

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 086**

51 Int. Cl.:

**B01J 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2018 PCT/US2018/053598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019 WO19139650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2018 E 18900310 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3675998**

54 Título: **Método para generar emulsiones monodispersas**

30 Prioridad:

**29.09.2017 US 201762565976 P**

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

**19.02.2025**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)  
1111 Franklin Street, 5th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**ABATE, ADAM R.;  
HATORI, MAKIKO N.;  
LIU, LEQIAN;  
KIM, SAMUEL y  
MODAVI, CYRUS**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 998 086 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

Método para generar emulsiones monodispersas

## 5 Introducción

La microfluídica de gotitas hace avanzar la automatización del laboratorio al reducir los volúmenes de reacción a picolitros y aumentar el procesamiento a kilohertzio. Los dispositivos microfluídicos forman, procesan y clasifican las gotitas suspendidas en un fluido portador; cada gotita proporciona un "tubo de ensayo" aislado en el que se puede realizar una reacción. El rendimiento del enfoque, combinado con el pequeño consumo de reactivo, proporciona un potencial sin precedentes para una nueva era de la ciencia de alto rendimiento. Además, la compartimentalización de gotitas monodispersas es un enfoque versátil para aplicaciones en biología. Sin embargo, el requisito general de microfluídica para la encapsulación de gotitas es una barrera significativa para la mayoría de los investigadores que rara vez tienen acceso a sistemas microfluídicos avanzados. La incapacidad de traducir inmediatamente los avances de la microfluídica de gotitas a los investigadores impide la implementación de nuevas y útiles técnicas de gotitas. La presente descripción aborda los problemas anteriores y proporciona ventajas relacionadas. Los documentos de la técnica anterior que describen la producción de gotitas de emulsión son los documentos WO2015179848A1 y WO2015157369A1.

## 20 Resumen

Los métodos descritos en la presente descripción, denominados como emulsificación con plantilla de partículas (PTE), proporcionan un enfoque mejorado para generar una emulsión monodispersa que encapsula partículas objetivo de interés sin requerir el uso de un dispositivo microfluídico. La presente descripción se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de que se pueden obtener gotitas monodispersas de manera efectiva mediante el uso de partículas monodispersas para servir de plantilla para la formación de gotitas, que pueden incluir, por ejemplo, gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple o vesículas gigantes unilamelares (GUV) (también denominadas en la presente descripción como liposomas), sin destruir la integridad de las gotitas.

En algunas modalidades, las partículas objetivo pueden incluir una población heterogénea de células, virus y/o ácidos nucleicos. En algunas modalidades, las partículas objetivo pueden diluirse antes de la encapsulación, por ejemplo, para encapsular una cantidad controlada de células, virus y/o ácidos nucleicos en las gotitas monodispersas. Los reactivos de síntesis de ácido nucleico, por ejemplo, los reactivos de amplificación del ácido nucleico isotérmicos, los reactivos de amplificación del ácido nucleico no específicos (por ejemplo, los reactivos de MDA), y/o los reactivos de PCR, pueden coencapsularse en las gotitas monodispersas, por ejemplo, junto con una o más partículas objetivo, o añadirse a las gotitas monodispersas en un momento posterior mediante el uso de uno o más de los métodos descritos en la presente descripción para facilitar la detección, clasificación y/o análisis aguas abajo como se describe en la presente descripción.

La invención se define por la reivindicación 1. Las gotitas de emulsión múltiple descritas en la presente descripción pueden formarse al combinar un primer fluido que incluye una pluralidad de partículas objetivo, por ejemplo, células, virus y/o ácidos nucleicos, junto con los reactivos de síntesis de ácido nucleico, con una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas para proporcionar una primera mezcla; combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido; cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas, y una de la pluralidad de partículas objetivo; combinar la segunda mezcla con un tercer fluido, en donde el tercer fluido es inmiscible con el segundo fluido; y cizallar la tercera mezcla para encapsular una o más de las gotitas monodispersas, con o sin las partículas de plantilla monodispersas, en una o más gotitas en el tercer fluido para proporcionar una o más gotitas de emulsión doble. En algunas modalidades, el tercer fluido es inmiscible con el primer y el segundo fluido.

Las GUV pueden generarse a partir de gotitas de emulsión múltiple (por ejemplo, gotitas de emulsión doble) al inducir que las gotitas de emulsión múltiple se sometan a deshumectación, en donde el segundo fluido se expulsa, dejando atrás una membrana de surfactante con una pequeña gotita del segundo fluido adherida al exterior de la membrana.

Las partículas de plantilla monodispersas para su uso en los métodos descritos en la presente descripción pueden generarse, por ejemplo, al hacer fluir un primer fluido, por ejemplo, un precursor de gel líquido, en un canal de un dispositivo microfluídico; y poner en contacto el primer fluido con un segundo fluido, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido, por ejemplo, mediante el uso de un generador de gotitas de emulsión simple. En algunas modalidades, las técnicas de generación de gotitas paralelas que incluyen la división en serie y las placas de distribución pueden usarse para formar las partículas de plantilla monodispersas más rápidamente. Las gotitas de emulsión simple monodispersas se solidifican luego al activar la gelación, por ejemplo, al polimerizar la matriz de gel dentro de las gotitas o al reticular la matriz. En algunas modalidades, puede usarse un surfactante para evitar que las partículas de plantilla monodispersas en contacto se fusionen entre sí. Una o más etapas del método para

generar partículas de plantilla monodispersas pueden realizarse bajo control microfluídico.

En algunas modalidades, una muestra que incluye partículas objetivo, por ejemplo, células, se encapsula en gotitas de emulsión simple monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción o gotitas de emulsión múltiple o GUV preparadas como se describe en la presente descripción y se someten a condiciones de amplificación de ácido nucleico isotérmicas y/o condiciones de amplificación de ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, las células encapsuladas se someten a una o más técnicas de lisis celular, tales como digestión con proteinasa K o lisis térmica. Los ensayos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos o los ensayos de amplificación de ácido nucleico específicos para las células de interés pueden provocar gotitas de emulsión simple monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción o gotitas de emulsión múltiple o GUV preparadas como se describe en la presente descripción que contienen las células de interés, o los ácidos nucleicos que se originan de las células de interés, para que se etiqueten de manera detectable, por ejemplo, etiquetados de manera fluorescente. Las células y/o los ácidos nucleicos celulares pueden recuperarse luego al clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV y recuperar su contenido a través de la ruptura de gotitas, por ejemplo, a través de medios químicos o eléctricos. Las etapas anteriores pueden seguirse por una o más etapas de secuenciación, por ejemplo, una o más técnicas de secuenciación de próxima generación.

Las reacciones de amplificación adicionales que pueden realizarse en gotitas de emulsión simple monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción o gotitas de emulsión múltiple o GUV preparadas como se describe en la presente descripción, incluyen, por ejemplo, la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) y la amplificación por círculo rodante (RCA).

En una modalidad, se proporciona un método para enriquecer una secuencia de ácido nucleico objetivo, en donde el método incluye encapsular una pluralidad de partículas objetivo, que incluyen ácidos nucleicos en una pluralidad de gotitas de emulsión simple monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción o gotitas de emulsión múltiple o GUV preparadas como se describe en la presente descripción; introducir reactivos de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), reactivos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y/u otra síntesis de ácidos nucleicos, por ejemplo, reactivos de amplificación, que incluyen cebadores apropiados, en las gotitas de emulsión simple o gotitas de emulsión múltiple o GUV; incubar las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV en condiciones suficientes para la amplificación por PCR, o condiciones suficientes para la amplificación por MDA seguido de condiciones suficientes para la amplificación por PCR, para producir productos de amplificación por PCR, en donde los cebadores adecuados para PCR pueden incluir uno o más cebadores que se hibridan cada uno con uno o más oligonucleótidos que incorporan la secuencia de ácido nucleico objetivo, y en donde los productos de amplificación por PCR no incluyen la secuencia de ácido nucleico objetivo completa; introducir un componente de detección en las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV ya sea antes o después de la incubación; detectar la presencia o ausencia de los productos de amplificación por PCR mediante la detección del componente de detección, en donde la detección del componente de detección indica la presencia de productos de amplificación por PCR y la secuencia de ácido nucleico objetivo; y clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV en base a la detección del componente de detección, en donde la clasificación separa las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV que incluyen los productos de amplificación por PCR y la secuencia de ácido nucleico objetivo, cuando están presentes, de las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV que no incluyen los productos de amplificación por PCR y la secuencia de ácido nucleico objetivo; y agrupar las secuencias de ácido nucleico de las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV para proporcionar un grupo enriquecido de secuencias de ácido nucleico objetivo, cuando están presentes. Las etapas anteriores pueden seguirse por una o más etapas de secuenciación, por ejemplo, una o más técnicas de secuenciación de próxima generación.

Como se describe en la presente descripción, el término "secuenciación de próxima generación" se refiere generalmente a los avances sobre la secuenciación de ADN estándar (por ejemplo, la secuenciación de Sanger). Aunque la secuenciación de ADN estándar permite al profesional determinar el orden preciso de nucleótidos en la secuencia de ADN, la secuenciación de próxima generación también proporciona la secuenciación paralela, durante la cual pueden secuenciarse al unísono millones de fragmentos de pares de bases de ADN. La secuenciación de ADN estándar generalmente requiere una molécula plantilla de ADN monocatenario, un cebador de ADN y una ADN polimerasa para amplificar la molécula plantilla de ADN. La secuenciación de próxima generación facilita la secuenciación de alto rendimiento, lo que permite secuenciar un genoma completo en un período de tiempo significativamente más corto con relación a la secuenciación de ADN estándar. La secuenciación de próxima generación también puede facilitar la identificación de mutaciones que provocan enfermedades para el diagnóstico de afecciones patológicas. La secuenciación de próxima generación también puede proporcionar información sobre el transcriptoma completo de una muestra en un único análisis sin requerir el conocimiento previo de la secuencia genética.

Cualquier método y reactivo de amplificación de ácido nucleico no específico adecuado, por ejemplo, los métodos y reactivos de MDA, pueden utilizarse en relación con los métodos descritos siempre y cuando tales métodos y reactivos sean compatibles con cualquier etapa de amplificación adicional, por ejemplo, etapas y reactivos de

amplificación posteriores del método, por ejemplo, etapas y reactivos de amplificación por PCR. Un ejemplo de una polimerasa de MDA adecuada, que puede usarse en combinación con una ADN polimerasa Taq es una polimerasa Bst. La polimerasa Bst puede tener ventajas sobre otras polimerasas de MDA, tal como la polimerasa phi29, ya que la polimerasa Bst es eficiente en un intervalo de temperatura más amplio y es activa en condiciones de tampón similares a las de la ADN polimerasa Taq.

En la práctica de los métodos de la presente invención, puede emplearse una amplia gama de diferentes ensayos basados en PCR, tales como PCR cuantitativa (qPCR) y PCR de gotitas digital. La cantidad y la naturaleza de los cebadores usados en tales ensayos pueden variar, en base a, al menos en parte, el tipo de ensayo que se realiza, la naturaleza de la muestra biológica y/u otros factores. En ciertos casos, el número de cebadores que se pueden añadir a una gotita monodispersa, por ejemplo, una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple o una GUV puede ser de 1 a 100 o más, y/o puede incluir cebadores para detectar de aproximadamente 1 a 100 o más genes diferentes (por ejemplo, oncogenes). Además de, o en lugar de, tales cebadores, pueden emplearse una o más sondas (por ejemplo, TaqMan<sup>®</sup> probetas) en la práctica de los métodos de la presente invención.

Como se usa en la presente descripción, los términos "gota" y "gotita" se usan indistintamente para referirse a microcompartimentos diminutos, generalmente esféricos, que contienen al menos un primer fluido, por ejemplo, una fase acuosa (por ejemplo, agua), unidos por un segundo fluido que es inmisible con el primer fluido. En algunos casos, el segundo fluido será un fluido portador de fase inmisible. Las gotitas, que incluyen, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple y de emulsión múltiple, generalmente varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  de diámetro o la dimensión más grande, y pueden usarse para encapsular células, ADN, enzimas y otros componentes. En algunos casos, las gotitas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple y de emulsión múltiple, tienen un diámetro o la dimensión más grande de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ , inclusive, tal como aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 750  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , inclusive. En algunos casos, las gotitas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple y de emulsión múltiple, tienen un diámetro o la dimensión más grande de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

Las GUV, que pueden formarse a partir de gotitas de emulsión doble, generalmente tienen un tamaño similar a las gotitas de emulsión doble de las que se originan. En consecuencia, las GUV descritas en la presente descripción pueden variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  de diámetro o la mayor dimensión. En algunos casos, las GUV descritas en la presente descripción tienen un diámetro o la dimensión más grande de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ , inclusive, tal como 1,0  $\mu\text{m}$  a 750  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ , o 1,0  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , inclusive. En algunos casos, las GUV descritas en la presente descripción tienen un diámetro o la mayor dimensión de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

Las gotitas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple o las GUV, pueden variar, incluso en tamaño, composición, contenido y similares. Las gotitas de emulsión simple o las gotitas de emulsión múltiple o las GUV pueden tener generalmente un volumen interno de aproximadamente 0,001 a 1000 picolitros o más, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 picolitros a aproximadamente 0,01 picolitros, de aproximadamente 0,01 picolitros a aproximadamente 0,1 picolitros, de aproximadamente 0,1 picolitros a aproximadamente 1 picolitro, de aproximadamente 1 picolitro a aproximadamente 10 picolitros, de aproximadamente 10 picolitros a aproximadamente 100 picolitros, o de aproximadamente 100 picolitros a aproximadamente 1000 picolitros o más. Además, las gotitas pueden o no estabilizarse mediante surfactantes y/o partículas.

