistamina, un reticulante reversible para geles de poliacrilamida, en donde un enlace disulfuro puede romperse en presencia de un agente reductor adecuado. La porosidad de las perlas puede aumentarse mediante la temperatura o por medios químicos, liberando de este modo el contacto del reticulante con un agente reductor que escinde los enlaces disulfuro del reticulante, rompiendo las perlas. Las perlas se degradan, y liberan el contenido, tal como los ácidos nucleicos que quedaron retenidos en las mismas. En algunos aspectos, el reticulante se escinde aumentando la temperatura a más de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 °C. En algunos aspectos, el reticulante se escinde poniendo en contacto las perlas con un agente reductor. En algunos aspectos, los agentes reductores incluyen compuestos de fosfina, fosfinas solubles en agua, fosfinas que contienen nitrógeno y sales y derivados de las mismas, ditiogeritrol (DTE), ditiotreitrol (DTT) (isómeros cis y trans, respectivamente, de 2,3-dihidroxi-1,4-ditioibutano), 2-mercaptoetanol o β-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetanol o aminoetanol, glutatión, tioglicolato o ácido tioglicólico, 2,3-dimercaptopropanol, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris(hidroximetil)fosfina (THP), o ácido P[tris(hidroximetil)fosfina]propiónico (THPP).

En algunos aspectos, la elevación de la temperatura para aumentar la difusión o el contacto con un agente reductor degrada el reticulante.

En algunos aspectos, la reticulación del reticulante establece poros dentro de la partícula de contigüidad. En algunos aspectos, el tamaño de los poros de la cubierta polimérica es regulable y están formulados para asociarse con el transposoma. El transposoma de perla está formulado para asociarse con ácidos nucleicos de más de aproximadamente 300 pares de bases. En algunos aspectos, el transposoma de perla y los ácidos nucleicos pueden someterse a diversos reactivos para la realización de diversas reacciones. En algunos aspectos, los reactivos incluyen reactivos para procesar material genético, tales como reactivos para aislar ácidos nucleicos de una célula, para amplificar o secuenciar ácidos nucleicos, o para la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, los reactivos incluyen, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa de Φ29, polimerasa de Taq, polimerasa de Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótido trifosfatos, tampones, o cationes divalentes.

Métodos de fabricación de partículas de contigüidad

Algunos aspectos proporcionados en la presente memoria se refieren a métodos de fabricación de partículas de contigüidad que tienen un transposoma asociado a las mismas. En algunos aspectos, una partícula de contigüidad se prepara por medios estáticos, tales como mediante métodos de micropocillos/micromatrices o métodos de microdissección, sin la necesidad de un dispositivo microfluídico. Por lo tanto, en algunos aspectos, las partículas de contigüidad descritas en la presente memoria se preparan mediante un método sin dispositivo. El inicio de la polimerización puede ocurrir mediante reacción química del grupo activo de las unidades monoméricas con entidades específicas de proteínas de membrana, glicanos u otras moléculas pequeñas. El paso inicial de polimerización del monómero puede ir seguido de una o varias rondas de deposición de unidades monoméricas promovidas por fuerzas electrostáticas o hidrófobas. Algunas de las capas monoméricas pueden contener grupos funcionales tales como biotina u otros ligandos que pueden utilizarse posteriormente para la asociación específica con el transposoma.

En algunos aspectos, se prepara una partícula de contigüidad por medios dinámicos, tal como mediante emulsión asistida por vórtice, generación de gotitas microfluídicas o microfluidos basados en válvula. Como se utiliza en la presente memoria, la emulsión asistida por vórtice se refiere a la agitación de vórtice de un polímero de hidrogel con un transposoma en un recipiente, tal como en un tubo, un vial, o un recipiente de reacción. Los componentes pueden mezclarse, por ejemplo, mediante agitación por vórtice o agitación manual o mecánica. En algunos aspectos, el mezclado manual da lugar a perlas que se asocian con el transposoma, en donde las perlas tienen un tamaño de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 μm en diámetro, o un tamaño dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el tamaño de las perlas no es uniforme y, por lo tanto, el tamaño de las perlas incluye perlas de varios diámetros.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se preparan mediante técnicas de flujo microfluídico. El flujo microfluídico incluye el uso de un dispositivo microfluídico para la generación asistida de emulsiones de gel, como se muestra en la figura 1. En algunos aspectos, el dispositivo microfluídico incluye microcanales configurados para producir una partícula de contigüidad de un tamaño deseado y configurada para asociarse con el transposoma a una densidad deseada. En algunos aspectos, el dispositivo microfluídico tiene una altura de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 μm, o una altura dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el dispositivo microfluídico incluye uno o más canales. En algunos aspectos, el dispositivo microfluídico incluye un canal para introducir reactivos que se asociarán con la partícula de contigüidad, tal como un transposoma, ácidos nucleicos o similares, que se han introducido en un polímero, un canal para introducir un reticulante y un canal para un fluido inmiscible. En algunas realizaciones, el ancho del uno o más canales es idéntico. En algunos aspectos, el ancho del uno o más canales es diferente. En algunos aspectos, el ancho del uno o más canales es 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 μm, o un ancho dentro de un intervalo definido por dos valores

cualesquiera de los mencionados anteriormente. El ancho y la altura del canal no están necesariamente restringidos a los valores descritos en la presente memoria y un experto en la técnica reconocerá que el tamaño de la partícula de contigüidad dependerá en parte del tamaño de los canales del dispositivo microfluídico. Por lo tanto, el tamaño de la partícula de contigüidad puede ajustarse en parte modificando el tamaño de los canales. Además del tamaño del dispositivo microfluídico y el ancho de los canales, el caudal de los canales también puede afectar al tamaño de las partículas de contigüidad, y también puede afectar a la densidad de los transposomas asociados con cada partícula de contigüidad.

En algunos aspectos, el caudal del transposomas en el polímero a través del canal microfluídico es 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, o un caudal dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el caudal del reticulante en el canal microfluídico es de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, o un caudal dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el caudal del fluido inmisible en el canal microfluídico es de 20, 30, 50, 80, 100, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, o 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, o un caudal dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el transposoma mezclado con el polímero y el reticulante entran en contacto entre sí en el generador de gotitas microfluídicas corriente arriba del fluido inmisible. Las partículas de contigüidad comienzan a formarse al entrar en contacto con el reticulante y se asocian con el transposoma. Las partículas de contigüidad en formación continúan fluyendo a través del generador de gotitas microfluídicas hacia un fluido inmisible, tal como un aceite espaciador y/o un aceite reticulante, a un caudal inferior al caudal del fluido inmisible, de este modo formando gotitas. En algunos aspectos, el fluido inmisible se introduce en dos pasos, como se muestra en la figura 1, incluyendo como un aceite espaciador y como un aceite reticulante. En algunos aspectos, el aceite espaciador es un aceite mineral, un aceite de hidrocarburo, un aceite de silicio, aceite de fluorocarbono, o un aceite de polidimetilsiloxano, o mezclas de los mismos. El aceite espaciador, tal Como se utiliza en la presente memoria, se utiliza para evitar la reticulación del polímero en la interfase acuosa-aceite del canal.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se forman instantáneamente mediante reticulación con un reticulante instantáneo. Por ejemplo, el transposoma puede asociarse a la perla con un polímero como la maleimida PEG de cuatro brazos o el epóxido utilizando un generador de gotitas microfluídicas que puede reticularse instantáneamente utilizando reticulantes que sean disolubles en aceites, tales como aceites minerales o aceites de fluorocarbono como el HFE-7500, formando un aceite reticulante. En algunos aspectos, el aceite reticulante incluye tolueno, acetona, tetrahidrofurano con ditiol, grupos funcionales de amina como en el caso del tolueno 3,4-ditiol, 2,4-diaminotolueno y hexanoditiol, que se difunden fácilmente en las gotitas que se forman de este modo reticulando instantáneamente las partículas de contigüidad.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se formulan en una distribución de tamaño uniforme. En algunos aspectos, el tamaño de las partículas de contigüidad se afinan meticulosamente ajustando el tamaño del dispositivo microfluídico, el tamaño de uno o más canales o el caudal a través de los canales microfluídicos. En algunos aspectos, la partícula de contigüidad resultante tiene un diámetro que varía de 20 a 200 μm , por ejemplo, de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 μm , o un diámetro dentro de un intervalo definido por dos valores cualquiera de los mencionados anteriormente.

En algunos aspectos, el tamaño y la uniformidad de las partículas de contigüidad pueden controlarse además poniendo en contacto un polímero de hidrogel antes de la formación de las partículas con un modificador fluídico, tal como con un alcohol, incluido el alcohol isopropílico. En ausencia de alcohol isopropílico, las partículas de contigüidad se forman con un diámetro mayor que las partículas de contigüidad formadas en presencia de alcohol isopropílico. El alcohol isopropílico influye en la propiedad fluídica del polímero de hidrogel, lo que permite la modulación del tamaño de las partículas de contigüidad.

Como reconocerán los expertos en la técnica, el dispositivo microfluídico representado en la figura 1 es un ejemplo de un dispositivo microfluídico de tres canales, pero el dispositivo microfluídico puede modificarse, variarse o alterarse para generar partículas de contigüidad de un tamaño particular o para generar partículas de contigüidad formadas a partir de diversos materiales de hidrogel o reticulantes.

En algunos ejemplos, una partícula de contigüidad, ya sea preparada mediante emulsión asistida por vórtice o emulsión asistida por flujo inercial microfluídico. En algunos aspectos, la densidad del transposoma asociada con la partícula de contigüidad se puede controlar diluyendo o concentrando la solución que contiene el transposoma dentro de la muestra introducida. La muestra que incluye el transposoma se mezcla con el polímero de hidrogel, y el polímero de hidrogel que contiene el transposoma se somete a una emulsión asistida por vórtice o a una emulsión asistida por flujo microfluídico como se describe en la presente memoria.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad están funcionalizadas con un nucleótido. En algunos aspectos, el nucleótido es un oligonucleótido o nucleótido poliT. En algunos aspectos, el nucleótido se une a las partículas de contigüidad, y las partículas de contigüidad funcionalizadas pueden utilizarse para la captura dirigida de un nucleótido de interés.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad asociadas con un transposoma se curan para sostener la realización de múltiples coensayos en una sola partícula de contigüidad, incluyendo múltiples lavados de tampón, múltiples intercambios de reactivos y múltiples análisis basados en el ensayo que se está realizando. Las partículas de contigüidad formuladas, preparadas con cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo las técnicas de polimerización iniciadas en la superficie, la agitación por vórtice o mediante las técnicas microfluídicas, pueden cargarse o sembrarse en una celda de flujo con patrones, una micromatriz, una placa con pocillos, una superficie grabada, un canal microfluídico, una perla, una columna, u otra superficie para realizar múltiples coensayos.

Métodos de indexación de lectura unida prolongada

Algunos aspectos proporcionados en la presente memoria se refieren a métodos para realizar una indexación de lectura prolongada unida utilizando las partículas de contigüidad etiquetadas en las perlas. En algunos aspectos, el método incluye obtener una partícula de contigüidad tal como se describe en la presente memoria, la asociación de las partículas con transposomas y moléculas de ácido nucleico, la realización de la tagmentación de perlas, la realización de la división de las perlas tagmentadas y la PCR indexada. En algunos aspectos, los métodos incluyen los pasos descritos en la figura 2, que representa una representación esquemática de métodos ilustrativos para realizar la indexación de lectura unida prolongada, incluyendo la secuenciación de transposición que preserva la contigüidad (CPT-Seq) en perlas (paso 1), la PCR de partición/indexación (paso 2) y las lecturas indexadas-unidas (paso 3). La perla del paso 1 está asociada a un transposoma, que incluye un transposón y una transposasa. Una molécula de ácido nucleico está asociada a la transposasa y se somete a una tagmentación, por ejemplo, a CPT-Seq. Después de la tagmentación, los productos de tagmentación de perlas se dividen utilizando un generador de gotitas u otro método. Tales muestras divididas de ADN transpuesto en perlas pueden someterse a cebadores en solución y a perlas cebadoras indexadas, que indexan el ADN transpuesto. En algunos aspectos, el ADN indexado se somete a PCR indexada y se obtienen lecturas indexadas-unidas.

Además de las partículas de contigüidad (también denominadas en la presente memoria perlas de contigüidad), también se prepararon perlas de cebador. Las perlas de cebador pueden incluir perlas de hidrogel de los materiales, composiciones y formulaciones descritas en la presente memoria con respecto a las partículas de contigüidad, pero en lugar de estar asociadas al transposoma, incluyen un cebador (tal como una cebador P5), un código de barras y un adaptador (tal como un adaptador Nextera). Una única perla de cebador se puede dividir junto con una única partícula de contigüidad dentro de una gotita dividida, y junto con una mezcla de solución de cebador, que puede incluir adaptadores (tal como los adaptadores B15) y cebadores (tal como los cebadores P7). Las gotitas divididas pueden utilizarse para la indexación de códigos de barras, con un grupo de perlas de más de 900.000 códigos de barras indexados.

En algunos aspectos, los métodos incluyen los pasos descritos en la figura 3, que representa una representación esquemática de métodos ilustrativos para realizar la indexación por lectura prolongada, incluyendo la CPT-seq en perlas, la división de gotitas y la indexación de grupos de cebadores indexados, utilizando la transposición sin código de barras.