Los medios por los cuales se añaden reactivos a una gotita, por ejemplo, una gotita de emulsión simple monodispersa o una gotita de emulsión múltiple o GUV pueden variar en gran medida. Los reactivos se pueden añadir en una etapa o en múltiples etapas, tales como 2 o más etapas, 4 o más etapas, o 10 o más etapas. En ciertos casos, se pueden añadir reactivos a las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV a través de una o más etapas de encapsulación y ruptura. Por ejemplo, en algunos casos, el método descrito puede incluir una etapa de encapsular una pluralidad de partículas objetivo, por ejemplo, un virus, célula o ácido nucleico, en una primera gotita monodispersa o GUV, que encapsula uno o más reactivos y la primera gotita monodispersa o GUV en una segunda gotita o GUV, y romper la primera gotita monodispersa o GUV, de esta manera, poniendo la pluralidad de partículas objetivo en contacto con uno o más reactivos.

En uno de tales casos, las células se encapsulan en gotitas de emulsión doble o GUV mediante el uso de gotitas de emulsión simple monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción junto con un tampón de lisis adecuado, se incuban en condiciones suficientes para la lisis celular y/o digestión de proteínas, y se calientan para inactivar las proteasas. Las emulsiones dobles o GUV pueden entonces encapsularse en emulsiones dobles o

GUV que contienen los reactivos adecuados de síntesis de ácido nucleico y se rompen para liberar su contenido en las emulsiones dobles o GUV de encapsulación, , de esta manera, se mezcla el lisado celular con los reactivos de síntesis de ácido nucleico. Las emulsiones dobles o GUV restantes pueden incubarse luego en condiciones adecuadas para la amplificación de ácido nucleico. Debido a sus propiedades hidrófilas e hidrófobas combinadas, las emulsiones dobles o GUV tienen una amplia aplicabilidad en el suministro de fármacos, que incluye la encapsulación y el suministro de fármacos; usos cosméticos, que incluye la encapsulación de cosméticos; y la investigación biomédica, que incluye la compartimentalización in vitro y el aislamiento de cepas en biología sintética con clasificación de emulsión doble basada en FACS y estudios funcionales de proteínas de membrana.

Como una variación del método anterior, las células pueden encapsularse en emulsiones monodispersas simples con un tampón de lisis adecuado. Después de una etapa opcional de inactivación de proteasas, las emulsiones monodispersas simples pueden fusionarse luego mediante la fusión de gotitas con emulsiones monodispersas simples que contienen reactivos adecuados para la síntesis de ácido nucleico. Las gotitas de emulsión simple monodispersas fusionadas pueden encapsularse en emulsiones dobles o GUV para la amplificación subsecuente del ácido nucleico. Alternativamente, las células pueden encapsularse en emulsiones simples con un tampón de lisis adecuado y luego, siguiendo una etapa opcional de inactivación de proteasas, encapsularse en emulsiones dobles o GUV que contienen reactivos de amplificación de ácido nucleico. Se debe señalar que las etapas de encapsulación en emulsiones simples y las etapas de encapsulación en emulsiones dobles pueden realizarse sin el uso de un dispositivo microfluídico.

Como se mencionó anteriormente, donde se utilizan gotitas de emulsión simple monodispersas como se describe en la presente descripción, se pueden utilizar una variedad de técnicas aplicables a las gotitas de emulsión simple, que incluyen, por ejemplo, la coalescencia de gotitas, la picroinyección, la coalescencia de gotitas múltiples y similares, como se describirá más completamente en la presente descripción. En ciertos casos, los reactivos se añaden mediante un método en el que el propio fluido de inyección actúa como un electrodo. El fluido de inyección puede contener uno o más tipos de electrolitos disueltos que permiten que se use como tal. Cuando el propio fluido de inyección actúa como el electrodo, se puede eludir la necesidad de electrodos metálicos en el chip microfluídico con el propósito de añadir reactivos a una gotita. En ciertos casos, el fluido de inyección no actúa como un electrodo, pero se utilizan uno o más electrodos líquidos en lugar de electrodos metálicos.

Pueden emplearse diversas formas de detectar la ausencia o presencia de productos de amplificación de ácido nucleico, mediante el uso de una variedad de componentes de detección diferentes. Los componentes de detección de interés incluyen, entre otros, la fluoresceína y sus derivados; la rodamina y sus derivados; la cianina y sus derivados; la cumarina y sus derivados; Cascade Blue y sus derivados; Lucifer Yellow y sus derivados; BODIPY y sus derivados; y similares. Los fluoróforos ilustrativos incluyen indocarbocianina (C3), indodicarbocianina (C5), Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Texas Red, Pacific Blue, Oregon Green 488, Alexa fluor-355, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor-555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, JOE, Lissamina, Rodamina Verde, BODIPY, isotiocianato de fluoresceína (FITC), carboxi-fluoresceína (FAM), ficoeritrina, rodamina, diclororodamina (dRodamina), carboxi tetrametilrodamina (TAMRA), carboxi-X-rodamina (ROX), LIZ, VIC, NED, PET, SYBR, PicoGreen, RiboGreen y similares. Los componentes de detección pueden incluir perlas (por ejemplo, perlas magnéticas o fluorescentes, tales como perlas Luminex) y similares. En ciertos casos, la detección puede implicar mantener una gotita monodispersa en una posición fija durante el ciclaje térmico para que se pueda visualizar repetidamente. Tal obtención de imágenes repetida puede implicar el uso de una matriz de megagotitas, como se describirá más completamente en la presente descripción. En ciertos casos, la detección puede implicar la fijación y/o permeabilización de una o más células en una o más gotitas monodispersas, por ejemplo, una o más gotitas monodispersas de emulsión múltiple, o GUV.

Los sujetos adecuados para los métodos descritos en la presente descripción incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos. El sujeto puede ser uno que exhiba presentaciones clínicas de una afección de la enfermedad o que se haya diagnosticado con una enfermedad. En ciertos casos, el sujeto puede ser uno que se le ha diagnosticado cáncer, exhibe presentaciones clínicas de cáncer o se determina que está en riesgo de desarrollar cáncer debido a uno o más factores tales como antecedentes familiares, exposición ambiental, mutación genética, estilo de vida (por ejemplo, dieta y/o fumar), la presencia de una o más afecciones de la enfermedad y similares. En ciertos casos, el sujeto puede ser uno que se le ha diagnosticado una infección microbiana, exhibe presentaciones clínicas de una infección microbiana, o se determina que está en riesgo de desarrollar una infección microbiana debido a uno o más factores tales como antecedentes familiares, exposición ambiental, mutación genética, estilo de vida (por ejemplo, dieta y/o viajes), la presencia de una o más afecciones de la enfermedad, y similares. En ciertos casos, el sujeto puede ser uno que se le ha diagnosticado una infección viral, exhibe presentaciones clínicas de una infección viral, o se determina que está en riesgo de desarrollar una infección viral debido a uno o más factores tales como antecedentes familiares, exposición ambiental, mutación genética, estilo de vida (por ejemplo, dieta y/o viajes), la presencia de una o más afecciones de la enfermedad, y similares.

Los dispositivos microfluídicos usados para generar partículas de plantilla monodispersas para su uso en la preparación de gotitas monodispersas, incluyen, entre otros, los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2015/0232942. En algunos casos, un sistema microfluídico que incluye una región de amplificación de ácido nucleico y una región de detección puede usarse en relación con el procesamiento/incubación

y el análisis de las gotitas monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción. En algunos casos, la región de amplificación de ácido nucleico puede incluir un termociclador. En algunos casos, el sistema incluye una región de detección, que detecta la presencia o ausencia de productos de reacción de la región de amplificación de ácido nucleico, y que puede conectarse de forma fluida a la región de amplificación de ácido nucleico. En algunos casos, el sistema incluye medios para añadir un primer reactivo a una gotita de una emulsión simple monodispersa, y/o un elemento de calentamiento. En algunos casos, el sistema incluye una región de clasificación o una región de detección/clasificación de combinación conectada fluidamente a la región de amplificación del ácido nucleico. En algunos casos, alternativamente o además de una región de clasificación "en chip", la clasificación de las gotitas monodispersas puede producirse "fuera del chip". Por ejemplo, en el caso de las emulsiones dobles acuosas de fase inmiscible en fase acuosa, puede utilizarse un dispositivo de citometría de flujo fuera del chip, por ejemplo, un dispositivo FACS o un dispositivo MACS, para clasificar.

#### Breve descripción de las figuras

La invención se puede entender mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con las figuras adjuntas. En las figuras se incluyen las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra un diseño de un dispositivo microfluídico usado para generar partículas para PTE.

La Figura 2 es un esquema que muestra un flujo de trabajo de generación de gotitas monodispersas por PTE de acuerdo con un caso de la presente descripción. El panel A representa combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido que contiene partículas objetivo para proporcionar una primera mezcla. El panel B representa combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido. El panel C representa el cizallamiento de la segunda mezcla de manera que las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas y una de las partículas objetivo.

La Figura 3 es un esquema que muestra un caso del flujo de trabajo de PTE representado en la Figura 2. El panel A representa la adición de perlas de poliacrilamida monodispersas (PAA) a la mezcla de reacción de PCR. El panel B representa la captura de los reactivos de PCR en las perlas de PAA. El panel C representa la eliminación del exceso de solución acuosa. El panel D representa la adición de aceite con surfactante estabilizante, y el panel E representa la generación de emulsiones mediante agitación vorticial. El panel F representa la amplificación de una de una pluralidad de partículas objetivo de ácido nucleico dentro de las gotitas monodispersas y la detección de una señal fluorescente relacionada con el producto de amplificación.

La Figura 4 proporciona imágenes que comparan la monodispersidad de los tamaños de gotitas generados por PTE con relación a la monodispersidad de los tamaños de gotitas generadas mediante el uso de un dispositivo microfluídico. El panel A representa imágenes de gotitas generadas sin partículas de plantilla monodispersas. Las emulsiones se generaron mediante agitación vorticial (izquierda) o mediante el uso de un dispositivo microfluídico (derecha). El panel B representa emulsiones monodispersas generadas mediante el uso de PTE con diferentes composiciones de partículas y detergentes solubles en agua. El panel C representa la distribución del tamaño de las gotitas con diferentes métodos de emulsificación.

La Figura 5 proporciona imágenes de gotitas preparadas bajo diferentes condiciones de PTE como se describe en el Ejemplo 2. El panel A representa las gotitas preparadas mediante agitación vorticial de las partículas de PAA (sin surfactante de fase acuosa) durante 20 minutos. El panel B representa las gotitas preparadas mediante agitación vorticial de las partículas de PAA con 1 % de polietilenglicol (Sigma-Aldrich) durante 3 minutos. El panel C representa las gotitas preparadas mediante agitación vorticial de las partículas de PAA con 2 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante 3 minutos. El panel D representa las gotitas preparadas al mezclar las partículas de PAA con 0,5 % de Tritón con FC-40 con 5 % de flurosurfactante y agitación vorticial durante 3 minutos. El panel E representa las gotitas preparadas mediante el uso de las partículas de PAA con 0,18 % de *N,N'*-bisacriloilcistamina como reticulante y agitación vorticial de las partículas de PAA con 0,5 % de Tritón durante 30 segundos.

La Figura 6 proporciona imágenes e histogramas de gotitas generadas con diferentes tiempos de agitación vorticial. El panel A representa imágenes e histogramas con un tiempo de agitación vorticial de 5 s. El panel B representa imágenes e histogramas con un tiempo de agitación vorticial de 15 s. El panel C representa imágenes e histogramas con un tiempo de agitación vorticial de 1 min. Las imágenes y los histogramas del panel D con un tiempo de agitación vorticial de 2 min.

La Figura 7 proporciona los resultados de una demostración que indica que PTE permite la producción de emulsiones monodispersas de escalas de microlitros a mililitros. El panel A representa imágenes de emulsiones de PTE de diferentes volúmenes totales. El panel B representa histogramas de la distribución del tamaño de las gotitas para las emulsiones de 200  $\mu$ l y 2 ml. El panel C proporciona una tabla que compara el tiempo de generación de gotitas de los métodos de generación basados en PTE y microfluídica.

La Figura 8 proporciona imágenes de la PCR de gotitas digitales-PTE (ddPCR) y la cuantificación mediante el uso de partículas de plantilla monodispersas. El panel A representa imágenes de fluorescencia de gotitas después de la amplificación por PCR con sondas y cebadores TaqMan<sup>®</sup> para las plantillas de ADN genómico de levadura con factores de dilución variables (A.U. = 0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0). Las fracciones de gotitas positivas a la fluorescencia observadas corresponden con las concentraciones de la plantilla. El panel B representa un gráfico de dispersión que muestra el tamaño y la distribución de fluorescencia de una muestra en la serie de

dilución. La población con baja fluorescencia ( $< 20$  AU) y diámetro pequeño ( $< 30 \mu\text{m}$ ) se compone de gotitas que no contienen partículas de hidrogel. La población con diámetro esperado ( $30\text{-}40 \mu\text{m}$ ) consiste en gotitas de núcleo de hidrogel simples. Esta población forma dos conglomerados compactos: alta fluorescencia (PCR-positiva) y baja fluorescencia (PCR-negativa, gotitas sin plantilla). El panel C representa el número promedio de copias de plantilla por gotita estimado al asumir una escala de distribución de Poisson con las concentraciones de plantilla controladas en el intervalo de tres décadas probado ( $R^2=0,9994$  y las barras de error representan la desviación estándar).

La Figura 9 proporciona un gráfico que muestra los resultados con ddPCR microfluídica para la comparación. El número promedio de copias de plantilla por gotita se estimó al asumir una escala de distribución de Poisson con las concentraciones de plantilla controladas en el intervalo de tres décadas probado ( $R^2=0,9993$  y la barra de error representa el error estándar).