En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se preparan como se describe en la presente memoria, y las gotitas se dividen sobre una superficie, tal como un dispositivo de celda de flujo, un pocillo de una placa, un portaobjetos, o una superficie con patrones. En algunos aspectos, la superficie es un dispositivo de celda de flujo, e incluye un inserto que tiene micropocillos o micropilares en una matriz para la distribución de las partículas de contigüidad para la indexación espacial en un dispositivo de celda de flujo. En algunos aspectos, las gotitas se dividen en una placa con pocillos con una única partícula de contigüidad en cada pocillo. Una placa con pocillos puede incluir, por ejemplo, una placa de 12 pocillos, una placa de 24 pocillos, una placa de 48 pocillos, una placa de 96 pocillos, una placa de 384 pocillos, una placa de 1536 pocillos, una placa de 3456 pocillos o una placa de 9600 pocillos, o cualquier número de pocillos en una placa, con una única partícula de contigüidad, y dividir la partícula de contigüidad en una indexación de gotitas para la indexación de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, las partículas de contigüidad se someten a múltiples coensayos secuenciales, incluyendo, por ejemplo, lavados con tampón, lisis, análisis de ADN, análisis de ARN, análisis de proteínas, tagmentación, amplificación de ácidos nucleicos, secuenciación de ácidos nucleicos, preparación de bibliotecas de ADN, ensayo de transposasa cromática accesible mediante secuenciación (TACA-seq), secuenciación de transposición con preservación de la contigüidad (CPT-seq) o cualquier combinación de los mismos realizada farmacéuticamente.

En algunos aspectos, la partícula de contigüidad asociada a un transposoma se trata para asociar los ácidos nucleicos de interés a la misma. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de interés se aíslan de una célula. Por ejemplo, la célula puede ponerse en contacto con un tampón de lisis. Como se utiliza en la presente memoria, "lisis" significa la perturbación o alteración de una pared celular o partícula viral que facilita el acceso o la liberación del ARN o ADN celular. Ni la alteración completa ni la rotura de la pared celular son un requisito esencial para la lisis. Por el término "tampón de lisis" se entiende un tampón que contiene al menos un agente de lisis. Los agentes de lisis enzimáticos típicos incluyen, pero no se limitan a, lisozima, glucolasa, zimolosa, liticosa, proteinasa K, proteinasa E, y endolisinas y exolisinas virales. Por lo tanto, por ejemplo, la lisis de las células puede realizarse introduciendo agentes de lisis, tales como la lisozima y la proteinasa K. El ADNg de las células se asocia a continuación a las partículas de

contigüidad. En algunos aspectos, después del tratamiento de lisis, el ácido nucleico aislado se retiene en la partícula de contigüidad, y puede utilizarse para un procesamiento adicional.

5 El análisis de ADN se refiere a cualquier técnica utilizada para amplificar, secuenciar o analizar de otro modo ADN. La amplificación del ADN puede realizarse mediante técnicas de PCR o pirosecuenciación. El análisis de ADN también puede comprender técnicas no dirigidas de secuenciación de ADN no basadas en PCR (p. ej., metagenómica). Como ejemplo no limitativo, el análisis de ADN puede incluir secuenciar la región hipervariable del ADN_r (ADN ribosómico) 16S y utilizar la secuenciación para la identificación de especies mediante ADN.

10 Análisis de ARN se refiere a cualquier técnica que se utilice para amplificar, secuenciar o analizar de otro modo ARN. Las mismas técnicas utilizadas para analizar el ADN pueden emplearse para amplificar y secuenciar el ARN. El ARN, que es menos estable que el ADN, es la traducción del ADN en respuesta a un estímulo. Por lo tanto, el análisis de ARN puede proporcionar una imagen más precisa de los miembros metabólicamente activos de la comunidad y puede utilizarse para proporcionar información acerca de la función comunitaria de organismos en una muestra. La
15 secuenciación de ácido nucleico se refiere al uso de secuenciación para determinar el orden de nucleótidos en una secuencia de una molécula de ácido nucleico, tal como ADN o ARN.

El término “secuenciación”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método mediante el cual se obtiene la identidad de al menos 10 nucleótidos consecutivos (p. ej., la identidad de al menos 20, al menos 50, al menos 100
20 o al menos 200 o más nucleótidos consecutivos) de un polinucleótido.

Las expresiones “secuenciación de nueva generación” o “secuenciación de alto rendimiento” o “NGS”, generalmente se refieren a tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, que incluyen, pero sin limitación, secuenciación de firmas masivamente paralela, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por ligamiento (p. ej., secuenciación
25 SOLiD), secuenciación por semiconductores de iones de protones, secuenciación de nanobolas de ADN, secuenciación de molécula individual y secuenciación de nanoporos y pueden referirse a la secuenciación por síntesis paralelizada o a las plataformas de secuenciación por ligamiento empleadas actualmente por Illumina, Life Technologies, o Roche, etc. Los métodos de secuenciación de nueva generación también pueden incluir métodos de secuenciación de nanoporos o métodos basados en detección electrónica, como la tecnología Ion Torrent
30 comercializada por Life Technologies o el método basado en la fluorescencia de molécula individual comercializado por Pacific Biosciences.

Análisis de proteínas se refiere al estudio de proteínas, y puede incluir análisis proteómico, la determinación de la modificación postraduccional de proteínas de interés, la determinación de los niveles de expresión de proteínas o la
35 determinación de las interacciones de proteínas con otras moléculas, incluyendo la interacción con otras proteínas o con ácidos nucleicos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “tagmentación” se refiere a la modificación del ADN mediante un complejo transposómico que comprende la enzima transposasa formando un complejo con adaptadores que comprenden la secuencia terminal transposónica. La tagmentación da como resultado la fragmentación simultánea
40 del ADN y el ligamiento de los adaptadores en los extremos 5' de ambas cadenas de los fragmentos dúplex. Después de un paso de purificación para retirar la enzima transposasa, pueden añadirse secuencias adicionales a los extremos de los fragmentos adaptadores, por ejemplo, mediante PCR, ligadura o cualquier otra metodología adecuada conocida por los expertos en la técnica.

45 El método de la invención puede utilizar cualquier transposasa que pueda aceptar una secuencia terminal de transposasa y un fragmento de ácido nucleico, uniendo un extremo transferido pero no un extremo no transferido. Un “transposoma” está formado por al menos una enzima transposasa y un sitio de reconocimiento de transposasa. En algunos sistemas de este tipo, denominados “transposomas”, la transposasa puede formar un complejo funcional con un sitio de reconocimiento de transposón que es capaz de catalizar una reacción de trasposición. La transposasa o la
50 integrasa puede unirse al sitio de reconocimiento de transposasa e insertar el sitio de reconocimiento de transposasa en un ácido nucleico diana en un proceso en ocasiones denominado “tagmentación”. En algunos acontecimientos de inserción de este tipo, una cadena del sitio de reconocimiento de transposasa puede transferirse al ácido nucleico diana.

55 En los métodos de preparación de muestras estándar, cada molde contiene un adaptador en cualquiera de los extremos del inserto y normalmente son necesarias varias etapas tanto para modificar el ADN o el ARN como para purificar los productos deseados de las reacciones de modificación. Estas etapas se realizan en solución antes de la adición de los fragmentos adaptados a una celda de flujo, donde se acoplan a la superficie mediante una reacción de extensión de cebador que copia el fragmento hibridado al extremo de un cebador unido covalentemente a la superficie. Estos moldes ‘semilla’ dan lugar a continuación a grupos monoclonales de molde copiados a través de varios ciclos de amplificación.

60 El número de etapas necesario para transformar el ADN en moldes modificados con adaptador en solución listos para la formación de grupos y la secuenciación puede minimizarse utilizando fragmentación y etiquetado mediado por transposasas.
65

En algunos aspectos, la tecnología basada en transposones puede utilizarse para fragmentar el ADN, por ejemplo, como se ilustra en el flujo de trabajo de los kits de preparación de muestras de ADN de Nextera™ (Illumina, Inc.), en donde el ADN genómico puede fragmentarse mediante un transposoma modificado por ingeniería genética que fragmenta y etiqueta simultáneamente (“tagmentación”) el ADN de entrada, creando de este modo una población de moléculas de ácido nucleico fragmentadas que comprenden secuencias adaptadoras únicas en los extremos de los fragmentos.

Algunos aspectos pueden incluir el uso de una transposasa Tn5 hiperactiva y un sitio de reconocimiento de transposasa de tipo Tn5 (Gory Shin y Reznikoff, *J. Biol. Chem.*, 273:7367 (1998)), o una transposasa MuA y un sitio de reconocimiento de transposasa Mu que comprende secuencias terminales R1 y R2 (Mizuuchi, K., *Cell*, 35: 785, 1983; Savilahti, H. y col., *EMBO J.*, 14: 4893, 1995). Un sitio de reconocimiento de transposasa ilustrativo que forma un complejo con una transposasa Tn5 hiperactiva (por ejemplo, Transposasa EZ-Tn5™, Epicentre Biotechnologies, Madison, Wis.).

Como ejemplos adicionales de sistemas de trasposición que pueden utilizarse con determinados aspectos proporcionados en la presente memoria se incluyen Tn552 de *Staphylococcus aureus* (Colegio y col., *J. Bacteriol.*, 183: 2384-8, 2001; Kirby C y col., *Mol. Microbiol.*, 43: 173-86, 2002), Ty1 (Devine y Boeke, *Nucleic Acids Res.*, 22: 3765-72, 1994 y la Publicación Internacional WO 95/23875), el Transposón Tn7 (Craig, N L, *Science*. 271: 1512, 1996; Craig, N L, Revisado en: *Curr Top Microbiol Immunol.*, 204:27-48, 1996), Tn/O e IS10 (Kleckner N, y col, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 204:49-82, 1996), la transposasa Mariner (Lampe D J, y col., *EMBO J.*, 15: 5470-9, 1996), Tc1 (Plasterk RH, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 204: 125-43, 1996), elemento P (Gloor, GB, *Methods Mol. Biol.*, 260: 97-114, 2004), Tn3 (Ichikawa y Ohtsubo, *J Biol. Chem.* 265:18829-32, 1990), secuencias de inserción bacterianas (Ohtsubo y Sekine, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 204: 1-26, 1996), retrovirus (Brown, y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:2525-9, 1989), y retrotransposón de levadura (Boeke y Corces, *Annu Rev Microbiol.* 43:403-34, 1989). Algunos ejemplos adicionales incluyen IS5, Tn10, Tn903, IS911, y versiones modificadas por ingeniería genética de enzimas de la familia de las transposasas (Zhang y col., (2009) *PLoS Genet.* 5:e1000689. Epub 2009 Oct. 16; Wilson C. y col. (2007) *J. Microbiol. Methods* 71:332-5).

Ensayo de cromatina accesible por transposasa utilizando secuenciación (TACA-seq) se refiere a un método rápido y sensible de análisis epigenómico integrador. ATAC-seq captura sitios de cromatina abiertos y revela interacción entre ubicaciones genómicas de cromatina abierta, proteínas de unión a ADN, nucleosomas individuales y compactación de orden superior en regiones reguladoras con resolución de nucleótidos. Se han descubierto clases de factores de unión al ADN que evitan estrictamente los nucleosomas, los toleran o tienden a solaparse con ellos. Utilizando ATAC-seq, se midieron y evaluaron los epigenomas diarios en serie de linfocitos T humanos en reposo y se evaluaron a partir de una pro banda mediante extracciones de sangre estándar, lo que demuestra la viabilidad de la lectura de los epigenomas personales en escalas de tiempo clínicas para monitorizar la salud y la enfermedad. Más específicamente, TACA-seq puede realizarse tratando la cromatina de una célula con un complejo enzimático de inserción para producir fragmentos marcados de ADN genómico. En esta etapa, la cromatina está tagmentada (por ejemplo, fragmentada y marcada en la misma reacción) utilizando una enzima de inserción tal como Tn5 o MuA que escinde el ADN genómico en regiones abiertas en la cromatina y añade adaptadores a ambos extremos de los fragmentos.

En algunos casos, las condiciones pueden ajustarse para obtener un nivel deseable de inserción en la cromatina (p. ej., para que se produzca una inserción, en promedio, cada 50 a 200 pares de bases en regiones abiertas). La cromatina utilizada en el método, puede fabricarse mediante cualquier método adecuado. En algunos aspectos, los núcleos pueden aislarse y someterse a lisis, y la cromatina puede purificarse adicionalmente, p. ej., de la envoltura nuclear. En otros aspectos, la cromatina puede aislarse poniendo en contacto núcleos aislados con el tampón de reacción. En estos aspectos, se puede producir la lisis de los núcleos aislados al ponerse en contacto con el tampón de reacción (que comprende complejos enzimáticos de inserción y otros reactivos necesarios), lo que permite el acceso de la enzima de inserción a la cromatina. En estos aspectos, el método puede comprender aislar núcleos de una población de células; y combinar los núcleos aislados con la transposasa y adaptadores, en donde la combinación da como resultado la lisis de los núcleos para liberar dicha cromatina y la producción de fragmentos de ADN genómico marcados con adaptador. La cromatina no requiere reticulación como en otros métodos (p. ej., los métodos ChIP-SEQ).

Después de que la cromatina se ha fragmentado y marcado para producir fragmentos marcados de ADN genómico, al menos algunos de los fragmentos marcados con adaptador se secuencian para producir una pluralidad de lecturas de secuencia. Los fragmentos pueden secuenciarse utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los fragmentos pueden secuenciarse utilizando el método de terminador reversible de Illumina, el método de pirosecuenciación de Roche (454), la secuenciación de Life Technologies mediante ligamiento (la plataforma SOLiD) o la plataforma Ion Torrent de Life Technologies. En las siguientes referencias se describen ejemplos de dichos métodos: Margulies y col. (*Nature* 2005 437: 376-80); Ronaghi y col. (*Analytical Biochemistry* 1996 242: 84-9); Shendure y col. (*Science* 2005 309: 1728-32); Imelfort y col. (*Brief Bioinform.* 2009 10:609-18); Fox y col. (*Methods Mol Biol.* 2009;553:79-108); Appleby y col. (*Methods Mol Biol.* 2009; 513:19-39) y Morozova y col. (*Genomics.* 2008 92:255-64). Como sería evidente, durante la etapa de amplificación, a los extremos de los fragmentos pueden añadirse sitios cebadores de secuenciación directos e inversos que sean compatibles con una plataforma de secuenciación de

próxima generación seleccionada. En ciertos aspectos, los fragmentos pueden amplificarse utilizando cebadores de PCR que se hibridan con las etiquetas que se han añadido a los fragmentos, donde el cebador utilizado para la PCR tiene colas 5' que son compatibles con una plataforma de secuenciación particular. En la solicitud PCT n.º PCT/US 2014/038825, se exponen métodos para realizar ATAC-seq.

El término “cromatina”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un complejo de moléculas que incluyen proteínas y polinucleótidos (p. ej., ADN, ARN), como se encuentran en un núcleo de una célula eucariota. La cromatina está compuesta en parte por proteínas histonas que forman nucleosomas, ADN genómico y otras proteínas de unión a ADN (p. ej., factores de transcripción) que generalmente están unidas al ADN genómico.

La secuenciación por transposición conservando la contigüidad (CPT-seq, por las siglas del inglés *contiguity-preserving transposition sequencing*) se refiere a un método de secuenciación que al mismo tiempo conserva la información de contigüidad utilizando transposasa para mantener la asociación de fragmentos de ácido nucleico molde adyacentes en el ácido nucleico diana. Por ejemplo, puede realizarse CPT en un ácido nucleico, tal como en ADN o ARN. El ácido nucleico de CPT puede capturarse mediante hibridación de oligonucleótidos complementarios que tienen índices o códigos de barras únicos e inmovilizarse sobre un soporte sólido. En algunos aspectos, el oligonucleótido inmovilizado sobre el soporte sólido puede comprender además sitios de unión al cebador, índices moleculares únicos, además de códigos de barras. Ventajosamente, dicho uso de transposomas para mantener la proximidad física de los ácidos nucleicos fragmentados aumenta la probabilidad de que los ácidos nucleicos fragmentados de la misma molécula original, por ejemplo, cromosoma, reciban el mismo código de barras único e información de índice de los oligonucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido. Esto dará como resultado una biblioteca de secuenciación unida de forma contigua con códigos de barras únicos. La biblioteca de secuenciación unida de forma contigua puede secuenciarse para obtener información de secuencia contigua. Las partículas de contigüidad descritas en la presente memoria pueden ponerse en contacto con los reactivos de CPT-Seq para la realización de CPT-Seq en los ácidos nucleicos extraídos de una célula.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “información de contigüidad” se refiere a una relación espacial entre dos o más fragmentos de ADN basándose en información compartida. El aspecto compartido de la información puede ser con respecto a las relaciones espaciales adyacentes, compartimentales y de distancia. La información con respecto a estas relaciones facilita a su vez el ensamblaje jerárquico o el mapeo de las lecturas de secuencia derivadas de los fragmentos de ADN. Esta información de contigüidad mejora la eficiencia y la precisión de dicho ensamblaje o mapeo, ya que los métodos de ensamblaje o mapeo tradicionales utilizados junto con secuenciación de escopeta (*shotgun*) convencional, no tienen en cuenta los orígenes genómicos relativos o las coordenadas de las lecturas de secuencias individuales en lo que respecta a la relación espacial entre los dos o más fragmentos de ADN de los que se obtuvieron las lecturas de secuencias individuales.

Por lo tanto, según los aspectos descritos en la presente memoria, los métodos de captura de información de contigüidad pueden lograrse mediante métodos de contigüidad de corto alcance para determinar relaciones espaciales adyacentes, métodos de contigüidad de medio alcance para determinar las relaciones espaciales compartimentales o métodos de contigüidad de largo alcance para determinar las relaciones espaciales de distancia. Estos métodos facilitan la precisión y la calidad del ensamblaje o mapeo de secuencias de ADN, y pueden utilizarse con cualquier método de secuenciación, tal como los descritos en la presente memoria.

La información de contigüidad incluye los orígenes genómicos relativos o las coordenadas de las lecturas de secuencias individuales en lo que respecta a la relación espacial entre los dos o más fragmentos de ADN de los que se obtuvieron las lecturas de secuencias individuales. En algunos aspectos, la información de contigüidad incluye información de secuencia de lecturas de secuencia no superpuestas.

En algunos aspectos, la información de contigüidad de una secuencia de ácido nucleico diana es indicativa de información de haplotipo. En algunos aspectos, la información de contigüidad de una secuencia de ácido nucleico diana es indicativa de variantes genómicas.

La secuenciación indexada combinatoria de células individuales (SCI-seq, *single cell combinatorial indexed sequencing*) es una técnica de secuenciación para generar simultáneamente miles de bibliotecas de células individuales de paso bajo para la detección de variantes de número de copias somáticas.

Por consiguiente, se pueden realizar múltiples coensayos en partículas de contigüidad con el fin de analizar los ácidos nucleicos, incluyendo los ensayos descritos en la presente memoria, solos o en combinación con cualquier otro ensayo.

Las partículas de contigüidad indexadas también se pueden cargar directamente en las celdas de flujo mantenidas a través de un matiz de postes/micropocillos. Las bibliotecas indexadas se liberan de las partículas de contigüidad (liberación química/temperatura) y se unen a la celda de flujo. Esto permite un enfoque de indexación potenciada en donde el primer nivel de indexación proviene de la ubicación espacial y, a continuación, el siguiente nivel proviene de las bibliotecas indexadas a partir de una única partícula de contigüidad. Alternativamente, las bibliotecas indexadas extraídas de las partículas de contigüidad pueden cargarse colectivamente en la celda de flujo.

En algunos aspectos, una partícula de contigüidad se pone en contacto con uno o más reactivos para el procesamiento de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, los reactivos pueden incluir agentes de lisis, agentes de purificación de ácidos nucleicos, agentes de amplificación de ADN, agentes de tagmentación, agentes de PCR, u otros agentes utilizados en el procesamiento de materiales genéticos. Por lo tanto, la partícula de contigüidad proporciona un microambiente para las reacciones controladas de los ácidos nucleicos.

En algunos aspectos, la preparación completa de la biblioteca de ADN se puede lograr sin problemas dentro de la partícula de contigüidad con múltiples intercambios de reactivos que atraviesan el hidrogel poroso mientras se retiene el ADN y sus productos de biblioteca dentro de la cubierta polimérica. El hidrogel puede ser resistente a altas temperaturas de hasta 95 °C durante varias horas para soportar diferentes reacciones bioquímicas.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “aislado”, “aislar”, “aislamiento”, “purificado”, “purificar”, “purificación” y equivalentes gramaticales de los mismos, como se utilizan en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, se refieren a la reducción de la cantidad de al menos un contaminante (tal como una proteína y/o una secuencia de ácido nucleico) de una muestra o de una fuente (p. ej., una célula) de la que se aísla el material. Por lo tanto, la purificación da lugar a un “enriquecimiento”, por ejemplo, un aumento de la cantidad de una proteína y/o una secuencia de ácido nucleico deseables en la muestra.

Después de la lisis y el aislamiento de los ácidos nucleicos, se puede realizar amplificación, tal como la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, *multiple displacement amplification*), que es una técnica muy utilizada para amplificar bajas cantidades de ADN, especialmente de células individuales. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se amplifican, se secuencian o se utilizan para la preparación de bibliotecas de ácido nucleico. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “amplificar”, “amplificado” o “amplificación”, como se utilizan en referencia a un ácido nucleico o a reacciones de ácido nucleico, se refieren a métodos *in vitro* para preparar copias de un ácido nucleico particular, tal como un ácido nucleico diana, o un ácido nucleico asociado a una partícula de contigüidad, por ejemplo, mediante un aspecto de la presente descripción. En la técnica se conocen numerosos métodos de amplificación de ácidos nucleicos, y las reacciones de amplificación incluyen reacciones en cadena de la polimerasa, reacciones en cadena de la ligasa, reacciones de amplificación por desplazamiento de cadena, reacciones de amplificación por círculo rodante, ciclos de amplificación basados en emparejamiento y bucles múltiples (MALBAC, *multiple annealing and looping based amplification cycles*), métodos de amplificación mediados por transcripción tales como NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos), métodos de amplificación mediada por bucle (p. ej., amplificación “LAMP”, *loop-mediated isothermal amplification*), utilizando secuencias formadoras de bucle. El ácido nucleico que se amplifica puede ser ADN que comprenda, consista en, o derive de ADN o ARN o de una mezcla de ADN y ARN, incluyendo ADN y/o ARN modificados. Los productos resultantes de la amplificación de una molécula o moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, “productos de amplificación”), tanto si el ácido nucleico de partida es ADN, ARN o ambos, pueden ser ADN o ARN, o una mezcla de nucleósidos o nucleótidos tanto de ADN como de ARN, o pueden comprender nucleósidos o nucleótidos de ADN o ARN modificados. Una “copia” no significa necesariamente una complementariedad o identidad de secuencia perfecta con la secuencia diana. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótidos tales como desoxiinosina o desoxiuridina, alteraciones de secuencia deliberadas (tales como alteraciones de secuencia introducidas a través de un cebador que comprende una secuencia que es hibridable con, pero no complementaria a, la secuencia diana y/o errores de secuencia que se producen durante la amplificación.

Los ácidos nucleicos asociados a la partícula de contigüidad pueden amplificarse según cualquier metodología de amplificación adecuada conocida en la técnica. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se amplifican en la partícula de contigüidad. En algunos aspectos, la partícula de contigüidad se captura en un soporte sólido y se degrada, en donde los ácidos nucleicos se liberan sobre el soporte sólido y los ácidos nucleicos se amplifican sobre el soporte sólido.

Se apreciará que, para amplificar ácidos nucleicos, puede utilizarse cualquiera de las metodologías de amplificación descritas en la presente memoria o generalmente conocidas en la técnica, con cebadores universales o específicos de diana. Como métodos de amplificación adecuados se incluyen, aunque no de forma limitativa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), la amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés) y la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés), como se describe en la patente US-8.003.354. Los métodos de amplificación anteriores pueden emplearse para amplificar uno o más ácidos nucleicos de interés. Por ejemplo, para amplificar ácidos nucleicos, puede utilizarse PCR, incluyendo PCR múltiple, SDA, TMA, NASBA y métodos similares. En algunos aspectos, en la reacción de amplificación se incluyen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés.

Otros métodos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir tecnologías de extensión y ligamiento de oligonucleótidos, amplificación por círculo rodante (RCA) [Lizardi y col., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)] y ensayo de ligamiento de oligonucleótido (OLA, por sus siglas en inglés) (Ver generalmente la patente US 7.582.420, US-5.185.243, US-5.679.524 y US-5.573.907; EP 0 320 308 B1; EP 0 336 731 B1; EP 0 439 182 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; y WO 89/09835. Se apreciará que estas metodologías de amplificación pueden diseñarse para amplificar ácidos nucleicos. Por ejemplo, en algunos aspectos, el método de amplificación puede incluir

amplificación de sonda de ligamiento o reacciones de ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. En algunos aspectos, el método de amplificación puede incluir una reacción de extensión-ligamiento de cebador que contenga cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés, y que son capaces de pasar a través de los poros de hidrogel. Como ejemplo no limitativo de cebador de extensión y cebadores de ligamiento que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores utilizados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, CA) como se ilustra en las patentes n.º 7.582.420 y 7.611.869. En cada uno de los métodos descritos, los reactivos y componentes implicados en la reacción del ácido nucleico son capaces de pasar a través de los poros de la partícula de contigüidad mientras retienen el propio ácido nucleico dentro de la partícula de contigüidad.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se amplifican metodologías de amplificación en grupo como se ilustra en las descripciones de las patentes US-7.985.565 y US-7.115.400. Los materiales de las patentes estadounidenses US-7.985.565 y US-7.115.400 describen métodos de amplificación de ácido nucleico, que permiten que los productos de amplificación se inmovilicen sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas por grupos o "colonias" de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Cada grupo o colonia en dicha matriz se forma a partir de una pluralidad de cadenas de polinucleótidos idénticas inmovilizadas y una pluralidad de cadenas de polinucleótidos complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas se denominan generalmente en la presente memoria "matrices agrupadas". Los productos de reacciones de amplificación en fase sólida, tales como los descritos en las patentes n.º 7.985.565 y 7.115.400 son las denominadas estructuras "puente" formados por el emparejamiento de pares de cadenas de polinucleótidos inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, inmovilizándose ambas cadenas sobre el soporte sólido en el extremo 5', preferiblemente mediante una unión covalente. Las metodologías de amplificación de grupos son ejemplos de métodos en donde para producir amplicones inmovilizados se utiliza un molde de ácido nucleico inmovilizado. También pueden utilizarse otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, pueden formarse uno o más grupos o colonias mediante PCR en fase sólida si uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación se inmovilizan. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se amplifican en la partícula de contigüidad y, a continuación, se depositan en una matriz o en un soporte sólido en un grupo.