Las Figuras 10A y 10B proporcionan esquemas, imágenes y gráficos de ddPCR basada en PTE y cuantificación con partículas disponibles comercialmente. La Figura 10A representa un esquema que muestra la generación de gotitas útiles para la ddPCR basada en PTE mediante el uso de partículas comerciales cuasi monodispersas. La Figura 10B, el panel A representa imágenes de fluorescencia después de la amplificación por PCR de ADN genómico de levadura a diferentes concentraciones (A.U. = 0, 0,1, 1). La Figura 10B, el panel B representa un gráfico de dispersión que muestra el tamaño y la distribución de fluorescencia de una muestra en la serie de dilución. Los positivos y negativos de fluorescencia son claramente distinguibles entre sí, lo que permite la cuantificación mediante análisis de imágenes. La Figura 10B, el panel C representa los valores del estimador de Poisson que se obtienen mediante el uso de distribuciones de múltiples Poisson ponderadas por volúmenes de gotitas, que muestran una correlación lineal con la concentración de la plantilla ( $R^2=0,9409$  y las barras de error representan la desviación estándar).

La Figura 11 proporciona imágenes que muestran la ddPCR multiplexada basada en PTE de ADN de virus lambda y levadura mixto. El panel A representa las sondas que se dirigen al virus lambda o a la levadura que se etiquetan de forma fluorescente con Cy5 (rojo) y carboxi-fluoresceína (FAM) (verde), respectivamente. El panel B representa células de levadura que crecen en gotitas preparadas por PTE. Después de 10 horas de incubación, las colonias que crecen a partir de células encapsuladas únicas se pueden detectar mediante fluorescencia de proteína amarilla fluorescente endógena (YFP).

La Figura 12 proporciona imágenes de emulsiones monodispersas preparadas en un formato de placa de 96 pocillos como se analizó en el Ejemplo 7.

La Figura 13 proporciona un esquema e imágenes relacionadas de un flujo de trabajo para generar emulsiones dobles y GUV (es decir, liposomas) a través de PTE. El panel A representa un flujo de trabajo esquemático del método de generación de liposomas instantáneo. El panel B representa una emulsión simple formada mediante la agitación vorticial con perlas de poliacrilamida. El panel C representa una imagen de un liposoma que se forma al añadir una solución acuosa externa seguida de agitación vorticial. Barra de escala =  $400 \mu\text{m}$ . El panel D representa una imagen fluorescente de un liposoma formado con lípido fluorescente adicional en la fase oleosa.

Las Figuras 14A-C proporcionan un diagrama esquemático de un método para realizar la scRNA-seq de alto rendimiento mediante PTE. La Figura 14A representa las perlas de Drop-seq que se encapsulan en hidrogeles. Las células, la proteinasa K y el tampón de hibridación se mezclan. La Figura 14B representa la agitación vorticial de la mezcla para la emulsificación. La Figura 14C representa la recuperación de las perlas de Drop-seq y la secuenciación de RT, seguida del análisis de datos.

La Figura 15 proporciona los resultados de imágenes de experimentos que realizan la scRNA-seq de alto rendimiento mediante PTE, una scRNA-seq sin microfluídica. El panel A representa una imagen microscópica de partículas con perlas de Drop-seq, que tiene una barra de escala de  $2000 \mu\text{m}$ . El panel B representa una imagen microscópica de emulsiones con perlas de Drop-seq, que tienen una barra de escala de  $1000 \mu\text{m}$ . El panel C, con una barra de escala de  $400 \mu\text{m}$ , y el panel D, con una barra de escala de  $1000 \mu\text{m}$ , representan imágenes microscópicas de células teñidas con calceína verde encapsuladas en gotitas antes y después de la lisis. El panel E proporciona un gráfico que representa los datos de un experimento de células mixtas de ratón y humano.

La Figura 16 proporciona un diagrama esquemático de un caso de un flujo de trabajo para crear un microgel núcleo-cubierta mediante el uso de la tecnología de emulsión instantánea, que combina la PTE basada en afinidad con el análisis dirigido.

La Figura 17 proporciona imágenes de perlas de núcleo de poliacrilamida con una cubierta de agarosa. El panel A representa las perlas de núcleo de poliacrilamida rodeadas por una cubierta de agarosa después de que se rompen las gotitas. El panel B representa ddPCR en perlas de núcleo de poliacrilamida con una cubierta de agarosa a dos factores de dilución. El panel C representa imágenes de las gotitas después de FACS. El panel D representa el resultado de la qPCR.

#### Descripción detallada

La presente descripción proporciona un método de emulsificación con plantilla de partículas (PTE) mejorado para generar emulsiones monodispersas como se define en la reivindicación 1. Las gotitas presentes en tales emulsiones se denominan indistintamente en la presente descripción como gotitas de PTE y PIP. Los métodos descritos facilitan la encapsulación y el análisis posterior de partículas objetivo de interés sin requerir el uso de un dispositivo microfluídico. Los métodos descritos implican el uso de partículas monodispersas para servir como plantilla para la formación de gotitas monodispersas.

Los métodos descritos facilitan la encapsulación de partículas objetivo, por ejemplo, ácidos nucleicos, que luego pueden detectarse, cuantificarse y/o clasificarse, por ejemplo, en base a su secuencia como se detecta con técnicas de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, PCR y/o MDA.

5 También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir casos particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas.

10 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente lo indique de cualquier otra manera, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en ese intervalo declarado, se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se abarcan dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Donde el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

15 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales potenciales e ilustrativos.

20 Se debe señalar que como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente indique de cualquier otra manera. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una gotita" incluye una pluralidad de tales gotitas y la referencia al "ácido nucleico" incluye la referencia a uno o más ácidos nucleicos y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, etcétera.

25 Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento que pueda ser opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la enumeración de elementos de acuerdo con la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

30 Las publicaciones analizadas en la presente descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmarse independientemente.

35 Por ejemplo, en la presente descripción se describen una variedad de métodos y aplicaciones adicionales, que pueden realizarse en relación con los métodos descritos en la presente descripción relacionados con la generación de una emulsión monodispersa o que pueden utilizar las gotitas monodispersas preparadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción para la generación de una emulsión monodispersa. Tales métodos y aplicaciones incluyen, sin limitación, los descritos en las secciones en la presente descripción, tituladas: Métodos; Partículas de plantilla monodispersas y generación de estas; Gotitas monodispersas, que incluyen gotitas de emulsión simple y gotitas de emulsión múltiple, y generación de estas; vesículas unilamelares gigantes (GUV); fluidos involucrados en la generación de emulsiones monodispersas; surfactantes; cizallamiento; adición de reactivos a gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; restos de enlace; reacciones en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; detección de productos de PCR; detección de células (por ejemplo, células tumorales) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; detección de ácido nucleico en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; amplificación por desplazamiento múltiple; PCR; PCR doble; PCR digital; secuenciación de ARN (RNAseq); medición de las longitudes de los ácidos nucleicos; enriquecimiento microfluídico para análisis de secuencias (MESA) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; clasificación de células activadas por PCR (PACS) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; clasificación de células activadas por PCR de células vivas (PACS); clasificación de células activadas por espectrometría de masas (MS-ACS); crecimiento y lisis de colonias; multiplexación; ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) digital; ensayo inmunoabsorbente ligado a oligonucleótidos digital (dOLISA); clasificación; sujetos y/o muestras adecuadas; detección de proteínas o ADN con sondas ligadas a enzimas; y detección del cáncer.

#### 60 Métodos

65 Como se resumió anteriormente, la presente descripción proporciona un método de PTE mejorado para generar emulsiones monodispersas como se define en la reivindicación 1. Los métodos descritos facilitan la encapsulación y, opcionalmente, el análisis posterior de partículas objetivo de interés sin requerir el uso de un dispositivo microfluídico. En particular, los métodos descritos implican la producción de gotitas que contienen partículas objetivo monodispersas sin la necesidad de sistemas microfluídicos avanzados. Si bien los sistemas microfluídicos pueden usarse en relación con las gotitas monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción, por

ejemplo, para la adición de reactivos a las gotitas o para la clasificación de las gotitas, tales sistemas no son necesarios para la producción de las gotitas monodispersas en sí mismas. Los métodos descritos implican el uso de partículas monodispersas para servir de plantilla para la formación de gotitas monodispersas mediante la aplicación de una fuerza de cizallamiento, que puede aplicarse, por ejemplo, mediante el uso de un homogeneizador (por ejemplo, un mezclador vorticial), pasar una mezcla adecuada a través de una punta de pipeta, agitar una mezcla adecuada mediante el uso de un agitador de perlas, o cualquier otro método adecuado.

Como se usa en la presente descripción, el término "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de una variedad de fuentes, cuyos tipos de muestras contienen material biológico. Por ejemplo, el término incluye muestras biológicas obtenidas de un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano, y muestras biológicas obtenidas de un alimento, agua u otra fuente ambiental, etc. La definición abarca muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, así como también muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos y la progenie de estos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su adquisición, tal como mediante el tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como polinucleótidos. El término "muestra biológica" abarca una muestra clínica, e incluye, además, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, células, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. "Muestra biológica" incluye células, por ejemplo, células bacterianas o células eucariotas; fluidos biológicos tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, semen, saliva y similares; bilis; médula ósea; piel (por ejemplo, biopsia de piel); y anticuerpos obtenidos de un individuo.

Como se describe más completamente en la presente descripción, en diversos casos los métodos de la presente invención pueden usarse para detectar una variedad de componentes de tales muestras biológicas. Los componentes de interés incluyen, pero no se limitan a, células (por ejemplo, células circulantes y/o células tumorales circulantes), virus, polinucleótidos (por ejemplo, ADN y/o ARN), polipéptidos (por ejemplo, péptidos y/o proteínas) y muchos otros componentes que pueden estar presentes en una muestra biológica.

"Polinucleótidos" u "oligonucleótidos" como se usan en la presente descripción, se refieren a polímeros lineales de monómeros de nucleótidos, y pueden usarse indistintamente. Los polinucleótidos y los oligonucleótidos pueden tener cualquiera de una variedad de configuraciones estructurales, por ejemplo, ser monocatenarios, bicatenarios o una combinación de ambos, así como también tener estructuras secundarias/terciarias intramoleculares o intermoleculares de orden superior, por ejemplo, horquillas, bucles, regiones de triple cadena, etc. Los polinucleótidos típicamente varían en tamaño de unas pocas unidades monoméricas, por ejemplo, 5-40, cuando se refieren comúnmente como "oligonucleótidos", a varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido se represente por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tal como "ATGCCTG", se debe entender que los nucleótidos están en el orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxiinosina, "U" denota uridina, a menos que se indique de otra forma o sea obvio por el contexto. A menos que se indique de cualquier otra manera, la terminología y las convenciones de numeración de átomos seguirán las divulgadas en el documento de Strachan y Read, *Human Molecular Genetics 2* (Wiley-Liss, Nueva York, 1999).

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", usados indistintamente en la presente descripción, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo terminal carboxilo de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura estándar de polipéptidos, se usa el documento J. Biol. Chem., 243 (1969), 3552-3559.

En ciertos casos, se proporcionan métodos para contar y/o genotipar células, que incluyen células normales o células tumorales, tales como CTC. Una característica de tales métodos es el uso de la microfluídica.

Los métodos descritos en la presente descripción generalmente implican generar una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, que pueden seguirse, por ejemplo, por una o más etapas de síntesis de ácido nucleico, y/o uno o más etapas de detección y/o clasificación. La Figura 2 presenta un esquema que muestra un flujo de trabajo de PTE de acuerdo con una modalidad de la presente descripción. El panel A representa una primera etapa de la combinación de una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido que contiene partículas objetivo para proporcionar una primera mezcla. El panel B representa una segunda etapa de combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido. El panel C representa una etapa de cizallamiento de la segunda mezcla de manera que las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en gotitas monodispersas en el segundo fluido. Como resultado de estas etapas se proporcionan gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas y una de las partículas objetivo.

Después de la generación de las gotitas monodispersas, tales gotitas pueden estar sujetas a cualquiera de una variedad de flujos de trabajo, técnicas y/o reacciones adecuadas como se describe en la presente descripción o como se conoce de cualquier otra manera en la técnica en relación con el análisis basado en gotitas de partículas

objetivo tales como células, virus y componentes de los mismos, tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN y ARN. Pueden encontrarse métodos adicionales de análisis basado en gotitas, que pueden usarse en relación con las gotitas monodispersas preparadas de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, por ejemplo en las siguientes publicaciones, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2015/0232942, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2017/0121756, publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2017/0022538, y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2017/0009274.

La Figura 3 presenta un esquema que muestra una modalidad más detallada del flujo de trabajo de PTE mostrado en la Figura 2. El panel A representa una etapa de adición de perlas de poliacrilamida (PAA) monodispersas a la mezcla de reacción de PCR, que puede incluir, por ejemplo, ácidos nucleicos plantilla, cebadores, sondas, dNTP y una enzima adecuada (por ejemplo, polimerasa Taq) para proporcionar una primera mezcla. El panel B representa una etapa de captura de los reactivos de PCR en las perlas de PAA al remojar las perlas de PAA en la mezcla de reacción de PCR. El panel C representa una etapa de eliminación del exceso de solución acuosa de la primera mezcla después de sumergir las perlas de PAA en la mezcla de reacción de PCR. El panel D representa una etapa de adición de aceite (un segundo fluido que es inmisible con la mezcla de reacción de PCR) con un surfactante estabilizante para proporcionar una segunda mezcla. El panel E representa una etapa de generación de emulsiones monodispersas mediante la agitación vorticial de la segunda mezcla. El panel F representa una etapa de amplificar una de una pluralidad de partículas objetivo de ácido nucleico dentro de las gotitas monodispersas y la detección de una señal fluorescente relacionada con el producto de amplificación.

Una característica de ciertos métodos descritos en la presente descripción es el uso de un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de ciertos oligonucleótidos y/o genes, por ejemplo, oncogén(es) presentes en células. Los ejemplos de ensayos basados en PCR de interés incluyen, entre otros, PCR cuantitativa (qPCR), PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR), PCR fluorescente multiplexada (MF-PCR), PCR de gotitas digital (ddPCR), PCR de célula única, PCR-RFLP/PCR-RFLP en tiempo real, PCR de inicio en caliente, PCR anidada, PCR de colonias in situ, amplificación por círculo rodante (RCA) in situ, PCR de puente, PCR de picotituladora, PCR de emulsión y PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR). Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de ligasa (LCR), la amplificación de transcripción, la replicación de secuencias autosostenidas, la amplificación selectiva de secuencias polinucleotídicas objetivo, la reacción en cadena de polimerasa cebada por secuencia de consenso (CP-PCR), la reacción en cadena de polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), la PCR cebada por oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR) y la amplificación de secuencias basada en ácidos nucleicos (NABSA).

Puede usarse un ensayo basado en PCR para detectar la presencia de ciertos genes, tales como ciertos oncogenes. En tales ensayos, uno o más cebadores específicos para cada gen de interés reaccionan con el genoma de cada célula. Estos cebadores tienen secuencias específicas para el gen particular, de modo que solo hibridarán e iniciarán la PCR cuando sean complementarios al genoma de la célula. Si el gen de interés está presente y el cebador coincide, se crean muchas copias del gen. Para determinar si un gen particular está presente, los productos de PCR pueden detectarse a través de un ensayo que sondea el líquido de la gotita monodispersa, tal como al tefiir la solución con un colorante de intercalación, como SybrGreen o bromuro de etidio, hibridando los productos de PCR a un sustrato sólido, tal como una perla (por ejemplo, perlas magnéticas o fluorescentes, tales como perlas Luminex), o detectándolos a través de una reacción intermolecular, tal como FRET. Estos colorantes, perlas y similares son cada uno ejemplos de un "componente de detección", un término que se usa de manera amplia y genérica en la presente descripción para referirse a cualquier componente que se usa para detectar la presencia o ausencia de productos de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, productos de PCR.

Más abajo, se describirán en mayor detalle un número de variaciones de estos enfoques básicos.

Partículas de plantilla monodispersas y generación de estas

Como se usa en la presente descripción, el término "monodispersas", como se aplica a las partículas de plantilla, se refiere a una variación en el diámetro o la dimensión más grande de las partículas de plantilla, de manera que el 99 % o más de las partículas de plantilla varían en diámetro por menos de un factor de 10, por ejemplo, menos de un factor de 5, menos de un factor de 4, menos de un factor de 3, menos de un factor de 2, menos de un factor de 1,5, menos de un factor de 1,4, menos de un factor de 1,3, menos de un factor de 1,2, menos de un factor de 1,1, menos de un factor de 1,05 o menos de un factor de 1,01.

Como se usa en la presente descripción, el término "partículas de plantilla" y "partícula de plantilla" se usan indistintamente para referirse a partículas diminutas, generalmente esféricas. Las partículas de plantilla pueden ser porosas o no porosas. En cualquier modalidad adecuada en la presente descripción, las partículas de plantilla pueden incluir microcompartimentos, que pueden contener componentes y/o reactivos adicionales, por ejemplo, componentes y/o reactivos adicionales que pueden liberarse en gotitas monodispersas como se describe en la presente descripción. En cualquier modalidad adecuada en la presente descripción, las partículas de plantilla pueden incluir un polímero, por ejemplo, un hidrogel. En algunas modalidades, por ejemplo, modalidades descritas en la presente descripción en la que el primer fluido es un fluido acuoso, el polímero es un polímero hidrófilo. En algunas modalidades, por ejemplo, modalidades descritas en la presente descripción en la que el primer fluido es un

- 5 fluido no acuoso, por ejemplo, un aceite, el polímero es un polímero lipófilo. Las partículas de plantilla generalmente varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  de diámetro o la dimensión más grande. En algunas modalidades, las partículas de plantilla tienen un diámetro o dimensión más grande de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ , inclusive, tal como 1,0  $\mu\text{m}$  a 750  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 150  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ , o 1,0  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , inclusive. En algunas modalidades, las partículas de plantilla tienen un diámetro o la dimensión más grande de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 125  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .
- 10 En la práctica de los métodos descritos en la presente descripción, la composición y la naturaleza de las partículas de plantilla monodispersas pueden variar. Por ejemplo, en ciertos casos, las partículas de plantilla monodispersas pueden ser partículas de microgel que son esferas de la matriz de gel a escala de micras. En algunas modalidades, los microgeles se componen de un polímero hidrófilo que es soluble en agua, que incluye alginato o agarosa. En otras modalidades, los microgeles se componen de un microgel lipófilo.
- 15 En otros casos, las partículas de plantilla monodispersas pueden ser un hidrogel. En ciertas modalidades, el hidrogel se selecciona de materiales de origen natural, materiales de origen sintético y sus combinaciones. Ejemplos de hidrogeles incluyen, entre otros, colágeno, hialuronano, quitosano, fibrina, gelatina, alginato, agarosa, sulfato de condroitina, poliacrilamida, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliacrilamida / poli(ácido acrílico) (PAA), metacrilato de hidroxietilo (HEMA), poli N-isopropilacrilamida (NIPAM) y polianhidridos, fumarato de polipropileno (PPF).
- 20 En algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas tienen un volumen promedio, y un método descrito en la presente descripción incluye reducir el tamaño de las partículas de plantilla monodispersas para disminuir el volumen promedio. La contracción puede producirse tras la aplicación de un estímulo externo, por ejemplo, calor. Por ejemplo, las partículas de plantilla monodispersas pueden encapsularse en un fluido mediante cizallamiento, seguido de la aplicación de calor, lo que hace que las partículas de plantilla monodispersas se encojan en tamaño. La gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión doble o la GUV no se encogerá porque el volumen de la gotita es constante y dictado por el tamaño original de la partícula de plantilla monodispersa, pero la partícula de plantilla monodispersa dentro de la gotita se encogerá lejos de la superficie de la gotita.
- 25 En cualquier modalidad adecuada en la presente descripción, las partículas de plantilla monodispersas pueden incluir al menos una de células, genes, moléculas de fármacos, agentes terapéuticos, partículas, agentes bioactivos, agentes osteogénicos, agentes osteoconductores, agentes osteoinductores, agentes antiinflamatorios, factores de crecimiento, partículas polipeptídicas derivadas de fibroína, reactivos de síntesis de ácido nucleico, reactivos de detección de ácido nucleico, partículas objetivo, moléculas de ADN, moléculas de ARN, moléculas de ADN genómico, y combinaciones de estas. En las modalidades que implican la combinación de múltiples reactivos dentro de una gotita de emulsión doble monodispersa o una gotita de emulsión simple o GUV, las partículas de plantilla monodispersas pueden contener múltiples compartimientos. Las partículas de plantilla monodispersas pueden usarse para encapsular reactivos que pueden activarse para liberar un compuesto deseado, por ejemplo, un sustrato para una reacción enzimática. Por ejemplo, una gotita de emulsión doble se puede encapsular en las partículas de plantilla monodispersas que se activan para romperse tras la aplicación de un estímulo, por ejemplo, calor. El estímulo inicia una reacción después de que las partículas de plantilla monodispersas se han encapsulado en un fluido de fase portadora inmiscible.
- 30 35 40 45
- 50 Las partículas de plantilla monodispersas pueden generarse bajo control microfluídico, por ejemplo, mediante el uso de los métodos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2015/0232942. Los dispositivos microfluídicos pueden formar emulsiones que consisten de gotitas que son extremadamente uniformes en tamaño. El proceso de generación de partículas de plantilla monodispersas puede realizarse al bombear dos fluidos inmiscibles, tales como aceite y agua, en una unión. La forma de la unión, las propiedades del fluido (viscosidad, tensión interfacial, etc.) y los regímenes de flujo influyen en las propiedades de las partículas de plantilla monodispersas generadas, pero, para un rango de propiedades relativamente amplio, las partículas de plantilla monodispersas de tamaño uniforme controlado pueden generarse mediante el uso de métodos como las uniones T y el enfoque de flujo. Para variar el tamaño de partícula de plantilla monodispersa, los regímenes de flujo de los líquidos inmiscibles pueden variar ya que, para las metodologías de unión en T y enfoque de flujo en un cierto rango de propiedades, el tamaño de partículas de plantilla monodispersas depende del régimen de flujo total y la relación de los dos regímenes de flujo de los fluidos. Para generar una partícula de plantilla monodispersa con métodos microfluídicos, los dos fluidos se cargan normalmente en dos depósitos de entrada (por ejemplo, jeringas, tubos de presión) y luego se presurizan según sea necesario para generar los regímenes de flujo deseados (por ejemplo, mediante el uso de bombas de jeringa, reguladores de presión, gravedad, etc.). Esto bombea los fluidos a través del dispositivo a los regímenes de flujo deseados, generando así gotitas del tamaño y la velocidad deseados.
- 55 60 65
- En algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas pueden generarse mediante el uso de técnicas de generación de gotitas paralelas, que incluyen, entre otros, el uso de placas de distribución y división en serie. Las técnicas de generación de gotitas paralelas de interés incluyen, además, las descritas por Abate y Weitz, documento

Lab Chip, 7 de junio de 2011; 11(11):1911-5; y Huang y otros, documento RSC Advances 2017, 7, 14932-14938.

5 En algunas modalidades, se permite que las partículas de plantilla monodispersas se solidifiquen al activar un mecanismo de gelación, que incluye, entre otros, la polimerización o reticulación de una matriz de gel. Por ejemplo, los geles de poli(acrilamida) se forman por copolimerización de acrilamida y bis-acrilamida. La reacción es una polimerización de adición de vinilo iniciada por un sistema generador de radicales libres. En ciertos casos, los hidrogeles de agarosa se gelifican al enfriar los hidrogeles por debajo de la temperatura de gelificación.

10 En algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas se pueden eliminar del fluido, secar y almacenar en una forma estable durante un período de tiempo. Los ejemplos de enfoques de secado incluyen, entre otros, calentamiento, secado al vacío, liofilización y secado supercrítico. En algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas secas pueden combinarse con un fluido, pero aún conservan la forma y la estructura como partículas de gel independientes, a menudo esféricas. En algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas secas se combinan con un fluido apropiado, lo que hace que una porción del fluido se absorba por las partículas de plantilla monodispersas. En algunas modalidades, la porosidad de las partículas de plantilla monodispersas puede variar, para permitir que al menos una de una pluralidad de partículas objetivo se absorba en las partículas de plantilla monodispersas cuando se combina con el fluido apropiado. Puede usarse cualquier fluido conveniente que permita realizar la absorción deseada en las partículas de plantilla monodispersas.

20 Como se usa en la presente descripción, los términos "absorber", "hinchar" y "expandir" aplicados a las partículas de plantilla monodispersas pueden usarse indistintamente para referirse al proceso en el que un fluido permea una sustancia, o en el que una sustancia incorpora un fluido. En algunas modalidades, la sustancia que se absorbe puede retener al menos una porción de su forma y estructura. En algunas modalidades, la sustancia que se absorbe puede incorporarse en un fluido para formar una solución.

25 Se usa un surfactante para estabilizar las partículas de plantilla monodispersas. En consecuencia, una partícula de plantilla monodispersa implica una emulsión estabilizada por surfactante, por ejemplo, una emulsión simple estabilizada por surfactante o una emulsión doble estabilizada por surfactante.

30 Gotitas monodispersas, que incluyen gotitas de emulsión simple y gotitas de emulsión múltiple, y generación de estas

35 Como se usa en la presente descripción, el término "monodispersas", como se aplica a las gotitas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple monodispersas, se refiere a una variación en el diámetro de las gotitas producidas por cizallamiento en presencia de partículas de plantilla monodispersas, que es menor de lo que se produciría cuando las gotitas se producen por cizallamiento en las mismas condiciones en ausencia de las partículas de plantilla monodispersas. Generalmente, las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple pueden tener más variación en el diámetro o la dimensión más grande en comparación con las partículas de plantilla monodispersas a partir de las cuales se generan, mientras que aún funcionan en los diversos métodos descritos en la presente descripción. Las gotitas monodispersas varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen una variación en el diámetro de menos de un factor de 10, por ejemplo, menos de un factor de 5, menos de un factor de 4, menos de un factor de 3, menos de un factor de 2, menos de un factor de 1,5, menos de un factor de 1,4, menos de un factor de 1,3, menos de un factor de 1,2, menos de un factor de 1,1, menos de un factor de 1,05 o menos de un factor de 1,01, en diámetro o la dimensión más grande. En algunas modalidades, las gotitas monodispersas tienen una variación en el diámetro o la dimensión más grande de manera que al menos el 50 % o más, por ejemplo, el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, o el 99 % o más de las gotitas monodispersas, varían en el diámetro o la dimensión más grande en menos de un factor de 10, por ejemplo, menos de un factor de 5, menos de un factor de 4, menos de un factor de 3, menos de un factor de 2, menos de un factor de 1,5, menos de un factor de 1,4, menos de un factor de 1,3, menos de un factor de 1,2, menos de un factor de 1,1, menos de un factor de 1,05 o menos de un factor de 1,01. En algunas modalidades, las gotitas monodispersas tienen un diámetro de aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ , inclusive, tal como aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 750  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 1,0  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , inclusive. En algunas modalidades, el volumen interno de las gotitas monodispersas puede ser de aproximadamente 0,01 pl o menos, aproximadamente 0,1 pl o menos, 1 pl o menos, aproximadamente 5 pl o menos, 10 pl o menos, 100 pl o menos, o 1000 pl o menos. En algunas modalidades, el volumen interno de las gotitas monodispersas puede ser de aproximadamente 1 fl o menos, aproximadamente 10 fl o menos, o 100 fl o menos. En algunas modalidades, el volumen interno de las gotitas monodispersas puede abarcar un volumen líquido que varía entre picolitros y femtolitros (por ejemplo, aproximadamente 0,001 pl a aproximadamente 1000 pl). En algunas modalidades, el volumen interno de las gotitas monodispersas se extiende estrictamente por debajo del nivel de nanolitros (por ejemplo, estrictamente picolitros, estrictamente femtolitros o sus combinaciones).