Otros métodos de amplificación incluyen amplificación isotérmica. Como ejemplos de métodos de amplificación isotérmica que pueden utilizarse se incluyen, pero sin limitación, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, *multiple displacement amplification*) como se ilustra, por ejemplo, en Dean y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 99:5261-66 (2002) o amplificación isotérmica de ácido nucleico por desplazamiento de cadena ilustrada, por ejemplo, en la patente US- US-6.214.587. Otros métodos no basados en PCR que pueden utilizarse en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) que se describe, por ejemplo, en Walker y col., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; la patente 5.455.166 y US-5.130.238, y en Walker y col., Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992) o amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada que se describe, por ejemplo, en Lage y col., Genome Research 13:294-307 (2003). Para la amplificación aleatoria de cebador de ADN genómico, pueden utilizarse métodos de amplificación isotérmica con la polimerasa Phi 29 de desplazamiento de cadena o el fragmento grande de ADN polimerasa de Bst, exo- 5'->3'. El uso de estas polimerasas aprovecha su alta procesividad y actividad de desplazamiento de cadenas. La alta procesividad permite que las polimerasas produzcan fragmentos que tienen una longitud de 10-20 kb. Como se ha expuesto anteriormente, pueden producirse fragmentos más pequeños en condiciones isotérmicas utilizando polimerasas que tienen baja procesividad y actividad de desplazamiento de cadena tal como la polimerasa Klenow. Una descripción adicional de reacciones, condiciones y componentes de amplificación, se expone en detalle en la divulgación de patente US-7.670.810. En algunos aspectos, las polimerasas, los reactivos y los componentes requeridos para realizar estas reacciones de amplificación son capaces de pasar a través de los poros de las partículas de contigüidad para interactuar con los ácidos nucleicos, amplificando de este modo los ácidos nucleicos dentro de las perlas de hidrogel. En algunos aspectos, los hexámeros aleatorios se emparejan con el ADN desnaturalizado seguido de la síntesis de desplazamiento de cadena a una temperatura constante en presencia de una enzima catalizadora, Phi 29. Esto da como resultado la amplificación de ADN dentro de las partículas de contigüidad como se confirma por un aumento en la intensidad de fluorescencia (el ADN se tiñó con SYTOX) después de MDA. Independientemente, también puede realizarse tagmentación basada en Nextera después de la lisis y limpieza y posterior amplificación de ADNg mediante PCR, como lo indica un aumento sustancial de la intensidad de fluorescencia dentro de las partículas de contigüidad después de la tagmentación Nextera y la PCR. Después de esta preparación de la biblioteca Nextera, las partículas de contigüidad pueden calentarse hasta 80 °C durante 3 minutos para liberar el contenido de las partículas de contigüidad, es decir, los productos de la biblioteca listos para secuenciar de una célula.

Otro método de amplificación de ácidos nucleicos que es útil en la presente descripción es la PCR con marcaje que utiliza una población de cebadores de dos dominios que tienen una región 5' constante seguida por una región 3' aleatoria como se describe, por ejemplo, en Grothues y col. Nucleic Acids Res. 21(5): 1321-2 (1993). Las primeras rondas de amplificación se llevan a cabo para permitir una multitud de iniciaciones en ADN desnaturalizado por calor basadas en hibridación individual de la región 3' sintetizada al azar. Debido a la naturaleza de la región 3', se contempla que los sitios de iniciación sean aleatorios en todo el genoma. Posteriormente, los cebadores no unidos pueden retirarse y puede producirse una replicación adicional utilizando cebadores complementarios a la región 5' constante.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos se secuencian en total o en parte en las partículas de contigüidad. Los ácidos nucleicos pueden secuenciarse según cualquier metodología de secuenciación adecuada, tal como secuenciación directa, incluyendo secuenciación por síntesis, secuenciación por ligamiento, secuenciación por hibridación, secuenciación de nanoporos y similares.

Una metodología de secuenciación es la secuenciación por síntesis (SBS, *sequencing-by-synthesis*). En la SBS, para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde, se controla la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico (p. ej., un ácido nucleico o amplicón del mismo). El proceso químico subyacente puede ser la polimerización (p. ej., catalizada por una enzima polimerasa). En un aspecto particular de SBS basada en polimerasa, se añaden nucleótidos etiquetados con fluorescencia a un cebador (extendiéndose de ese modo el cebador) de una manera dependiente del molde, de tal modo que, para determinar la secuencia del molde, pueda utilizarse la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador.

Uno o más ácidos nucleicos amplificados pueden someterse a una SBS o a otra técnica de detección que implique el suministro repetido de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más nucleótidos marcados, una ADN polimerasa, etc., pueden fluir hacia/a través de una partícula de contigüidad que contenga una o más moléculas de ácido nucleico amplificado. Pueden detectarse aquellos sitios en los que la extensión del cebador provoque la incorporación de un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que finalice la extensión adicional del cebador una vez que se haya añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, a un cebador se le puede añadir un análogo de nucleótido que tenga una fracción de terminación reversible, de modo que no se pueda producir la extensión posterior hasta que se suministre un agente desbloqueante para eliminar la fracción. Por lo tanto, para aspectos que utilizan terminación reversible, puede suministrarse un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados pueden llevarse a cabo entre los diversos pasos de suministro. Después, el ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando de este modo una secuencia de longitud n. Se describen procedimientos de SBS, sistemas de fluidos y plataformas de detección ilustrativos que pueden adaptarse fácilmente para su uso con amplicones producidos mediante los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, en Bentley y col., *Nature* 456:53-59 (2008), en el documento WO 04/018497; la patente US-7.057.026; WO 91/06678; WO 07/123744; la patente US-7.329.492; la patente US-7.211.414; la patente US-7.315.019; la patente n.º 7.405.281 y documento US 2008/0108082.

Pueden utilizarse otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una cadena de ácido nucleico incipiente (Ronaghi, y col., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi y col. *Science* 281(5375), 363 (1998); la patente US-6.210.891; la patente US-6.258.568 y la patente US-6.274.320). En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar convirtiéndolo inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar mediante fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación se puede controlar a través de un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección a base de fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas fluidicos, detectores y procedimientos útiles que pueden adaptarse para la aplicación de la pirosecuenciación a los amplicones producidos según la presente descripción se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente con número de PCT/US11/57111, US-2005/0191698 A1, patente US-7.595.883, y la patente US-7.244.559.

Algunos aspectos pueden utilizar métodos que suponen la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse a través de interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) entre una polimerasa portadora de fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guías de onda de modo cero (ZMW, *zero mode waveguides*). Se describen técnicas y reactivos de secuenciación basada en FRET, por ejemplo, en Levene y col. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist y col. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korfach y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 105, 1176-1181 (2008).

Algunos aspectos de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, en la secuenciación basada en la detección de protones liberados, puede utilizarse un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles en el comercio. Son ejemplos de dichos sistemas de secuenciación, la pirosecuenciación (p. ej., la plataforma de 454 Life Sciences, una filial de Roche, disponible en el comercio), la secuenciación utilizando nucleótidos marcados con γ -fosfato (p. ej., la plataforma de Pacific Biosciences disponible en el comercio) y la secuenciación utilizando detección de protones (p. ej., la plataforma de Ion Torrent filial de Life Technologies, disponible en el comercio) o los métodos y sistemas de secuenciación descritos en los documentos US 2009/0026082 A1; US-2009/0127589 A1; US-2010/0137143 A1; o US-2010/0282617 A1. Los métodos expuestos en la presente descripción para amplificar ácidos nucleicos diana utilizando exclusión cinética pueden aplicarse fácilmente a sustratos utilizados para detectar protones. Más específicamente, los métodos expuestos en la presente memoria pueden utilizarse para producir poblaciones clonales de amplicones que se utilizan para detectar protones.

Otra técnica de secuenciación es la secuenciación de nanoporos (véase, por ejemplo, Deamer y col. Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer y col. Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002); Li y col. Nat. Mater. 2:611-615 (2003)). En algunos aspectos de secuenciación de nanoporos, el ácido nucleico diana o los nucleótidos individuales eliminados de un ácido nucleico diana pasan a través de un nanoporo. A medida que el ácido nucleico o el nucleótido
 5 pasa a través del nanoporo, cada tipo de nucleótido puede identificarse midiendo las fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro. (Patente US-7.001.792; Soni y col. Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft y col. J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 [2008]).

Los métodos ilustrativos para el análisis de expresión y genotipado basados en matriz que pueden aplicarse a la
 10 detección según la presente divulgación se describen en las patentes US-7.582.420; US-6.890.741; US-6.913.884 o US-6.355.431 o publicación de patente US-2005/0.053.980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

En los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación, como se describe en la presente
 15 memoria, se utilizan diversos reactivos para el aislamiento y la preparación de ácido nucleico. Dichos reactivos pueden incluir, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa de Φ 29, polimerasa de Taq, polimerasa de Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótido trifosfatos, tampones o cationes divalentes. Estos reactivos pasan a través de los poros de las partículas de contigüidad, mientras que el material genético queda retenido
 20 dentro de las partículas de contigüidad. Una ventaja de los métodos expuestos en la presente memoria es que proporcionan un microambiente para el procesamiento de ácidos nucleicos en una partícula de contigüidad.

Los adaptadores pueden incluir sitios de cebadores de secuenciación, sitios de cebadores de amplificación e índices.
 Como se utiliza en la presente memoria, un "índice" puede incluir una secuencia de nucleótidos que puede utilizarse
 25 como un identificador molecular y/o código de barras para etiquetar un ácido nucleico y/o para identificar la fuente de un ácido nucleico. En algunos aspectos, puede utilizarse un índice para identificar un ácido nucleico individual, o una subpoblación de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, las bibliotecas de ácidos nucleicos se pueden preparar dentro de una partícula de contigüidad. En algunos aspectos, una única célula puede procesarse para obtener ácidos nucleicos para asociarlos con una partícula de contigüidad y, a continuación, puede utilizarse para la indexación
 30 combinatoria de los ácidos nucleicos, por ejemplo, utilizando un enfoque de secuenciación de transposición con preservación de la contigüidad (CPT-Seq). En algunos aspectos, el ADN de una única célula puede codificarse mediante la encapsulación de una única célula después de la amplificación de WGA con transposones con código de barras.

Los aspectos de los métodos y técnicas de "indexación espacial" descritos en la presente memoria acortan el análisis
 35 de datos y simplifican el proceso de preparación de bibliotecas a partir de células individuales y moléculas de ADN largas. Los protocolos existentes para la secuenciación de células individuales requieren una separación física eficiente de las células y un código de barras único para cada célula aislada y la agrupación de todo para realizar la secuenciación. Los protocolos actuales para lecturas largas sintéticas también requieren engorrosos pasos de
 40 codificación de barras y agrupan cada fragmento del código de barras para secuenciarlo y permitir el análisis de datos para distinguir la información genética que proviene de cada célula con código de barras. Durante estos largos procesos también hay una pérdida de material genético que provoca pérdidas en las secuencias. Los aspectos descritos en la presente memoria no solo acortan el proceso sino que también aumentan la resolución de datos para células individuales. Además, los aspectos proporcionados en la presente memoria simplifican el ensamblaje de
 45 genomas de nuevos organismos. Los aspectos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para revelar variaciones genéticas raras y la coaparición de mutaciones. En algunos aspectos, la biblioteca de ADN confinada en las partículas de contigüidad hasta su liberación brinda la oportunidad de controlar el tamaño de los fragmentos que se liberan en la superficie controlando el proceso de liberación y la formulación del hidrogel.

En algunos aspectos, la biblioteca puede amplificarse utilizando sitios cebadores en las secuencias adaptadoras, y
 50 secuenciarse utilizando sitios cebadores secuenciadores en las secuencias adaptadoras. En algunos aspectos, las secuencias adaptadoras pueden incluir índices para identificar la fuente de los ácidos nucleicos. La eficiencia de los pasos de amplificación posteriores se puede reducir mediante la formación de dímeros cebadores. Para aumentar la eficiencia de los pasos de amplificación posteriores, los adaptadores monocatenarios no ligados pueden eliminarse
 55 de los productos de ligamiento.

Preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos con partículas de contigüidad

Algunos aspectos del sistema, los métodos y las composiciones proporcionadas en la presente memoria incluyen
 60 métodos en los que los adaptadores se ligan a los ácidos nucleicos diana. Los adaptadores pueden incluir sitios de unión de cebadores de secuenciación, sitios de unión de cebadores de amplificación e índices. Por ejemplo, un adaptador puede incluir una secuencia P5, una secuencia P7 o un complemento de las mismas. Como se utiliza en la presente memoria, una secuencia P5 comprende una secuencia definida por la sec. con núm. de ident.: 1 (AATGATACGGCGACCACCGA) y una secuencia P7 comprende una secuencia definida por la sec. con núm. de
 65 ident.: 2 (CAAGCAGAAGACGGCATACGA). En algunos aspectos, la secuencia P5 o P7 puede incluir además un polinucleótido espaciador, que puede tener de 1 a 20, tal como de 1 a 15, o de 1 a 10, nucleótidos, tal como 2, 3, 4, 5,

- 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, el espaciador incluye 10 nucleótidos. En algunos aspectos, el espaciador es un espaciador poliT, tal como un espaciador 10T. Los nucleótidos espaciadores pueden incluirse en los extremos 5' de los polinucleótidos, que pueden unirse a un soporte adecuado mediante un enlace con el extremo 5' del polinucleótido. Una unión puede lograrse a través de un nucleófilo que contiene azufre, tal como fosforotioato, presente en el extremo 5' del polinucleótido. En algunos aspectos, el polinucleótido incluirá un espaciador poliT y un grupo fosforotioato 5'. Por lo tanto, en algunos aspectos, la secuencia P5 es 5'fosforotioato-TTTTTTTAATGATGGCGACCGA-3', (Id. de sec. n.º: 3) y en algunos aspectos, la secuencia P7 es 5'fosforotioato-TTTTTTTTTT CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (Id. de sec. n.º: 4).
- Los índices pueden ser útiles para identificar la fuente de una molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, un adaptador puede modificarse para impedir la formación de concatámeros, por ejemplo mediante la adición de grupos de bloqueo que impidan la extensión del adaptador en uno o ambos extremos. Como ejemplos de grupos de bloqueo en 3' se incluyen un C3 espaciador en 3', un didesoxinucleótido y una unión a un sustrato. Como ejemplos de grupos de bloqueo en 5' se incluyen un nucleótido desfosforilado en 5' y la unión a un sustrato.
- Los adaptadores incluyen ácidos nucleicos, tal como ácidos nucleicos monocatenarios. Los adaptadores pueden incluir ácidos nucleicos cortos que tengan una longitud menor que, mayor que o igual a aproximadamente 5 nucleótidos, 10 nucleótidos, 20 nucleótidos, 30 nucleótidos, 40 nucleótidos, 50 nucleótidos, 60 nucleótidos, 70 nucleótidos, 80 nucleótidos, 90 nucleótidos, 100 nucleótidos o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunos aspectos, los adaptadores son de tamaño suficiente para pasar a través de los poros de las partículas de contigüidad. Los ácidos nucleicos diana incluyen ADN, tal como ADN genómico o ADNc; ARN, tal como ARNm, ARNp o ARNr; o un híbrido de ADN y ARN. El ácido nucleico se puede aislar de una célula individual. Un ácido nucleico puede contener enlaces fosfodiéster, y puede incluir otros tipos de cadenas principales, que comprendan, por ejemplo, fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces peptídicos de ácido nucleico. Un ácido nucleico puede contener cualquier combinación de desoxirribo- y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantantina, hipoxantantina, isocitosina, isoguanina y análogos de bases tales como nitropirrol (incluyendo 3-nitropirrol) y nitroindol (incluyendo 5-nitroindol). En algunos aspectos, un ácido nucleico puede incluir al menos una base promiscua. Una base promiscua puede emparejarse con más de un tipo diferente de base y puede ser útil, por ejemplo, cuando se incluye en cebadores de oligonucleótidos o insertos que se utilizan para la hibridación aleatoria en muestras complejas de ácido nucleico tales como muestras de ADN genómico. Un ejemplo de una base promiscua incluye inosina que puede emparejarse con adenina, timina o citosina. Otros ejemplos incluyen hipoxantina, 5-nitroindol, 5-nitroindol acíclico, 4-nitropirazol, 4-nitroimidazol y 3-nitropirrol. Pueden utilizarse bases promiscuas que puedan emparejarse con al menos dos, tres, cuatro o más tipos de bases.
- Los ácidos nucleicos diana pueden incluir una muestra en la que el tamaño promedio de un ácido nucleico en la muestra sea menor que, mayor que o igual a aproximadamente 2 kb, 1 kb, 500 pb, 400 pb, 200 pb, 100 pb, 50 pb, o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunos aspectos, el tamaño promedio de un ácido nucleico en la muestra es menor que, mayor que o igual a aproximadamente 2000 nucleótidos, 1000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 400 nucleótidos, 200 nucleótidos, 100 nucleótidos, 50 nucleótidos o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunos aspectos, el ácido nucleico es de un tamaño suficiente para que el ácido nucleico quede atrapado dentro de la partícula de contigüidad de tal modo que no pueda pasar a través de los poros de la partícula de contigüidad.
- Un método de ejemplo incluye desfosforilar los extremos 5' de los ácidos nucleicos diana para impedir la formación de concatámeros en pasos de ligamiento posteriores; ligar los primeros adaptadores a los extremos 3' de las dianas desfosforiladas utilizando una ligasa, en la que se bloquean los extremos 3' de los primeros adaptadores; volver a fosforilar los extremos 5' de las dianas ligadas; ligar un segundo adaptador a los extremos 5' de las dianas desfosforiladas utilizando la ligasa monocatenaria, en la que los extremos 5' de los segundos adaptadores no están fosforilados.
- Otro ejemplo incluye la digestión parcial del ácido nucleico con una exonucleasa 5' para formar un ácido nucleico bicatenario con salientes 3' monocatenarios. Un adaptador que contiene un grupo bloqueante 3' puede ligarse a los extremos 3' del ácido nucleico bicatenario con salientes 3'. El ácido nucleico bicatenario con salientes 3' con adaptadores ligados puede deshibridarse para formar ácidos nucleicos monocatenarios. Un adaptador que contiene un extremo 5' no fosforilado puede ligarse al extremo 5' del ácido nucleico monocatenario.
- Como un método para desfosforilar ácidos nucleicos, tales como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, se incluye poner en contacto un ácido nucleico con una fosfatasa. Como ejemplos de fosfatasas se incluyen fosfatasa intestinal de ternera, fosfatasa alcalina de camarón, fosfatasa antártica y fosfatasa alcalina APEX (Epicentre).
- Como un método para ligar ácidos nucleicos se incluye poner en contacto los ácidos nucleicos con una ligasa. Como ejemplos de ligasas se incluyen ARN ligasa 1 de T4, ARN ligasa 2 de T4, ligasa de RtcB, ARN ligasa de *Methanobacterium* y ARN ligasa de TS2126 (CIRCLIGASA).
- Como un método para fosforilar ácidos nucleicos, tal como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, se incluye poner en contacto un ácido nucleico con una cinasa. Como ejemplo de cinasa se incluye la polinucleótido cinasa T4.

Los aspectos proporcionados en la presente memoria se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos en una partícula de contigüidad, de tal modo que la biblioteca de ácidos nucleicos se prepara en un único volumen de reacción.

Los aspectos de los sistemas y métodos proporcionados en la presente memoria incluyen kits, que contienen uno o más de los polímeros de hidrogel, reticulantes, o dispositivos microfluídicos para preparar partículas de contigüidad, e incluyen además componentes útiles para el procesamiento del material genético, incluidos los reactivos para la lisis celular y la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, o para la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos, que incluyen lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, merasa (por ejemplo, ADN polimerasa de Φ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótidos trifosfatos, tampones, o cationes divalentes tal como se describe en la presente memoria y tal como se utiliza para el procesamiento respectivo del material genético.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de partícula de contigüidad

El siguiente ejemplo demuestra un aspecto de la preparación de partículas de contigüidad asociadas con el transposoma utilizando un generador de gotitas microfluídicas.

Las muestras que contenían células almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se descongelaron a temperatura ambiente. Se transfirieron $100\text{ }\mu\text{l}$ de cada muestra a un tubo estéril de $1,7\text{ ml}$ y la muestra se lavó una vez con 1 ml de NaCl al $0,85\text{ }\%$. La muestra se sedimentó y la solución de lavado se eliminó. El sedimento celular se mezcló con una solución de hidrogel para resuspender las células en la solución de hidrogel.

Para generar partículas de contigüidad de una distribución de tamaño uniforme, se utilizaron generadores de gotitas microfluídicas, tales como el generador ilustrado en la figura 1. La solución que contiene un polímero de hidrogel y una célula se introdujo en un primer canal del generador de gotitas microfluídicas. Se añadió aceite mineral, utilizado como aceite espaciador, a un segundo canal y un agente de reticulación se añadió a un tercer canal. Al entrar en contacto con el reticulante en el tercer canal, el hidrogel formó instantáneamente partículas de contigüidad asociadas a un transposoma. El tipo de aceite reticulante se seleccionó para ajustar la rapidez de la reticulación, incluyendo un reticulante lento o un reticulante instantáneo, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1: Productos químicos de reticulación

Tipo de partícula de contigüidad	Reticulantes	Tiempo de reticulación	Homogeneidad de tamaño	Curado de perlas
Reticulador lento	PEG-epóxido + Peg-amina	>12 horas	Buena	Completa
	PEG-ditiol + PEG-acrilato	4 horas	Promedio	Incompleto
Reticulante instantáneo	Aceite de ditiol + PEG-maleimida	Instantáneo	Buena	Completa
	Epóxido de PEG + aceite de amina	Instantáneo	Buena	Completa

Ejemplo 2 - Coensayos realizados en partículas de contigüidad

El siguiente ejemplo demuestra ensayos ilustrativos realizados en partículas de contigüidad del ejemplo 1, incluyendo SCI-Seq, TACA-Seq, indexación combinatoria y amplificación del genoma completo de una única célula.

Las partículas de contigüidad del ejemplo 1 se obtuvieron y se depositaron sobre una placa que tenía pocillos, de tal modo que se depositó una única partícula de contigüidad en un único pocillo. Las células se lisaron introduciendo un tampón de lisis, seguido de un lavado, extrayendo de este modo los ácidos nucleicos de las células. Las partículas de contigüidad con las células lisadas se expusieron, a continuación, a una serie de ensayos como se describe a continuación.

Se utilizaron transposomas indexados (TSM, por sus siglas en inglés) para el tagmentado del ADN genómico, generando fragmentos TACA-Seq. Después del tratamiento con proteinasa/SDS, se añadió el oligoT con el mismo índice que el TSM a cada pocillo para iniciar la síntesis de ADNc mediante transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés). El adaptador de PCR en el otro extremo se introdujo por extensión aleatoria. Esto generó el índice 1. Las partículas de contigüidad de cada pocillo se agruparon y, a continuación, se dividieron en una placa de PCR indexada para generar el índice 2. Esta indexación de 2 niveles se puede escalar hasta $150.000\text{ (}384 \times 384\text{)}$ celdas; la biblioteca final generada fue una mezcla de TACA-Seq y RNA-Seq, en la que el ADNg y el ADNc de la misma célula se agruparon por el mismo índice, y el patrón oligoT-UMI sirvió como marcador interno para distinguir la señal de ARN de la señal de ATAC.

Además, también se usó una extensión aleatoria para la RNA-seq de longitud completa. En este caso, los índices de TSM fueron diferentes de los índices de los aleatoristas. La coincidencia 1 a 1 entre estos 2 índices ayudó a identificar las lecturas de una única célula y a diferenciar las señales de ADN y ARN. En este método también se aplicó la UMI para mejorar la precisión del análisis de las lecturas.

También se realizó un ensayo de indexación combinatoria de 3 niveles utilizando dos rondas de ligadura en férula indexada y una ronda de PCR indexada. En este método, TSM y oligoT son universales, ya ambos contienen un fragmento splint1, lo que permitió la adición de índices mediante ligadura por férula. La indexación de tres niveles logró un rendimiento de hasta 1 millón de células (96 x 96 x 96). Se realizó otra indexación combinatoria de 3 niveles para TACA-Seq utilizando TSM indexados para aumentar el rendimiento celular. En lugar de utilizar un TSM universal, los TSM contenían un índice único en sus lados B7G y A7G. Se utilizaron dos férulas diferentes para fijar los adaptadores indexados necesarios para la PCR indexada. La indexación incluía los siguientes componentes: secuencia adaptadora B15 (GTCTCGTGGGCTCGG; Id. de sec. n.º: 5), N6 y Link1, formando juntos una secuencia B15_N6_Link1 (GTCTCGTGGGCTCGGNNNNNNGACTTGTC); Id. de sec. n.º: 11: una secuencia Phos_Link2, A7G (TGGTAGAGAGAGGGTG; Id. de sec. n.º: 9) y secuencia ME (AGATGTGTATAAGAGACAG; Id. de sec. n.º: 7), formando juntas una secuencia Phos_Link2_A7G_ME (TAGAGCATNNNNNNTGGTAGAGAGAGAGGGTGAGATGTGTATAAGAGAGACAG; Id. de sec. n.º: 12: una secuencia adaptadora A14 (TCGTCCGCGAGCGTC; Id. de sec. n.º: 6), N6 y Link1, formando juntos una secuencia A14_N6_Link1 (TCGTCCGCGAGCGTCNNNNNNNGTAATCAC; Id. de sec. n.º: 13: y un Phos_Link2, B7G (TACTACTCACCTCCC; Id. de sec. n.º: 10) y secuencia ME (AGATGTGTATAAGAGACAG; Id. de sec. n.º: 7), formando una secuencia Phos_Link2_B7G_ME (CATCATCCNNNNNNTACTACTCACCTCCCAGATGTGTATAAGAGACAG; Id. de sec. n.º: 14: Este ejemplo también proporciona una secuencia complementaria ME (TCTACACACATTCTCTGTC; Id. de sec. n.º: 8), una secuencia a Férula 1 (ATGCTCTAGACAAGT; Id. de sec. n.º: 15) y una secuencia de Férula 2 (GGATGATGGTGATTA; Id. de sec. n.º: 16: En las secuencias, N es A, C, T, o G.