65 En la práctica de los métodos descritos en la presente descripción, la composición y la naturaleza de las gotitas monodispersas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple y emulsión múltiple, pueden variar. Se usa un

surfactante para estabilizar las gotitas. En consecuencia, una gotita implica una emulsión estabilizada por surfactante, por ejemplo, una emulsión simple estabilizada por surfactante o una emulsión doble estabilizada por surfactante.

5 Las gotitas que se describen en la presente descripción se preparan como emulsiones, por ejemplo, como un fluido de fase acuosa disperso en un fluido portador de fase inmiscible. En particular, las gotitas de emulsión múltiple descritas en la presente descripción pueden proporcionarse como emulsiones dobles, por ejemplo, como un fluido de fase acuosa en un fluido de fase inmiscible, disperso en un fluido portador de fase acuosa; emulsiones cuádruples, por ejemplo, un fluido de fase acuosa en un fluido de fase inmiscible, en un fluido de fase acuosa, en un fluido de fase inmiscible, disperso en un fluido portador de fase acuosa; y así sucesivamente. La generación de una gotita de emulsión simple monodispersa o una gotita de emulsión múltiple descrita en la presente descripción puede realizarse sin control microfluídico. En modalidades alternativas, una emulsión simple monodispersa puede prepararse sin el uso de un dispositivo microfluídico, pero luego modificada mediante el uso de un dispositivo microfluídico para proporcionar una emulsión múltiple, por ejemplo, una emulsión doble.

15 Las emulsiones monodispersas simples se generan sin el uso de dispositivos microfluídicos mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. La producción de una emulsión monodispersa mediante el uso de partículas de plantilla monodispersas puede proporcionar emulsiones que incluyen gotitas que son extremadamente uniformes en tamaño. El proceso de generación de gotitas se puede lograr al combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el primer fluido incluye una pluralidad de partículas objetivo; combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido; y cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas y una de la pluralidad de partículas objetivo. Para variar el tamaño de las gotitas, se pueden variar la velocidad de cizallamiento y los tamaños de partículas de plantilla monodispersas. Para los geles de agarosa, las partículas de plantilla monodispersas se pueden licuar mediante el uso de un estímulo externo (por ejemplo, calor) para generar una emulsión monodispersa líquida.

30 El porcentaje de gotitas monodispersas, por ejemplo, gotitas de emulsión simple o gotitas de emulsión múltiple monodispersas, con una, y no más de una, partícula de plantilla monodispersa puede ser aproximadamente 70 % o más; aproximadamente 75 % o más; aproximadamente 80 % o más; aproximadamente 85 % o más; aproximadamente 90 % o más; o aproximadamente 95 % o más. Por ejemplo, el porcentaje de gotitas monodispersas con una, y no más de una, partícula de plantilla monodispersa puede ser de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 %, por ejemplo, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, o de aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 %. Como un ejemplo adicional, el porcentaje de gotitas monodispersas con una, y no más de una, partícula de plantilla monodispersa puede ser de aproximadamente 70 % a aproximadamente 95 %, por ejemplo, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 80 % a aproximadamente 85 %. El porcentaje de partículas de plantilla monodispersas que se encapsulan en gotitas monodispersas en el segundo fluido puede ser de aproximadamente 70 % o más; aproximadamente 75 % o más; aproximadamente 80 % o más; aproximadamente 85 % o más; o aproximadamente 90 % o más. Por ejemplo, el porcentaje de partículas de plantilla monodispersas que se encapsulan en gotitas monodispersas en el segundo fluido puede ser de aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 %, por ejemplo, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, o de aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 %. Como un ejemplo adicional, el porcentaje de partículas de plantilla monodispersas que se encapsulan en gotitas monodispersas en el segundo fluido puede ser de aproximadamente 70 % a aproximadamente 95 %, por ejemplo, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 80 % a aproximadamente 85 %.

55 Las emulsiones dobles también pueden generarse sin el uso de dispositivos microfluídicos mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción. Una emulsión doble incluye gotitas contenidas dentro de gotitas, por ejemplo, un fluido de fase acuosa rodeado por una cubierta de fase inmiscible en un fluido portador de fase acuosa (por ejemplo, agua en aceite en agua) o un fluido de fase inmiscible rodeado por una cubierta de fase acuosa en un fluido portador de fase inmiscible (por ejemplo, aceite en agua en aceite). La segunda mezcla descrita en la presente descripción, que incluye las gotitas de emulsión simple monodispersas en el segundo fluido, se combina con un tercer fluido para producir una tercera mezcla, en donde el tercer fluido es inmiscible con al menos el segundo fluido. La tercera mezcla se cizalla luego para encapsular las partículas de plantilla monodispersas en las gotitas de emulsión doble en el tercer fluido. El tercer fluido puede ser inmiscible tanto con el primer como con el segundo fluido. Un tipo particularmente útil de emulsión doble incluye una gotita acuosa encapsulada dentro de una gotita de aceite ligeramente mayor, que a su vez se dispersa en una fase acuosa portadora. Las emulsiones dobles son valiosas porque el "núcleo" interno de la estructura puede usarse para proporcionar compuestos activos, como solutos o materiales biológicos disueltos, donde se protegen del entorno externo por la cubierta de aceite circundante. Un beneficio de generar emulsiones dobles mediante el uso de partículas de plantilla monodispersas es

similar al de la generación de emulsiones simples, en que las dimensiones de la emulsión doble (tamaños de gotitas internas y externas) se pueden controlar en un amplio intervalo y las gotitas se pueden formar con un alto grado de uniformidad. Como se analiza en la presente descripción, en las modalidades adecuadas las partículas de plantilla monodispersas se pueden disolver y/o fundir dentro de las gotitas monodispersas. En consecuencia, en algunas modalidades pueden prepararse emulsiones múltiples, por ejemplo, emulsiones dobles, a partir de gotitas monodispersas que ya no contienen una partícula de plantilla intacta, pero conservan su tamaño original. De esta manera, tales gotitas monodispersas pueden servir como plantillas para la preparación de emulsiones múltiples, por ejemplo, emulsiones dobles.

La encapsulación en gotitas de materiales de muestra y/o reactivos, por ejemplo, ácidos nucleicos y/o reactivos de síntesis de ácido nucleico (por ejemplo, reactivos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos y/o reactivos de amplificación de ácido nucleico), se puede lograr a través de una serie de métodos, que incluyen métodos microfluídicos y no microfluídicos. En el contexto de los métodos microfluídicos (que no caen dentro del alcance de la invención), hay una serie de técnicas que se pueden aplicar, que incluyen la emulsificación doble en microcapilar de vidrio o la emulsificación doble mediante el uso de la generación secuencial de gotitas en dispositivos con patrones de humectabilidad. Las técnicas microcapilares forman gotitas al generar chorros coaxiales de las fases inmiscibles que se inducen a romperse en gotitas a través de un enfoque de flujo coaxial a través de una boquilla. Sin embargo, una posible desventaja de este enfoque es que los dispositivos se fabrican generalmente a partir de tubos microcapilares que se alinean y pegan entre sí. Dado que la boquilla de formación de gotas está en la escala de decenas de micras, incluso pequeñas inexactitudes en la alineación de los capilares pueden provocar una falla del dispositivo. Por el contrario, la formación de gotas secuencial en las uniones de generación de gotitas con patrones espaciales se puede lograr en dispositivos fabricados litográficamente, lo que los hace más simples de construir y crear en grandes cantidades al tiempo que se mantiene la uniformidad en las dimensiones. Sin embargo, en algunos casos, la naturaleza plana de estos dispositivos puede no ser ideal para generar emulsiones dobles, ya que las fases separadas entran todas en el dispositivo mientras están en contacto con las paredes del canal, lo que requiere que la humectabilidad se modele cuidadosamente para permitir la absorción de las fases apropiadas en las ubicaciones apropiadas. Esto puede dificultar la fabricación de los dispositivos y, en algunos casos, puede evitar la emulsificación de líquidos cuyas propiedades de humectación no se optimizan para el dispositivo. En consecuencia, la presente descripción proporciona métodos para generar una emulsión monodispersa que encapsula materiales de muestra y/o reactivos, por ejemplo, ácidos nucleicos y/o reactivos de síntesis de ácido nucleico (por ejemplo, reactivos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos y/o reactivos de amplificación de ácido nucleico) sin el uso de un dispositivo microfluídico.

Los métodos descritos en la presente descripción incluyen combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el primer fluido incluye una pluralidad de partículas objetivo, por ejemplo, ácidos nucleicos, etc. En algunas modalidades, la combinación de la pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con el primer fluido para proporcionar la primera mezcla incluye hacer que una porción del primer fluido, y las partículas objetivo y/o los reactivos contenidos en el mismo, se absorban por las partículas de plantilla monodispersas. En algunas modalidades, combinar la pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con el primer fluido para proporcionar la primera mezcla incluye hacer fluir una porción del primer fluido en las partículas de plantilla monodispersas. En algunas modalidades, combinar la pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con el primer fluido para proporcionar la primera mezcla incluye difundir una porción del primer fluido en las partículas de plantilla monodispersas. En algunas modalidades, la combinación de la pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con el primer fluido para proporcionar la primera mezcla incluye hinchar las partículas de plantilla monodispersas con una porción del primer fluido.

En algunas modalidades, el exceso de primer fluido se elimina de la primera mezcla después de hacer que la porción del primer fluido se absorba por las partículas de plantilla monodispersas. La cantidad de exceso de primer fluido que se elimina puede variar. Por ejemplo, al eliminar la mayor parte del exceso de fluido, las partículas objetivo que no pueden fluir hacia las partículas de plantilla monodispersas se pueden encapsular al hacer que las partículas objetivo, por ejemplo, las células, estén físicamente cerca de al menos una de una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas. La combinación de esta mezcla con un segundo fluido que es inmiscible con el primer fluido proporciona una segunda mezcla. Al cizallar esta segunda mezcla, una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas pueden encapsularse en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas y una de la pluralidad de partículas objetivo que no pueden fluir hacia las partículas de plantilla monodispersas.

En algunas modalidades, las moléculas objetivo son células. En tales modalidades, las gotitas monodispersas pueden contener una o más células por gotita. Alternativamente, las gotitas monodispersas no contienen más de una célula por gotita. En algunas modalidades, después del cizallamiento, algunas gotitas en la emulsión no contienen ninguna de la pluralidad de partículas objetivo.

Los métodos descritos en la presente descripción incluyen combinar la primera mezcla, que incluye una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas y un primer fluido que incluye una pluralidad de partículas objetivo, con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido;

y cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas y una de la pluralidad de partículas objetivo. En algunas modalidades, después del cizallamiento, el segundo fluido incluye una pluralidad de gotitas que no contienen una de las partículas de plantilla monodispersas. Las gotitas que no contienen una de las partículas de plantilla monodispersas pueden eliminarse de la emulsión monodispersa mediante una técnica de separación adecuada, tal como filtración o centrifugación. Aquellas gotitas que no contienen una de las partículas de plantilla monodispersas pueden ser más pequeñas en diámetro que aquellas gotitas que sí contienen una de las partículas de plantilla monodispersas. Las gotitas monodispersas que contienen partículas de plantilla monodispersas también pueden enriquecerse con relación a las gotitas que no contienen una de las partículas de plantilla monodispersas.

Como se usa en la presente descripción, los términos "enriquecida" y "enriquecimiento" pueden usarse indistintamente para referirse al proceso de aumentar la relación de entidades objetivo (por ejemplo, gotitas monodispersas que contienen partículas de plantilla monodispersas) a entidades no objetivo (por ejemplo, gotitas monodispersas que no contienen partículas de plantilla monodispersas) en la emulsión monodispersa en comparación con la relación en la emulsión monodispersa original. Mediante el uso del método descrito en la presente descripción, las gotitas monodispersas que contienen partículas de plantilla monodispersas pueden enriquecerse con relación a las gotitas que no contienen una de las partículas de plantilla monodispersas, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o más.

En algunas modalidades, el exceso de segundo fluido se elimina de la segunda mezcla que incluye una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas encapsuladas en una pluralidad de gotitas monodispersas después del cizallamiento. El exceso de segundo fluido se puede eliminar mediante el uso de cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante centrifugación y eliminación del sobrenadante.

En el contexto de emulsiones múltiples, por ejemplo, emulsiones dobles, generadas como se describe en la presente descripción, se pueden realizar manipulaciones adicionales en ellas para modificar sus propiedades. Por ejemplo, en muchas formulaciones de emulsión doble, las cubiertas de las emulsiones dobles son permeables a ciertas moléculas, lo que permite que estas moléculas se difundan pasivamente dentro o fuera de las emulsiones dobles. Esto puede usarse, por ejemplo, para modular el entorno en las emulsiones dobles. De manera similar, las gotitas internas de las emulsiones dobles pueden encogerse o crecer, por ejemplo, al permitir que un solvente se difunda dentro o fuera de ellas. Por ejemplo, al dispersar las emulsiones dobles en un tampón que incluye una alta concentración de sal, se puede inducir que el fluido de fase acuosa se difunda fuera de las emulsiones dobles hasta que se igualen las osmolalidades en la gotita interna y en la fase portadora externa, momento en el cual el tamaño de la gotita permanecerá constante. Esto puede usarse para cambiar el tamaño de la gotita interna o, alternativamente, para concentrar o diluir los reactivos contenidos dentro de la emulsión doble al añadir o eliminar el exceso de solvente.