La amplificación del genoma completo de una única célula también se llevó a cabo utilizando las partículas de contigüidad. Esto se hizo mediante la transposición indexada en T7 de partículas de contigüidad en pocillos individuales, seguida de la combinación y la extensión mediante amplificación lineal T7 con transcripción in vitro (IVT). Las perlas se separaron nuevamente para una extensión aleatoria indexada, se agruparon y se dividieron nuevamente para una PCR indexada final.

Las partículas de contigüidad mostraron una tagmentación eficaz cuando fueron dirigidas por transposomas marcados con FAM. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (tinción de ADN con emisión azul) mientras que los núcleos transpuestos se tiñeron de verde fluorescente con FAM (colorante fluorescente). La lisis de las células con SDS aumentó la fluorescencia de fondo de las partículas de contigüidad, mientras que no se observó ninguna señal de las partículas de contigüidad sin células. Los resultados demuestran que se puede generar una biblioteca TACA-seq para las moléculas de ácido nucleico asociadas a partículas de contigüidad con solo una pequeña parte de la fuga de fragmentos cortos por la tagmentación.

Ejemplo 3 - Preparación de la biblioteca de ácidos nucleicos en partículas de contigüidad

El siguiente ejemplo demuestra un método para la preparación de ácidos nucleicos utilizando partículas de contigüidad.

Se obtuvieron partículas de contigüidad como se prepararon en el ejemplo 1. Las partículas de contigüidad (PC) se cargaron en un colador celular de 45 µm y se realizaron múltiples lavados con PBS o Tris-Cl para eliminar cualquier célula no encapsulada. Una ventaja de encapsular una célula en una partícula de contigüidad es una mejor capacidad para manipularlas y procesarlas. Una forma sencilla de hacerlo es mediante el uso de columnas de giro o placas de filtro. El tamaño del poro del filtro puede ser menor que el diámetro de la perla. Los ejemplos de placas de filtro incluyen, pero no se limitan a, las placas de filtro de malla multipantalla de Millipore con un tamaño de poro de 20, 40 y 60 µm, la placa de filtro de migración, invasión y quimiotaxis multipantalla de Millipore con poros de 8,0 µm o las placas de filtro AcroPrep Advance de 96 pocillos de Pall para filtración acuosa con poros de 30 a 40 µm. Con estas placas de filtro, las células encapsuladas en perlas se separaron fácilmente de la solución, permitiendo múltiples intercambios de tampones.

Las perlas lavadas se suspendieron en tampón y se retiraron del filtro. Para estimar la concentración final de las perlas, la eficiencia de la carga celular y garantizar que no quedaran células no encapsuladas, se visualizó al microscopio una alícuota de las perlas.

Para realizar la tagmentación de Nextera, se utilizaron placas de filtro de malla multipantalla de Millipore de 20 µm. Para limitar la adhesión de las perlas al filtro, se humedecieron previamente con Pluronic F-127. Después de la centrifugación de la placa durante 30 segundos a 500 g, el tampón fluyó a través del filtro manteniendo las perlas. Las perlas se lavaron dos veces con 200 ml de tampón Tris-Cl y, a continuación, se suspendieron en tampón de lisis (SDS al 0,1 %). Las perlas se incubaron en un tampón de lisis para lisis antes de retirarlas mediante centrifugación.

Para eliminar el tampón de lisis residual, se realizaron dos lavados adicionales con 200 µL de Tris-Cl. A continuación, las células se suspendieron en 45 µL de tampón de tagmentación 1 x pipeteando hacia arriba y hacia abajo, y, a continuación, se transfirieron a un tubo de tiras. A 45 µL de perlas, se añadieron 5 µL de Tagmentation DNA Enzyme (TDE, Illumina Inc.) y se incubaron en un termociclador durante 1 hora a RT, 30 minutos a 55 °C. Alternativamente, la tagmentación puede realizarse en la placa de filtro suspendiendo las células encapsuladas en perlas en la mezcla maestra de tagmentación e incubándolas en un bloque térmico. Después de la tagmentación, se tiñó una alícuota de perlas con colorante Hoechst y se visualizó al microscopio. La visualización confirmó que el ADN permanece en la perla.

Las perlas tagmentadas (25 µL) se amplificaron por PCR utilizando Nextera PCR MM de Illumina (NPM, Illumina) y cebadores de PCR. A la mezcla maestra de PCR, se añadió SDS al 0,1 % para eliminar el Tn5 unido al ADN. La preincubación se realizó a 75 °C para ayudar a la eliminación de Tn5 en presencia de SDS. Se realizaron once ciclos de PCR para generar una biblioteca final. Después de la PCR, las bibliotecas se purificaron utilizando un 0,9x SPRI, se cuantificaron utilizando dsDNA qubit y/o BioAnalyzer y se secuenciaron en MiSeq y/o NextSeq.

El método descrito en este ejemplo puede ampliarse para realizar la secuenciación de una única célula utilizando un enfoque similar al de sciSEQ (Vitak y col. Nat Meth. 2017;14:302-308). Por ejemplo, el uso de una placa de filtro de 96 pocillos para realizar simultáneamente 96 reacciones de tagmentación indexada puede realizarse en un proceso de aumento de escala. Después de añadir las perlas a la placa, se añaden los tampones sucesivos y, a continuación, se retiran mediante centrifugación o vacío. Después de la tagmentación, las perlas se recogen del filtro y se agrupan. Las perlas agrupadas se redistribuyen en una segunda placa PCR de 96 pocillos para la PCR multiplexada. En este esquema de indexación de doble nivel (tagmentación e indexación por PCR), todos los fragmentos de ADN de una misma célula encapsulada en perlas reciben el mismo código de barras que se puede desconvolucionar para reconstruir el genoma de la célula.

Los pasos descritos en este ejemplo se pueden automatizar en plataformas de manejo de líquidos añadiendo un colector de vacío, tal como el colector de vacío multipantalla HTS de Millipore o el colector de vacío para placas de 96 pocillos de Orochem. Estos colectores de vacío se pueden añadir a muchas plataformas de manejo de líquidos, incluyendo la Biomek FX, la Microlab Star, la Tecan Genesis, etc. La tagmentación podría automatizarse transfiriendo la placa de filtro a un bloque térmico. A continuación, la placa se transfiere de nuevo al colector de vacío para los lavados posteriores a la tagmentación.

Ejemplo 4 - Indexación por lectura prolongada

El siguiente ejemplo demuestra un método de desfase a nivel cromosómico utilizando los métodos y sistemas de indexación de lectura prolongado proporcionados en la presente memoria.

Se prepararon partículas de contigüidad (en la presente memoria también denominadas perlas de contigüidad) que tenían transposomas asociados a las mismas, y se sometieron a los métodos de lectura prolongada unidos descritos en la presente memoria, tal como se analizaron en el antígeno leucocitario humano (HLA). Además de las partículas de contigüidad, también se prepararon perlas de cebador, cada una de las cuales tenía un adaptador, un código de barras y un cebador. Las perlas de contigüidad y las perlas de cebador se dividieron juntas dentro de gotitas (una perla de contigüidad y una perla de cebador por gotita) junto con un cebador en solución mezclado que incluía el adaptador y los cebadores. La tagmentación, la amplificación y la indexación de perlas se realizaron con las gotitas divididas para indexar un grupo de perlas de más de 900.000 códigos de barras, cada código de barras representado de manera relativamente equitativa.

Como se representa en la figura 4, se obtuvo el desfase a nivel cromosómico para el HLA. Utilizando este ensayo, se logró un desfase a nivel cromosómico de hasta 26 Mb, con un error de cambio de longitud de solo 1 de cada 50 Mb y cubriendo más del 99 % de los SNP. El análisis requirió un solo día de ensayos (durante un período de 5,7 horas), en comparación con los 2 días de ensayo típicos que requiere la secuenciación 10X. Además, como se muestra en la figura 5, el número de islas en comparación con la longitud de las islas utilizando los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria muestra una alta calidad del ADN en las métricas de desfase.

La figura 6 representa los resultados de los bloques de llamadas de variantes y desfase utilizando los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria (izquierda) en comparación con la secuenciación 10X (derecha). Estos resultados indican que los métodos proporcionados en la presente memoria dan como resultado una cobertura media que supera la secuenciación 10X y tienen una mayor precisión de INDEL.

Finalmente, como se muestra en la figura 7 y en las figuras 8A y 8B, los métodos de indexación de lectura prolongada descritos en la presente memoria se realizaron en una región HLA (figura 7), HLA-DPA1 (figura 8A) y HLA-A (figura 8B). Los resultados detallados de los métodos de lectura indexada prolongada como se describen en la presente memoria en comparación con la secuenciación 10X se proporcionan en la Tabla 2:

Tabla 2: Resultados detallados de lectura indexada

ES 3 015 114 T3

	Métrica	Método de lectura indexada	10X
	Rendimiento de datos (G)	127 (23X)	150 (30X)
5	Porcentaje de lecturas únicas descodificadas	79	68,1-95,1
	Tamaño promedio de inserción (bp)	175	237-446
	Cobertura de la isla	11,8 %	8,7-14 %
10	Longitud de la isla N50	100k	38k-58k
	SNP Het en fase (%)	99,1	97,2-99,7
	Bloque N50 (Mb)	26	2-15
	Bloque más largo (Mb)	86,3	39,9
15	SNP de conmutador corto (%)	0,12	0,15-0,17
	Interruptor largo (%)	0,002	0,002-0,005
	Códigos de barras activos	>900K	>200K
20	ADN por división (Kb)	6000	500

Los aspectos, ejemplos y figuras descritos en la presente memoria proporcionan composiciones, métodos y sistemas para retener material genético en un espacio físicamente confinado durante el proceso desde la lisis hasta la generación de la biblioteca. Algunos aspectos proporcionan bibliotecas originadas a partir de una molécula individual de ADN larga o una célula individual que se liberan en la superficie de una celda de flujo en un espacio confinado. Una vez que la biblioteca de una molécula individual de ADN o una célula individual de los compartimentos individuales se libera a la superficie de la celda de flujo, la biblioteca de cada compartimento se siembra muy cerca una de la otra.

El término “comprende” tal como se utiliza en la presente memoria, es sinónimo de “incluye”, “contiene” o “caracterizado por” y es inclusivo o abierto y no excluye elementos o pasos de método adicionales no enumerados.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la amplificación indexada de ácidos nucleicos, que comprende:
 - 5 una pluralidad de perlas de contigüidad, cada perla de contigüidad asociada a un transposoma, y que comprende una molécula de ácido nucleico unida a la perla; un grupo de cebadores indexados que comprende:
 - 10 una pluralidad de perlas de cebador, cada perla de cebador que comprende un adaptador, un código de barras y un cebador; y un cebador en solución;

en donde las perlas de contigüidad y las perlas de cebador se dividen juntas dentro de las gotitas; y un detector para obtener datos de secuenciación.
 - 15 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde las perlas de contigüidad y/o las perlas de cebador son perlas de hidrogel que comprenden un polímero de hidrogel y un reticulante, opcionalmente,
 - 20 en donde el polímero de hidrogel comprende (PEG)-tiol/PEG-acrilato, acrilamida/N,N'-bis(acriloil)cistamina (BACy), PEG/óxido de polipropileno (PPO), ácido poliacrílico, poli(hidroximetacrilato de etilo) (PHEMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), polilisina, agar, agarosa, alginato, heparina, sulfato de alginato, sulfato de dextrano, hialuronano, pectina, carragenano, gelatina, quitosano, celulosa o colágeno y, opcionalmente, en donde el reticulante comprende bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, trialilamina, divinilsulfona, éter dialílico de dietilenglicol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetilolpropano trimetacrilato, triacrilato de trimetilol etoxilado o tetracrilato de pentaeritritol etoxilado.
 - 25 3. El sistema de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor.
 - 30 4. El sistema de la reivindicación 1, en donde el cebador es un cebador P5,
 - 35 opcionalmente, en donde el cebador en solución comprende adaptadores y cebadores, y opcionalmente en donde el cebador en solución comprende adaptadores B15 y cebadores P7.
 - 40 5. El sistema de la reivindicación 1, en donde el transposoma comprende transposasa y transposón.
 6. Un dispositivo de celda de flujo para la amplificación indexada de ácidos nucleicos, que comprende: un soporte sólido que comprende una pluralidad de gotitas divididas que comprenden:
 - 45 una perla de contigüidad asociada a un transposoma, y que comprende una molécula de ácido nucleico unida a la perla; y una perla de cebador que comprende un adaptador, un código de barras, y un cebador; en donde a pluralidad de gotitas divididas se distribuyen a lo largo de una superficie del soporte sólido.
 - 50 7. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 6, en donde el soporte sólido está funcionalizado con un polímero de superficie y, opcionalmente, en donde el polímero de superficie es poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-coacrilamida) (PAZAM) o acrilamida libre de silano (SFA).
 - 55 8. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 6, en donde la celda de flujo comprende una superficie con patrones,
 - 60 opcionalmente, en donde la superficie con patrones comprende pocillos, opcionalmente, en donde los pocillos tienen un diámetro de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 50 µm, tal como 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm o 50 µm, o dentro de un intervalo definido por cualquiera de los dos valores mencionados anteriormente, y en donde los pocillos tienen una profundidad de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm, tal como 0,5 µm, 0,6 µm, 0,7 µm, 0,8 µm, 0,9 µm, o 1 µm, o dentro de un intervalo definido por dos de los valores mencionados anteriormente
 - 65 en donde los pocillos están compuestos de material hidrófobo, y

opcionalmente, en donde el material hidrófobo comprende un fluoropolímero amorfo, tal como CYTOP, Fluoropel® o Teflon®.