Las cubiertas de las emulsiones dobles también se pueden modificar mediante el uso de técnicas tales como la extracción con solvente para, por ejemplo, en el caso de una emulsión doble de agua en aceite en agua, eliminar el exceso de fase hidrófoba de la cubierta. Esto puede inducir otros cambios en las emulsiones dobles tales como, por ejemplo, su transición en vesículas lipídicas, polimerosomas o coloidosomas a través de la deshumectación u otros fenómenos. Las burbujas de aire también pueden introducirse en las emulsiones dobles, por ejemplo, en la gotita interna o en la fase intermedia de encapsulación. La capacidad de expandir y comprimir aire también puede explotarse, si se desea, para, por ejemplo, aumentar o reducir el tamaño de la emulsión doble o el grosor de la cubierta de la emulsión doble, en algunas modalidades. Las burbujas de aire en la fase media pueden, por ejemplo, expandirse al reducir la presión del sistema, que ejercerá fuerzas sobre la gotita interna que, por ejemplo, puede usarse para inducir una transición a otra estructura, tal como un polimerosoma o vesícula. También se pueden añadir agentes gelificantes para permitir que las capas exteriores de las gotitas se solidifiquen. Los ejemplos de agentes gelificantes incluyen, entre otros, gelatina, agar, goma xantana, goma gellan, carragenano, isubgol y goma guar.

#### 55 Vesículas unilamelares gigantes (GUV)

Las emulsiones dobles generalmente se refieren a emulsiones dentro de emulsiones, es decir, gotitas de líquido que están contenidas dentro de gotitas de líquido de una segunda fase inmiscible. Pueden estabilizarse mediante un surfactante pero, de manera importante, la "cubierta" de la fase intermedia incluye una fase líquida además del surfactante opcional. A medida que se reduce el volumen de la cubierta, las emulsiones dobles se asemejan menos a gotitas dentro de gotitas que a estructuras similares a vesículas, con un fluido núcleo encapsulado en una fina membrana de moléculas surfactantes. Las emulsiones dobles pueden usarse para formar tales "vesículas" al permitirles someterse a una transición de deshumectación, en la que el fluido de la fase líquida media se expulsa de la cubierta pero se mantiene una capa de surfactante, que genera una vesícula que incluye el núcleo acuoso con una capa fina de moléculas de surfactante que lo rodea, y una pequeña gotita de aceite que originalmente era la cubierta que se adhiere a ella. Tales vesículas se denominan, además, en la presente descripción como liposomas.

La tendencia de una emulsión doble a deshumectarse depende de las propiedades de las diferentes soluciones y surfactantes, especialmente las tensiones interfaciales de las diferentes fases entre sí. Una formulación acuosa que incluye aceite fluorado, surfactante PEG-Krytox<sup>®</sup>, surfactante Jeffamine<sup>®</sup>(polieteramina)-Krytox<sup>®</sup> y plurónico, cuando se añade a la fase portadora, parece capaz de formar emulsiones dobles y vesículas, ambas termostables por encima de 95 °C. Los fluidos Krytox<sup>®</sup> son aceites sintéticos fluorados en base a óxido de hexafluoropropileno combinado con un grupo funcional final. Otros surfactantes tales como Tween<sup>®</sup> 20 (Polisorbato 20) y Span<sup>®</sup> 80 (monooleato de sorbitano) puede utilizarse con o sin agentes espesantes tales como PEG, alginato, glicerol, etc., para inducir la formación de GUV a partir de emulsiones dobles.

#### 10 Fluidos implicados en la generación de emulsiones monodispersas

Como se analiza en la presente descripción, los métodos descritos implican combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el primer fluido incluye una pluralidad de partículas objetivo; combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmiscible con el primer fluido; y cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que incluyen el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas, y una de la pluralidad de partículas objetivo. En algunas modalidades, los métodos incluyen la etapa adicional de combinar un tercer fluido con la segunda mezcla, después del cizallamiento de la segunda mezcla, para producir una tercera mezcla, en donde el tercer fluido es inmiscible con el segundo fluido.

El primer fluido se selecciona generalmente para ser inmiscible con el segundo fluido y compartir una hidrofiliidad/hidrofobicidad común con el material que constituye las partículas de plantilla monodispersas. El tercer fluido generalmente se selecciona para que sea inmiscible con el segundo fluido, y puede ser miscible o inmiscible con el primer fluido.

Como se analiza en la presente descripción, en algunas modalidades, el primer fluido contiene una pluralidad de partículas objetivo (por ejemplo, moléculas de ADN tales como moléculas de ADN genómico, moléculas de ARN, reactivos de síntesis de ácido nucleico tales como reactivos de amplificación de ácido nucleico que incluyen PCR y/o reactivos de amplificación isotérmica).

En algunas modalidades, se pueden añadir agentes gelificantes para solidificar las capas exteriores de la gotita.

#### 35 Surfactantes

Un surfactante se incluye en el primer fluido y el segundo fluido y puede incluirse en el tercer fluido. En consecuencia, una gotita implica una emulsión estabilizada por surfactante, por ejemplo, una emulsión simple estabilizada por surfactante o una emulsión doble estabilizada por surfactante, donde el surfactante es soluble en el primer fluido, el segundo fluido y/o el tercer fluido.

El surfactante usado depende de una serie de factores tales como las fases oleosa y acuosa (u otras fases inmiscibles adecuadas, por ejemplo, cualquier fase adecuada hidrófoba e hidrófila) usadas para las emulsiones. Cuando se usan gotitas acuosas en un aceite de fluorocarbono, el surfactante puede tener un bloque hidrófilo (PEG-PPO) y un bloque fluorado hidrófobo (Krytox<sup>®</sup> FSH).

Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, se propone que la preparación de emulsiones termostables se basa en el uso de un surfactante que es capaz de formar membranas o interfaces de emulsión doble que pueden soportar altas temperaturas, tales como las asociadas con las reacciones de PCR estándar. Una forma de lograr esto puede ser usar un surfactante con un peso molecular relativamente alto de manera que cuando se ensambla en la interfaz de una gotita o en una configuración de membrana, la energía requerida para eliminar el surfactante de la interfaz (o romper la membrana) es mayor de la que puede proporcionarse por kT.

En consecuencia, en algunas modalidades, la presente descripción proporciona emulsiones termostables. Estas emulsiones son adecuadas para su uso en la modalidad de reacciones biológicas, tales como PCR, RT-PCR, estudios de interacción proteína-proteína, etc.

Una consideración al formar emulsiones, particularmente las emulsiones dobles, es hacerlas estables para que permanezcan como emulsiones dobles y no se rompan o se fusionen. Esto a menudo se logra mediante el uso de agentes estabilizantes, tales como surfactantes. Sin embargo, en algunos casos, puede ser ventajoso crear emulsiones dobles extremadamente estables. En los métodos descritos en la presente descripción, esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de una fase media (fase envolvente) que se puede reticular, tal como una fase de gel de polímero como el polidimetilsiloxano. Alternativamente, los surfactantes mismos pueden hacer que se reticulen entre sí, por ejemplo, creando un grupo de reticulación. Este grupo puede existir en la cola hidrófoba del surfactante o, alternativamente, en la cabeza hidrófila. Puede reticular los surfactantes entre sí o, alternativamente, la reticulación puede inducirse mediante la adición de un reactivo de la fase acuosa, tal como una molécula que

induce la polimerización, enlace de enlace covalente, etc. Las biomoléculas como los anticuerpos o la biotina-estreptavidina también se pueden usar para generar reticulaciones surfactante-surfactante.

La reticulación de la interfaz es otra forma de hacer que la cubierta de la emulsión doble sea termostable. Por ejemplo, tal reticulación puede lograrse reticulando la fase oleosa o mediante reticulación de la vesícula de membrana. Como se analizó anteriormente, un método para la reticulación de la interfaz usa biomoléculas, tales como estreptavidina. Por ejemplo, el grupo cabeza de un polímero Krytox® puede biotinilarse con múltiples biotinas. Luego se añade estreptavidina a la fase acuosa, reticulando, de esta manera, diferentes polímeros Krytox® juntos y generando una cubierta reticulada en la interfaz agua/aceite. Estas cubiertas pueden dispersarse en agua directamente o, si se desea, encapsularse como emulsiones dobles.

#### Cizallamiento

Para generar una emulsión monodispersa, los métodos descritos incluyen una etapa de cizallamiento de la segunda mezcla proporcionada al combinar la primera mezcla con un segundo fluido inmiscible con el primer fluido. La aplicación de una fuerza de cizallamiento suficiente rompe la segunda mezcla en gotitas monodispersas que encapsulan una de una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas. También puede haber algunas gotitas que no contienen una de la pluralidad de partículas de plantilla monodispersas.

Cuando partículas de plantilla de PAA, PEG o agarosa monodispersas se utilizan con tritón o IGEPAL en la fase acuosa y el aceite fluorado HFE-7500 como la fase no acuosa, la agitación vorticial durante 30 segundos da como resultado suficiente fuerza de cizallamiento para generar gotitas monodispersas.

#### Adición de reactivos a gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

En la práctica de los métodos de la presente invención, puede ser necesario añadir un número de reactivos a las gotitas, en uno o más etapas (por ejemplo, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5 o más etapas). Los medios para añadir reactivo a las gotitas pueden variar de diversas maneras en función, por ejemplo, de la etapa de emulsificación de las gotitas, por ejemplo, diferentes enfoques pueden ser aplicables a la adición de reactivos a las gotitas de emulsión simple monodispersas con relación a las gotitas de emulsión múltiple, tales como las gotitas de emulsión doble. Los enfoques de interés incluyen, entre otros, los descritos por Ahn y otros, documento Appl. Phys. Lett. 88, 264105 (2006); Priest y otros, documento Appl. Phys. Lett. 89, 134101 (2006); Abate y otros, documento PNAS, 9 de noviembre de 2010, vol. 107, Núm. 45, 19163-19166; y Song y otros, documento Anal. Chem., 2006, 78 (14), págs. 4839-4849. En algunas modalidades, se pueden añadir reactivos a las gotitas durante el proceso de emulsificación descrito en la presente descripción, por ejemplo, como componentes del primer fluido, por ejemplo, sin el uso de un dispositivo o sistema microfluídico. En otras modalidades, pueden utilizarse técnicas, dispositivos y/o sistemas microfluídicos para añadir reactivos y/o modificar las gotitas monodispersas una vez preparadas como se describe de cualquier otra manera en la presente descripción.

Por ejemplo, se puede añadir un reactivo a una gotita de emulsión simple monodispersa descrita en la presente descripción mediante un método que implica fusionar una gotita con una segunda gotita que contiene el (los) reactivo(s). El (los) reactivo(s) contenido(s) en la segunda gotita puede(n) añadirse por cualquier medio conveniente, que incluye específicamente los descritos en la presente descripción. Esta gotita puede fusionarse con la primera gotita para crear una gotita que incluye el contenido tanto de la primera gotita como de la segunda gotita. En algunas modalidades, la primera gotita es sustancialmente más grande que la segunda gotita y supera a la segunda gotita.

Pueden añadirse además o en su lugar, uno o más reactivos a las gotitas de emulsión simple monodispersas descritas en la presente descripción mediante el uso de técnicas tales como la coalescencia de gotitas y/o la picoinyección. En la coalescencia de gotitas, una gotita objetivo puede fluir junto a una gotita que contiene el (los) reactivo(s) que se añadirán a la gotita objetivo. Las dos gotitas pueden fluir de manera que estén en contacto entre sí, pero sin tocar otras gotitas. Estas gotitas pueden luego pasarse a través de electrodos u otros medios para aplicar un campo eléctrico, en donde el campo eléctrico puede desestabilizar las gotitas de manera que se fusionen entre sí.

En la picoinyección, una gotita objetivo puede fluir más allá de un canal que contiene el (los) reactivo(s) a añadir, en donde el (los) reactivo(s) están a una presión elevada. Debido a la presencia de los surfactantes, sin embargo, en ausencia de un campo eléctrico, la gotita fluiría sin ser inyectada, porque los surfactantes que recubren la gotita pueden evitar que el (los) fluido(s) entre(n). Sin embargo, si se aplica un campo eléctrico a la gotita a medida que pasa por el inyector, el fluido que contiene el (los) reactivo(s) se inyectará en la gotita. La cantidad de reactivo añadido a la gotita se puede controlar mediante varios parámetros diferentes, como al ajustar la presión de inyección y la velocidad de las gotas que fluyen, al encender y apagar el campo eléctrico, y similares.

Pueden añadirse además o en su lugar, uno o más reactivos a una gotita de emulsión simple monodispersa descrita en la presente descripción mediante un método que no se basa en la fusión de dos gotitas juntas o en la inyección de líquido en una gotita. Más bien, se pueden añadir uno o más reactivos a una gotita mediante un método que

implica las etapas de emulsionar un reactivo en una corriente de gotitas muy pequeñas y fusionar estas gotas pequeñas con una gotita objetivo. Dichos métodos se denominan en la presente descripción "adición de reactivo mediante la coalescencia de múltiples gotas". Estos métodos toman ventaja del hecho de que debido al pequeño tamaño de las gotas a añadir en comparación con el de la gotita objetivo, las gotas pequeñas fluirán más rápido que las gotitas objetivo y se recogerán detrás de ellas. La colección se puede fusionar, por ejemplo, aplicando un campo eléctrico. Este enfoque también puede, o en su lugar, usarse para añadir múltiples reactivos a una gotita mediante el uso de varias corrientes de flujo conjunto de gotas pequeñas de diferentes fluidos. Para permitir la fusión efectiva de las gotitas objetivo y diminutas, es importante hacer que las gotas diminutas sean más pequeñas que el canal que contiene las gotitas objetivo, y también hacer que la distancia entre el canal que inyecta las gotitas objetivo desde los electrodos que aplican el campo eléctrico sea suficientemente larga para dar a las gotas diminutas tiempo para "alcanzar" a las gotitas objetivo. Si este canal es demasiado corto, no todas las gotas diminutas se fusionarán con la gotita objetivo y puede que se añada menos de la cantidad deseada de reactivo. En cierto grado, esto puede compensarse al aumentar la magnitud del campo eléctrico, lo que tiende a permitir que se fusionen las gotas que están más separadas. Además de hacer las gotas diminutas en el mismo dispositivo microfluídico, también pueden, o en su lugar, hacerse fuera de la línea mediante el uso de otro generador de gotas microfluídico o a través de la homogeneización y posterior inyección en el dispositivo que contiene las gotitas objetivo.