- 5 9. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor.
- 10 10. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 6, en donde el transposoma comprende transposasa y transposón.
- 10 11. Un método de indexación de ácidos nucleicos que comprende:
- 15 generar una pluralidad de perlas de contigüidad para la tagmentación de perlas, cada perla unida a un transposoma, y que comprende una molécula de ácido nucleico unida a la perla
realizar una reacción de tagmentación en la molécula de ácido nucleico;
15 generar una pluralidad de perlas de cebador, cada perla de cebador comprende un adaptador, un código de barras y un cebador;
dividir las perlas de contigüidad y las perlas de cebador juntas dentro de las gotitas con un cebador en solución;
20 amplificar la molécula de ácido nucleico dentro de las gotitas divididas; y
indexar la molécula de ácido nucleico en cada gotita.
- 25 12. El método de la reivindicación 11, en donde el ácido nucleico es una molécula de ADN de 50.000 pares de bases o mayor.
- 25 13. El método de la reivindicación 11, que comprende además realizar la amplificación del ácido nucleico en la molécula de ácido nucleico antes de realizar la reacción de tagmentación.
- 30 14. El método de la reivindicación 13, en donde la reacción de amplificación comprende la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA),
opcionalmente, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto el ácido nucleico con una mezcla de transposasas que comprende secuencias adaptadoras y transposomas,
y
35 opcionalmente, en donde la indexación se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 40 15. El método de la reivindicación 11, en donde las gotitas se dividen en más de 900.000 compartimentos de PCR indexados diferentes,
opcionalmente, que comprende además dividir las gotitas sobre un soporte sólido, y
opcionalmente, en donde el soporte sólido es un dispositivo de celda de flujo.

45

50

55

60

65

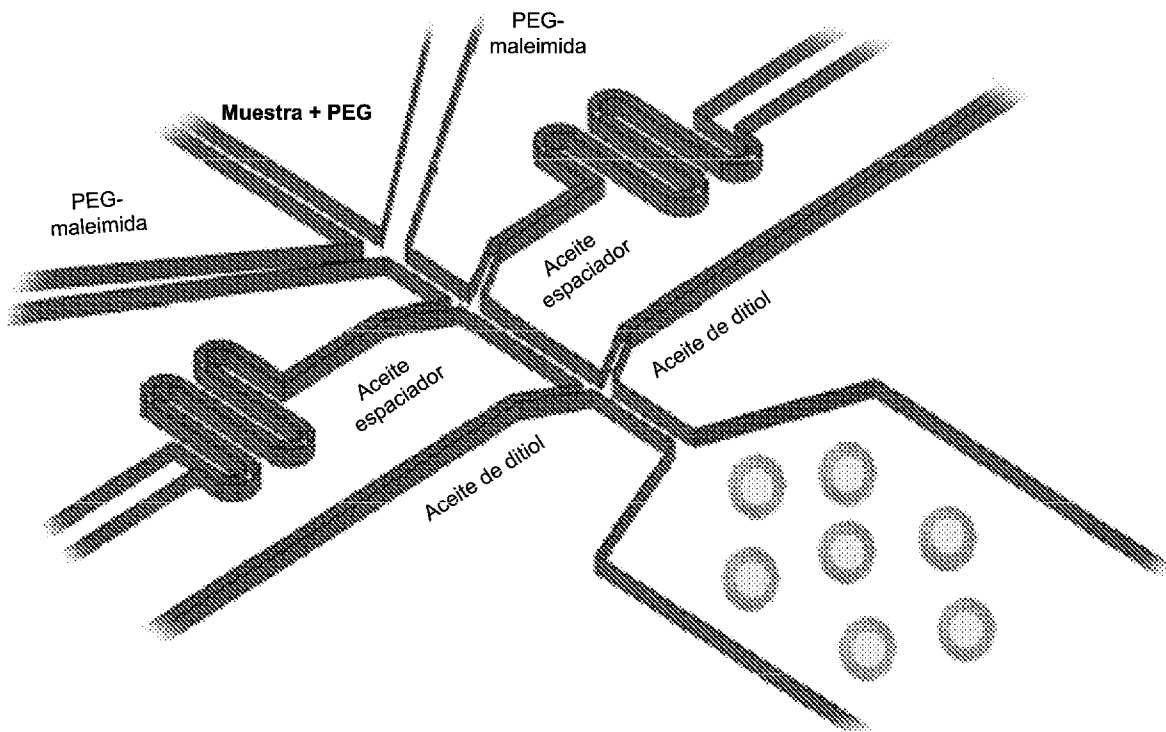


Figura 1

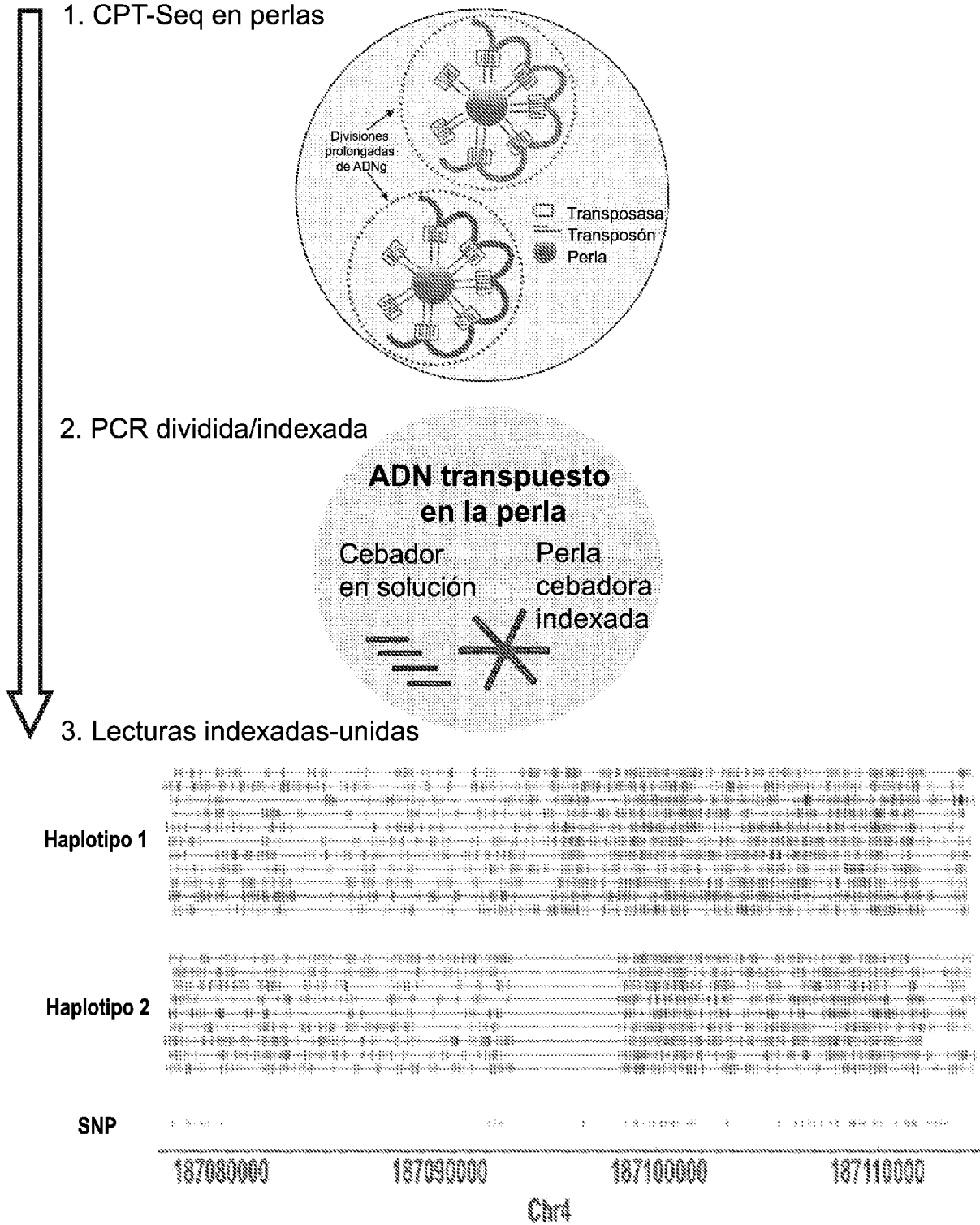
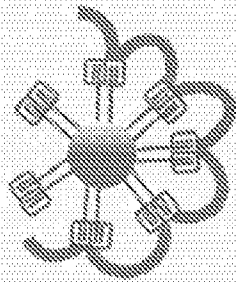


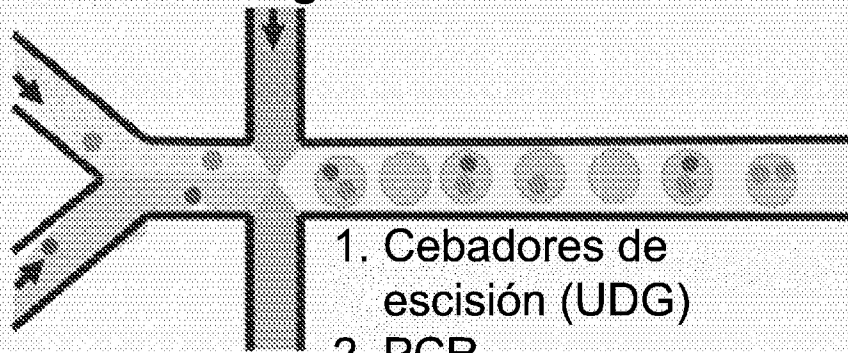
Figura 2

1. CPT-Seq en perlas



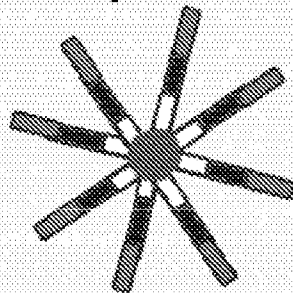
Transposición sin código de barras

2. División de gotitas



1. Cebadores de escisión (UDG)
2. PCR

3. Grupo cebador indexado



- B15-P7 (solución)
- P5
- Código de barras
- Adaptador Nextera
- Perla de hidrogel