En consecuencia, en ciertos casos se añade un reactivo a una gotita preparada como se describe en la presente descripción mediante un método que implica emulsionar el reactivo en una corriente de gotitas, en donde las gotitas son más pequeñas que el tamaño de las gotitas objetivo (por ejemplo, gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple o GUV); hacer fluir las gotitas junto con las gotitas objetivo; y fusionar una gotita con la gotita objetivo. El diámetro de las gotitas contenidas en la corriente de gotitas puede variar de aproximadamente el 75 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, por ejemplo, el diámetro de las gotitas que fluyen es aproximadamente el 75 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, aproximadamente el 50 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, aproximadamente el 25 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, aproximadamente el 15 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, aproximadamente el 10 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, aproximadamente el 5 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo, o aproximadamente el 2 % o menos que el diámetro de la gotita objetivo. En ciertos casos, una pluralidad de gotitas que fluyen puede fusionarse con la gotita objetivo, tal como 2 o más gotitas, 3 o más, 4 o más, o 5 o más. Tal fusión puede lograrse por cualquier medio conveniente, que incluye, entre otros, aplicar un campo eléctrico, en donde el campo eléctrico es efectivo para fusionar la gotita que fluye con la gotita objetivo.

Como una variación de los métodos descritos anteriormente, los fluidos pueden ser inyectados. Es decir, en lugar de emulsionar el fluido que se añadirá en gotitas en movimiento, se puede formar y fluir un chorro largo de este fluido junto a la gotita objetivo. Estos dos fluidos se pueden fusionar, por ejemplo, aplicando un campo eléctrico. El resultado es un chorro con protuberancias donde están las gotitas, que pueden romperse naturalmente en gotitas de aproximadamente el tamaño de las gotitas objetivo antes de la fusión, debido a la inestabilidad de la meseta de Rayleigh. Se contemplan varias variantes. Por ejemplo, se pueden añadir uno o más agentes al fluido de inyección para facilitar la inyección, tales como agentes gelificantes y/o surfactantes. Además, la viscosidad del fluido continuo también podría ajustarse para permitir la inyección, tal como se describe por Utada y otros, documento Phys. Rev. Lett. 99, 094502 (2007).

En otros casos, pueden añadirse uno o más reactivos mediante el uso de un método que usa el propio fluido de inyección como un electrodo, al explotar los electrolitos disueltos en solución.

En otro caso, se añade un reactivo a una gotita formada en un momento anterior al envolver la gotita a la que se va a añadir el reactivo (es decir, la "gotita objetivo") dentro de una gota que contiene el reactivo a añadir (el "reactivo objetivo"). En ciertas modalidades, tal método se lleva a cabo encapsulando primero la gotita objetivo en una cubierta de una fase hidrófoba adecuada, por ejemplo, aceite, para formar una emulsión doble. La emulsión doble se encapsula entonces mediante una gotita que contiene el reactivo objetivo para formar una emulsión triple. Para combinar la gota objetivo con la gota que contiene el reactivo objetivo, la emulsión doble se hace estallar mediante el uso de cualquier método adecuado, que incluye, entre otros, la aplicación de un campo eléctrico, la adición de productos químicos que desestabilizan la interfaz de la gotita, el flujo de la emulsión triple a través de constricciones y otras geometrías microfluídicas, la aplicación de cizallamiento o ultrasonido, el aumento o la reducción de la temperatura, o mediante la encapsulación de partículas magnéticas en la gotita que puede romper la interfaz de la emulsión doble cuando se tira de un campo magnético.

Casos de los métodos descritos anteriormente para añadir reactivos a las gotitas se describen con más detalle en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2015/0232942

Si bien los métodos anteriores para añadir reactivos a las gotitas pueden ser adecuados para la adición de reactivos a las gotitas de emulsión simple monodispersas, uno o más de los métodos anteriores pueden no ser adecuados para la adición de reactivos directamente a las gotitas de emulsión múltiple, tales como las gotitas de emulsión doble y/o GUV. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando tales métodos interrumpen la estructura de las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Los métodos anteriores pueden encontrar uso, sin embargo, al añadir reactivos a las gotitas de emulsión simple monodispersas que luego se encapsulan para formar gotitas de emulsión múltiple y/o

GUV. En consecuencia, se describen más abajo métodos adicionales para añadir reactivos a las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Por ejemplo, en algunas modalidades, los reactivos, tales como las etiquetas detectables diseñadas para etiquetar de manera detectable un producto de amplificación de ácido nucleico y/o los reactivos de síntesis de ácido nucleico diseñados para producir un producto de síntesis de ácido nucleico, pueden añadirse a una gotita de emulsión múltiple y/o GUV al añadir los reactivos a un fluido portador de fase miscible, en donde los reactivos se difunden desde el fluido portador de fase miscible, a través de la cubierta inmisible de la gotita de emulsión múltiple y/o GUV, y en el primer fluido de fase miscible de la gotita de emulsión múltiple y/o GUV.

En algunas modalidades, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV es una segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV y un método para añadir reactivos de síntesis de ácido nucleico a la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV incluye encapsular un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico objetivo, en una primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV, encapsular los reactivos de síntesis y la primera gotita de emulsión múltiple en la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV, y romper la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV, de esta manera, poner en contacto el ácido nucleico con los reactivos de síntesis.

En algunas modalidades, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV es una segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV y un método para añadir reactivos de síntesis de ácido nucleico a la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV incluye encapsular reactivos de síntesis de ácido nucleico en una primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV, encapsular un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico objetivo, y la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV en la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV, y romper la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV y, de esta manera, poner en contacto el ácido nucleico con los reactivos de síntesis.

En algunas modalidades, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV es una primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV, y un método adecuado incluye añadir un reactivo a la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV mediante la encapsulación de la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV en una segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV que incluye el reactivo y romper la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV dentro de la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV para poner en contacto el reactivo con el contenido de la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV.

En algunas modalidades, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV es una segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV, y un método adecuado incluye añadir un reactivo a la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV mediante la encapsulación de una primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV que incluye los reactivos en la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV y romper la primera gotita de emulsión múltiple y/o GUV dentro de la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV para poner en contacto el reactivo con el contenido de la segunda gotita de emulsión múltiple y/o GUV.

#### Restos de enlace

En algunas modalidades, las partículas objetivo, por ejemplo, las moléculas objetivo de ácido nucleico; los reactivos de síntesis de ácido nucleico; y/o los reactivos de detección de ácido nucleico se unen a las partículas de plantilla monodispersas a través de uno o más restos de enlace posicionados sobre o en las partículas de plantilla monodispersas. Los restos de enlace pueden interactuar con las partículas objetivo a enlazar. Por ejemplo, los restos de enlace pueden ser oligonucleótidos con secuencias específicas que se unen sobre o en las partículas de plantilla monodispersas. Los oligonucleótidos específicos pueden hibridarse con las partículas objetivo en los fluidos, por ejemplo, a través del emparejamiento de bases y la reticulación.

En algunas modalidades, ciertas partículas objetivo pueden ser demasiado grandes en tamaño para moverse a través de las partículas de plantilla monodispersas que contienen grupos funcionales para capturar las partículas objetivo. En tales casos, los restos de enlace pueden ser perlas funcionales que se encapsulan en las partículas de plantilla monodispersas. Por ejemplo, a medida que las partículas objetivo se difunden a través de las partículas de plantilla monodispersas, entrarán en contacto con las perlas funcionales, lo que proporciona una oportunidad de capturarlas. Incluso si las partículas de plantilla monodispersas se absorbieron en un fluido portador miscible, las partículas objetivo permanecerían unidas porque estarían unidas a las perlas atrapadas en o sobre las partículas de plantilla monodispersas.

#### Reacciones en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

Los métodos descritos en la presente descripción generalmente facilitan el rendimiento de un gran número de reacciones compartimentadas y la lectura y clasificación subsecuente de esas reacciones mediante el uso de una variedad de métodos de detección, tales como espectroscopía, técnicas químicas, técnicas biológicas, secuenciación, etc. Las reacciones pueden incluir reacciones orgánicas o inorgánicas que se realizan sin biomoléculas, o reacciones que implican biomoléculas y/o células, tales como reacciones enzimáticas, por ejemplo, PCR. Las reacciones también pueden implicar materiales celulares o extractos a base de células, que incluyen extractos de transcripción y traducción que pueden expresar ADN, ARN y proteínas sin el uso de células vivas. Esto puede usarse para aplicaciones biológicas sintéticas, que incluyen, por ejemplo, el cribado de una vía para determinar la actividad.

Por ejemplo, una vía implementada por una o más proteínas puede codificarse por ácidos nucleicos encapsulados en gotitas de emulsión simple o gotitas de emulsión múltiple monodispersas, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV con extractos libres de células capaces de expresar la una o más proteínas de la vía. También se pueden incluir componentes del ensayo, lo que permite la prueba de la vía. En base a la actividad de la vía y las mediciones del ensayo, los reactores se pueden clasificar para recuperar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que se encapsulan en las vías particularmente convenientes. Después de la clasificación, pueden analizarse, amplificarse, etc., para continuar el proceso, ya sea para realizar cribados o, alternativamente, para realizar la evolución dirigida y generar secuencias de vías mejoradas.

Las reacciones en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV también pueden usarse para aplicaciones, tales como manipulaciones de ácidos nucleicos, que incluyen la generación de bibliotecas de secuenciación con menos sesgo o para combinar moléculas con características específicas. Por ejemplo, las células que expresan secuencias génicas específicas o productos de síntesis y/o amplificación de ácido nucleico se pueden encapsular en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV y luego someterse a los métodos descritos en la presente descripción para aislar, amplificar y enlazar las secuencias, generando una única molécula que se puede analizar o usar en aplicaciones adicionales. Por ejemplo, si las células incluyen células generadoras de anticuerpos humanos, entonces los genes correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de las células se pueden enlazar para crear una sola molécula que se puede analizar para detectar el emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras o para generar una molécula similar a un anticuerpo, tal como un scFv o Fab.

#### Detección de productos de PCR

En la práctica de los métodos de la presente invención, la manera en la que se pueden detectar los productos de síntesis y/o amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, los productos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos o los productos de PCR, puede variar. Por ejemplo, si el objetivo es simplemente contar el número de un tipo de célula en particular, por ejemplo, células tumorales, presentes en una población, esto puede lograrse mediante el uso de un simple ensayo binario en el que se añade SybrGreen, o cualquier otra tinción y/o tinción de intercalación, a cada gotita de emulsión simple monodispersa, gotita de emulsión múltiple y/o GUV de modo que en el caso de que un gen de caracterización, por ejemplo, un oncogén, esté presente y se produzcan los productos de PCR, la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV se volverán fluorescentes. El cambio en la fluorescencia puede deberse a la polarización de fluorescencia. El componente de detección puede incluir el uso de una tinción de intercalación (por ejemplo, SybrGreen).

Pueden usarse una variedad de diferentes componentes de detección en la práctica de los métodos de la presente invención, que incluye el uso de colorantes fluorescentes conocidos en la técnica. Los colorantes fluorescentes pueden dividirse típicamente en familias, tales como la fluoresceína y sus derivados; la rodamina y sus derivados; la cianina y sus derivados; la cumarina y sus derivados; el Cascade Blue y sus derivados; el Lucifer Yellow y sus derivados; el BODIPY y sus derivados; y similares. Los fluoróforos ilustrativos incluyen indocarbocianina (C3), indodicarbocianina (C5), Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Texas Red, Pacific Blue, Oregon Green 488, Alexa fluor-355, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor-555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, JOE, Lissamina, Rodamina Verde, BODIPY, isotiocianato de fluoresceína (FITC), carboxi-fluoresceína (FAM), ficoeritrina, rodamina, diclororodamina (dRodamina), carboxi tetrametilrodamina (TAMRA), carboxi-X-rodamina (ROX), LIZ, VIC, NED, PET, SYBR, PicoGreen, RiboGreen y similares. Las descripciones de los fluoróforos y su uso, se pueden encontrar, entre otros lugares, en los documentos de R. Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9na ed. (2002), Molecular Probes, Eugene, Oreg.; M. Schena, Microarray Analysis (2003), John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.; Synthetic Medicinal Chemistry 2003/2004 Catalog, Berry and Associates, Ann Arbor, Mich.; G. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996)); y Glen Research 2002 Catalog, Sterling, VA.

En otros casos, particularmente si el objetivo es caracterizar más a fondo los ácidos nucleicos presentes, por ejemplo, oncogenes, puede ser necesario realizar pruebas adicionales. Por ejemplo, en el caso de los ensayos multiplexados, esto se puede lograr al tener salidas ópticas que se relacionan con cuál de los genes se amplifica en la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV. Un enfoque alternativo sería usar una salida binaria, por ejemplo, con una mancha intercalada, para determinar cuáles gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV tienen algún oncogén. Estos pueden luego clasificarse para recuperar estas gotitas y/o GUV de manera que puedan analizarse con mayor detalle para determinar qué oncogenes contienen. Para determinar los oncogenes presentes en dicha gotita y/o GUV, se podrían usar técnicas microfluídicas o técnicas no microfluídicas. Mediante el uso de técnicas no microfluídicas, una gotita y/o GUV identificada como que contiene un oncogén se puede colocar en un pocillo en una placa de pocillos donde se diluye en un volumen mayor, liberando todos los productos de PCR que se crearon durante la reacción de PCR multiplexada. Las muestras de este pocillo se pueden transferir a otros pocillos, en cada uno de los cuales se añadirían cebadores para uno de los oncogenes. Estos pocillos luego se ciclarían en temperatura para iniciar la PCR, en cuyo punto se añadiría una tinción de intercalación para hacer que los pocillos que tienen oncogenes coincidentes y cebadores se iluminen.