Figura 3

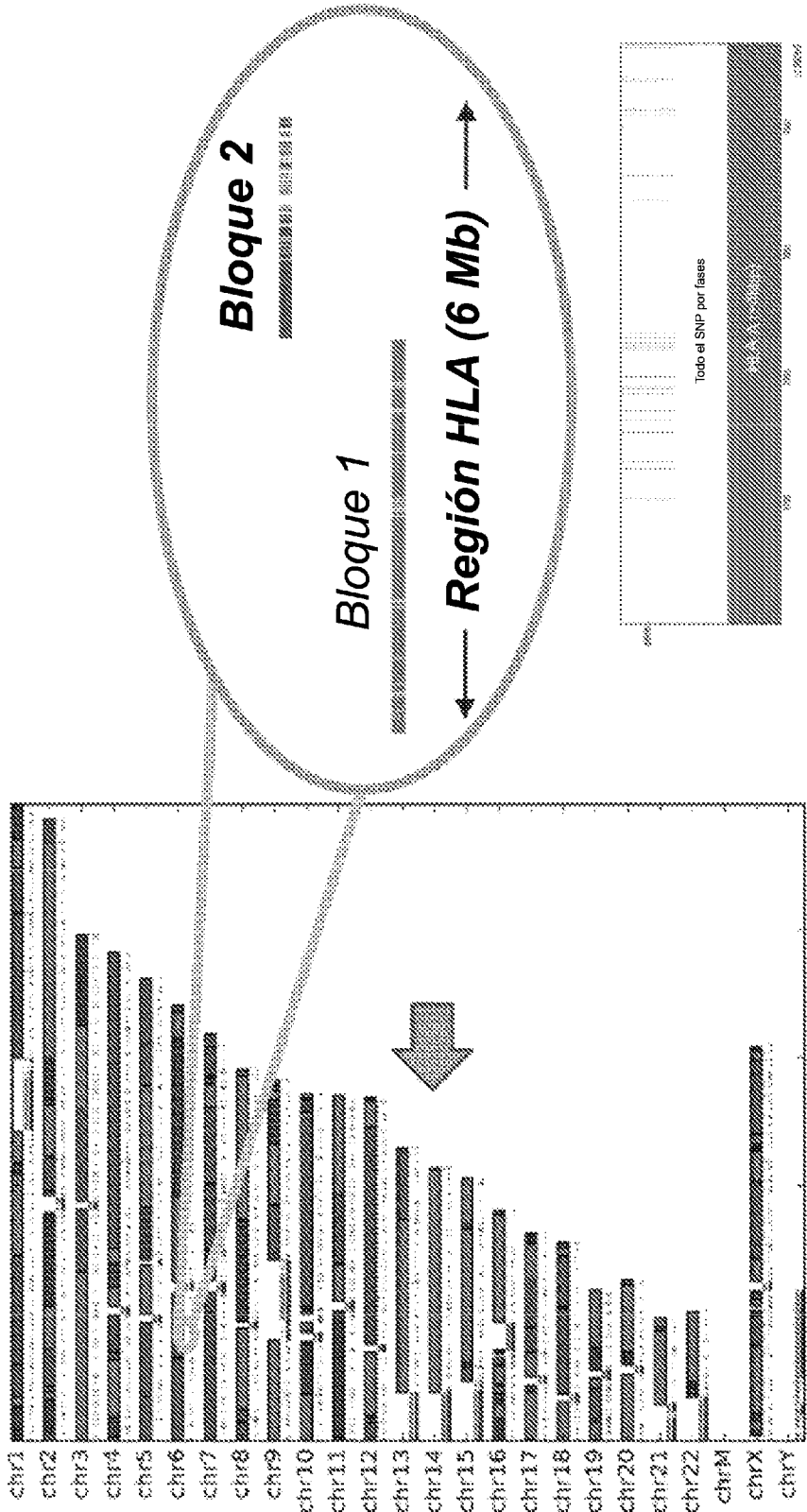


Figura 4

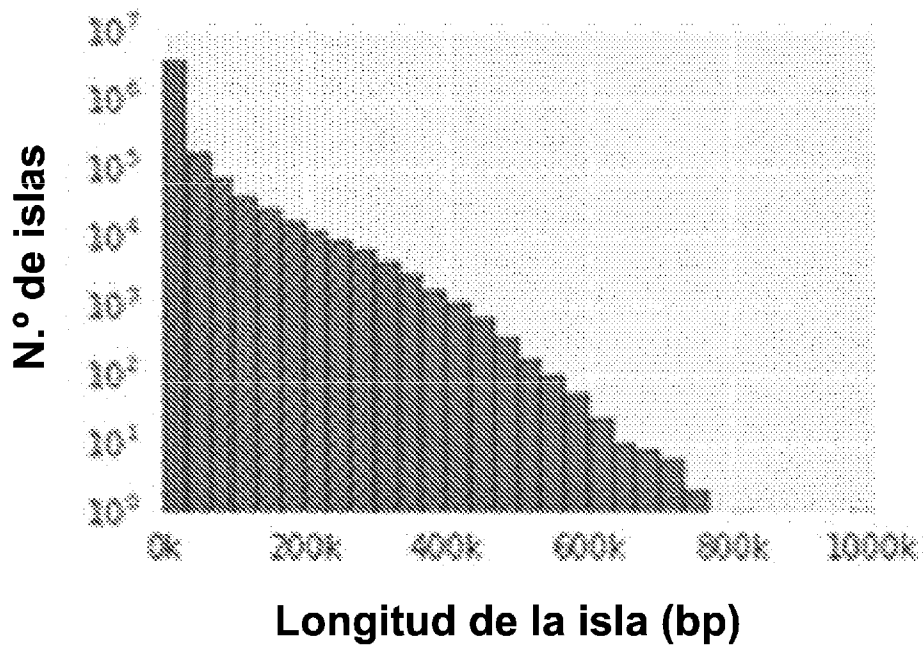


Figura 5

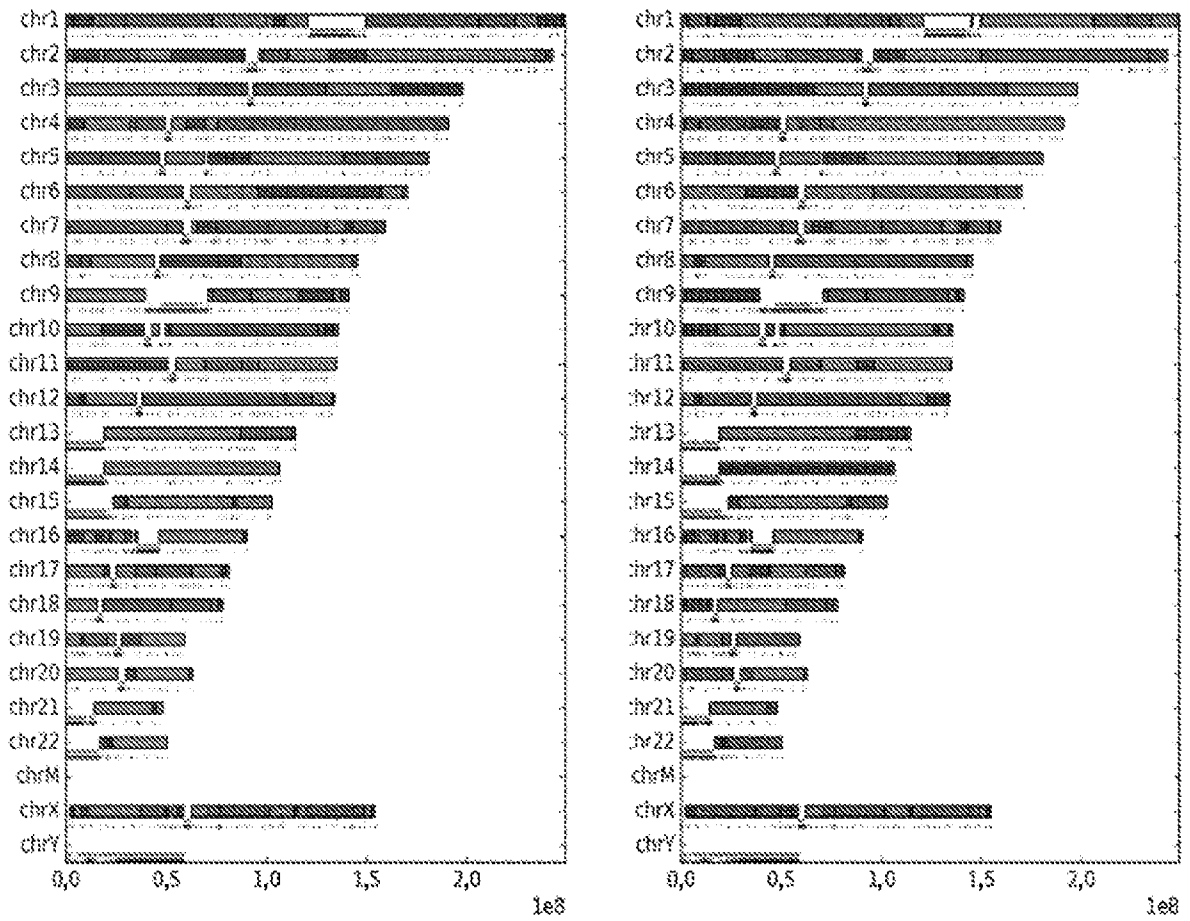


Figura 6

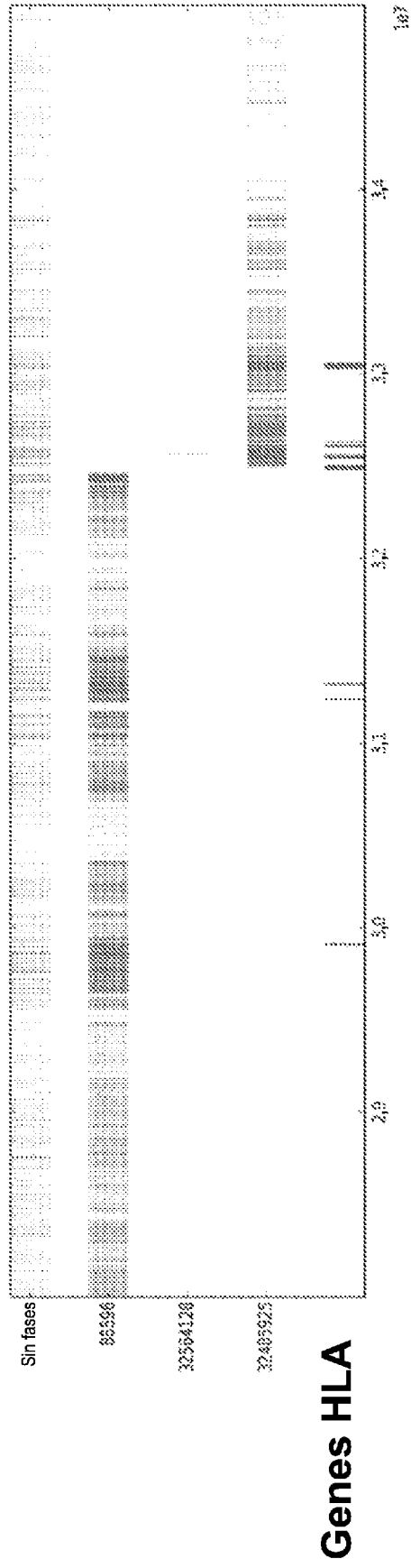


Figura 7

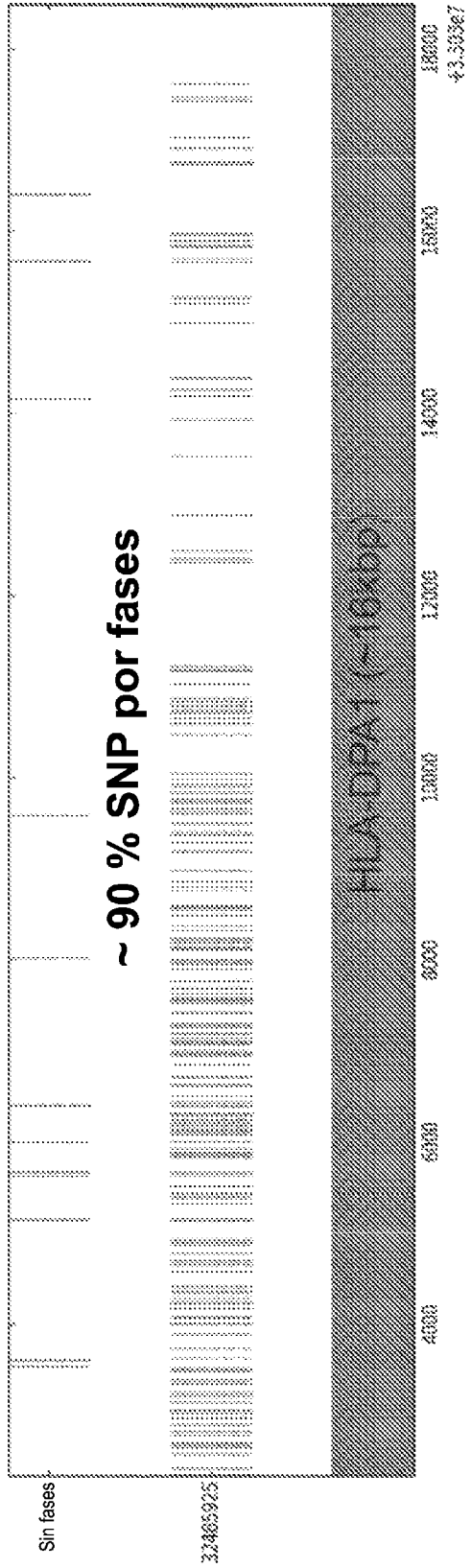


Figura 8A

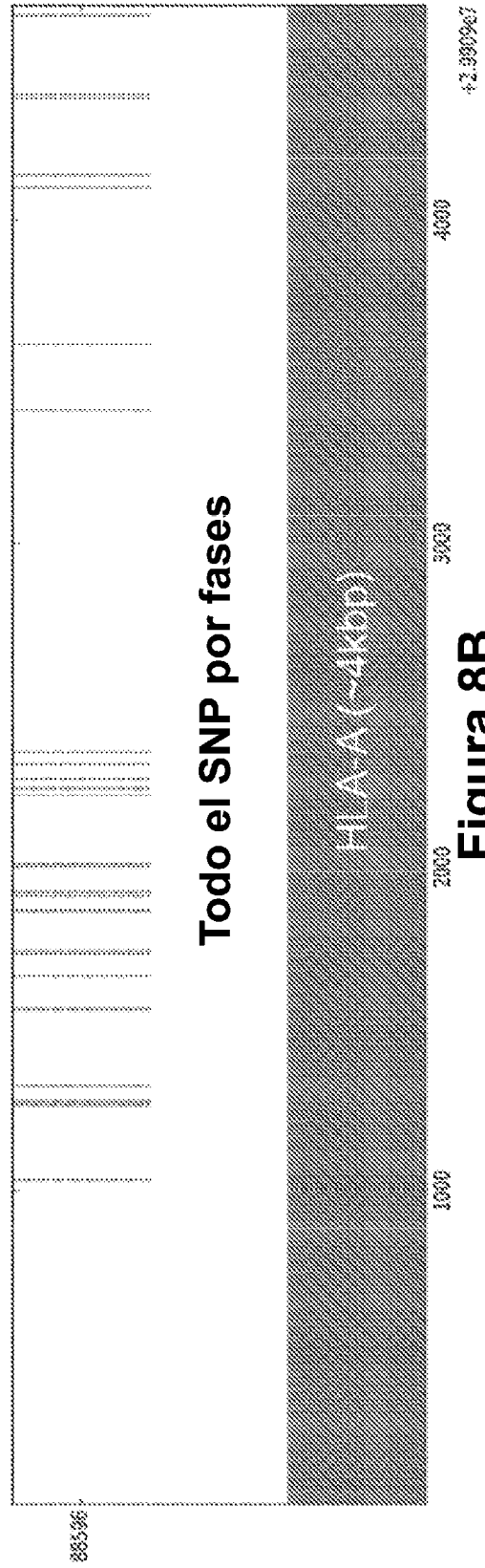


Figura 8B