En la práctica de los métodos de la presente invención, por lo tanto, puede detectarse un componente en base a, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia. En ciertos casos, el cambio en la fluorescencia se debe a la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). En este enfoque, puede usarse un conjunto especial de cebadores en el que el cebador 5' tiene un colorante inactivador y el cebador 3' tiene un colorante fluorescente. Estos colorantes se pueden disponer en cualquier lugar de los cebadores, ya sea en los extremos o en los medios. Debido a que los cebadores son complementarios, existirán como híbridos en solución, de modo que la emisión del colorante fluorescente será inactivada por el colorante inactivador, ya que estarán en estrecha proximidad entre sí, lo que hace que la solución parezca oscura. Después de la PCR, estos cebadores se incorporarán a los productos de PCR largos y, por lo tanto, estarán muy separados entre sí. Esto permitirá que el colorante fluorescente emita luz, lo que hace que la solución se vuelva fluorescente. Por lo tanto, para detectar si un oncogén particular está presente, se puede medir la intensidad de la gotita y/o GUV en la longitud de onda del colorante fluorescente. Para detectar si están presentes diferentes oncogenes, esto se haría con diferentes colorantes para los diferentes cebadores. Esto haría que la gotita y/o GUV se vuelva fluorescente en todas las longitudes de onda correspondientes a los cebadores de los oncogenes presentes en la célula.

Detección de células (por ejemplo, células tumorales) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

Los casos de los métodos de la presente invención implican detectar la presencia de una o más células o subconjuntos de células (por ejemplo, células tumorales) en una muestra biológica. Tales métodos pueden incluir, por ejemplo, las etapas de encapsular una célula en una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV; someter la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV a condiciones suficientes para provocar la lisis de la célula en la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV; someter la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV a condiciones suficientes para desactivar o eliminar uno o más materiales que tienen un efecto inhibitorio sobre la amplificación del ácido nucleico; introducir reactivos de síntesis de ácido nucleico, por ejemplo, reactivos de amplificación de ácido nucleico, en la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV; someter la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV a condiciones de síntesis de ácido nucleico, por ejemplo, condiciones de amplificación de ácido nucleico, suficientes para dar como resultado la síntesis, por ejemplo, la amplificación, de un ácido nucleico objetivo cuando está presente; y detectar un producto de amplificación o síntesis resultante de la síntesis, por ejemplo, la amplificación, del ácido nucleico objetivo cuando está presente.

Una muestra biológica (por ejemplo, sangre total) puede recuperarse de un sujeto mediante el uso de cualquier medio conveniente. La muestra biológica puede procesarse para eliminar componentes distintos de las células mediante el uso, por ejemplo, de etapas de procesamiento tales como centrifugación, filtración y similares. Cuando se desee, las células pueden teñirse con uno o más anticuerpos y/o sondas antes de encapsularlas en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV.

También pueden añadirse uno o más agentes líticos a las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que contienen una célula, en condiciones en las que la(s) célula(s) puede(n) hacer que estalle, liberando, de esta manera, sus genomas. Los agentes líticos pueden añadirse después de que las células se encapsulen en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Puede emplearse cualquier agente lítico adecuado, tal como cualquier proteasa y/o proteinasa adecuada (por ejemplo, una proteasa y/o proteinasa que tiene una amplia especificidad del sustrato, por ejemplo, una serina proteasa no específica, por ejemplo, la proteinasa K, una proteasa de *Bacillus licheniformis* (por ejemplo, Número CAS 9014-01-1), proteasa de OB (disponible en Omega Bio-Tek) o citotoxinas. En las modalidades particulares, las células pueden coencapsularse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV con tampón de lisis que contiene detergentes tales como tritón X-100 y/o proteinasa K. Las condiciones específicas en las que la(s) célula(s) pueden provocar la ruptura variarán en dependencia del agente lítico específico usado. Por ejemplo, si la proteinasa K se incorpora como un agente lítico, las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV pueden calentarse a aproximadamente 37-60 °C durante aproximadamente 15 a 20 minutos para lisar las células y permitir que la proteinasa K digiera las proteínas celulares, después de lo cual pueden calentarse a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 5-10 minutos para inactivar la proteinasa K.

En ciertos casos, se pueden añadir agentes líticos a las células antes o simultáneamente con la encapsulación de las células en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV descritas en la presente descripción. Puede emplearse cualquier agente lítico conveniente, tal como cualquier proteasa y/o proteinasa adecuada (por ejemplo, una proteasa y/o proteinasa que tiene una amplia especificidad de sustrato, por ejemplo, una serina proteasa no específica, por ejemplo, la proteinasa K, una proteasa de *Bacillus licheniformis* (por ejemplo, Número CAS 9014-01-1), la proteasa de OB (disponible en Omega Bio-Tek) o las citotoxinas. En algunas modalidades, los detergentes no se utilizan específicamente ya que esto puede dar como resultado una lisis celular prematura antes de la encapsulación. En tales modalidades, la proteasa y/o la proteinasa, por ejemplo, la proteinasa K, pueden añadirse a las células, por ejemplo, en ausencia de detergentes, antes o simultáneamente con la encapsulación de las células en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. La proteasa y/o la proteinasa, por ejemplo, la proteinasa K, pueden añadirse a una temperatura lo suficientemente baja

como para garantizar que la proteasa y/o la proteinasa no esté en un estado activado antes o durante la encapsulación celular, por ejemplo, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C, que incluye aproximadamente 1 °C a aproximadamente 5 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 15 °C, y aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C. En algunas modalidades, la proteasa y/o la proteinasa pueden añadirse a aproximadamente 4 °C. Subsecuentemente, la temperatura de las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV puede aumentarse a una temperatura suficiente para garantizar la activación de la proteasa y/o la proteinasa, por ejemplo, 37-80 °C, tal como 30-50 °C, 37-55 °C, 40-60 °C, 50-60 °C, 60-70 °C, o 70-80 °C, para facilitar la activación de la proteasa y/o la proteinasa y la lisis celular. La incubación de la proteasa y/o la proteinasa puede ser durante un tiempo suficiente para dar como resultado la lisis celular, por ejemplo, 15-60 min (o más tiempo si es apropiado), por ejemplo, 15-20 minutos. La emulsión puede entonces romperse y la proteasa y/o la proteinasa lavarse según sea necesario. Tales procedimientos encuentran uso, por ejemplo, en los métodos de secuenciación de ARN de célula única (scRNAseq) descritos en la presente descripción.

En ciertos casos, la lisis celular también puede, o en su lugar, depender de técnicas que no implican la adición de un agente lítico. Por ejemplo, la lisis se puede lograr mediante técnicas mecánicas que pueden emplear diversas características geométricas para realizar perforaciones, cortes, abrasiones, etc. de células. También pueden usarse otros tipos de ruptura mecánica, tales como las técnicas acústicas. Además, la energía térmica también puede usarse para lisar células. Cualquier medio conveniente para llevar a cabo la lisis celular puede emplearse en los métodos descritos en la presente descripción.

Los cebadores pueden introducirse en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV para cada uno de los genes y/o marcadores genéticos, por ejemplo, oncogenes, a detectar. Por lo tanto, en ciertos casos, los cebadores para una variedad de genes y/o marcadores genéticos, por ejemplo, todos los oncogenes pueden estar presentes en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV al mismo tiempo, proporcionando, de esta manera, un ensayo multiplexado. Las gotitas y/o GUV pueden someterse a ciclos de temperatura de manera que las gotitas y/o GUV que contienen células objetivo, por ejemplo, células cancerosas, se someterán a PCR. Alternativamente, o además pueden utilizarse MDA u otros métodos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos, por ejemplo, amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP), amplificación por desplazamiento de hebras (SDA), amplificación dependiente de helicasa (HDA) y reacción de amplificación de enzimas de escisión (NEAR). Solo los cebadores correspondientes a oncogenes y/o marcadores genéticos presentes en el genoma inducirán la amplificación, creando muchas copias de estos oncogenes y/o marcadores genéticos en las gotitas y/o GUV. La detección de la presencia de estos productos de amplificación puede lograrse de diversas maneras, tal como mediante el uso de FRET, la tinción con un colorante de intercalación, o la unión de los mismos a una perla. Las gotitas y/o GUV pueden sondearse ópticamente para detectar los productos de amplificación. En algunas modalidades, sondear ópticamente las gotitas y/o GUV puede implicar contar el número de células tumorales presentes en la población inicial y/o permitir la identificación de los oncogenes presentes en cada célula tumoral.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para determinar si una muestra biológica contiene células particulares de interés, por ejemplo, células tumorales, o no. En ciertos casos, los métodos de la presente invención pueden incluir cuantificar el número de células de interés, por ejemplo, células tumorales, presentes en una muestra biológica. La cuantificación del número de células de interés, por ejemplo, células tumorales, presentes en una muestra biológica puede basarse al menos en parte en el número de gotitas y/o GUV en las que se detectaron productos de amplificación. Por ejemplo, las gotitas y/o GUV pueden producirse en condiciones en las que se espera que la mayoría de las gotitas contengan cero o una célula. Esas gotitas y/o GUV que no contienen ninguna célula pueden eliminarse, mediante el uso de las técnicas descritas más completamente en la presente descripción. Después de realizar las etapas de PCR descritas anteriormente, se puede contar el número total de gotitas y/o GUV que se detectan para contener productos de amplificación, para cuantificar el número de células de interés, por ejemplo, células tumorales, en la muestra biológica. En ciertos casos, los métodos también pueden incluir contar el número total de gotitas y/o GUV para determinar la fracción o porcentaje de células de la muestra biológica que son células de interés, por ejemplo, células tumorales.

En algunas modalidades, la introducción de los reactivos de síntesis en las gotitas de emulsión múltiple, y/o las GUV preparadas a partir de las gotitas monodispersas como se describe en la presente descripción incluye introducir los reactivos de síntesis en el tercer fluido, en donde los reactivos de síntesis se difunden desde el tercer fluido, a través de la cubierta inmiscible, y en el primer fluido de las gotitas de emulsión múltiple, y/o las GUV.

Las células y/o el material celular de interés pueden recuperarse al clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV y recuperar su contenido a través de la ruptura de gotitas, por ejemplo, a través de medios químicos, eléctricos o mecánicos como se describe con mayor detalle en la presente descripción. Se puede utilizar una variedad de técnicas de clasificación adecuadas y dispositivos relacionados para clasificar y separar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV que contienen productos de amplificación y/o síntesis, que incluyen los descritos en la presente descripción.

Detección de ácido nucleico en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

Como se analiza en la presente descripción, los métodos descritos encuentran uso en la detección de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, de interés a partir de una variedad de muestras biológicas. Tales métodos pueden incluir, por ejemplo, las etapas de encapsular un ácido nucleico y los reactivos de síntesis en una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV; someter la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV a condiciones de amplificación suficientes para dar como resultado la amplificación del ácido nucleico; y detectar un producto de amplificación resultante de la amplificación del ácido nucleico. Las condiciones de amplificación pueden ser condiciones de MDA y/o condiciones de PCR, por ejemplo, condiciones de RT-PCR, y/o condiciones adicionales de amplificación de ácido nucleico isotérmico, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico isotérmico mediada por lazo (LAMP), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación dependiente de helicasa (HDA) y reacción de amplificación de enzima de escisión (NEAR).

Los ácidos nucleicos de interés pueden recuperarse al clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV y al recuperar su contenido a través de la ruptura de gotitas, por ejemplo, a través de medios químicos, eléctricos o mecánicos como se describe con mayor detalle en la presente descripción. Se puede utilizar una variedad de técnicas de clasificación adecuadas y dispositivos relacionados para clasificar y separar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV que contienen productos de amplificación que incluyen los descritos en la presente descripción. En un caso, se proporciona un método para enriquecer una secuencia objetivo de ácido nucleico, en donde el método incluye encapsular una muestra que incluye ácidos nucleicos en una pluralidad de gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; introducir reactivos de MDA y reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una pluralidad de cebadores adecuados en las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV; incubar las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV en condiciones suficientes para la amplificación por MDA y condiciones suficientes para la amplificación por PCR para producir productos de amplificación de MDA y productos de amplificación por PCR, respectivamente, en donde los cebadores adecuados de la PCR pueden incluir uno o más cebadores que se hibridan cada uno con uno o más oligonucleótidos que incorporan la secuencia objetivo de ácido nucleico, y en donde los productos de amplificación por PCR no incluyen toda la secuencia objetivo de ácido nucleico; introducir un componente de detección en las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV ya sea antes o después de la incubación; detectar la presencia o ausencia de los productos de amplificación por PCR mediante la detección del componente de detección, en donde la detección del componente de detección indica la presencia de productos de amplificación por PCR y la secuencia objetivo de ácido nucleico; y clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV en base a la detección del componente de detección, en donde la clasificación separa las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que incluyen los productos de amplificación por PCR y la secuencia objetivo de ácido nucleico, cuando están presentes, de las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que no incluyen los productos de amplificación por PCR y la secuencia objetivo de ácido nucleico; y agrupar las secuencias de ácido nucleico de las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV para proporcionar un grupo enriquecido de secuencias de ácido nucleico objetivo, cuando están presentes. Una o más de estas etapas pueden realizarse bajo control microfluidico.

El método anterior permite, por ejemplo, el enriquecimiento de las moléculas de ADN fuera de un sistema heterogéneo en base a la presencia de las subsecuencias detectables por PCR. Las moléculas de ADN pueden ser cortas (por ejemplo, cientos de bases) o largas (por ejemplo, megabases o más largas). La muestra puede encapsularse en gotitas monodispersas de manera que las moléculas objetivo se detecten en las gotitas digitalmente, es decir, cada gotita contiene 0 o 1 molécula objetivo. Las gotitas monodispersas pueden luego clasificarse en base a, por ejemplo, la fluorescencia, para recuperar las moléculas objetivo. Este método puede usarse para enriquecer una gran región genómica, por ejemplo, del orden de megabases de longitud, en una muestra heterogénea de fragmentos de ADN.

El método anterior permite recuperar una cantidad suficiente de ADN sin la necesidad de realizar PCR para amplificar el ADN para la secuenciación. La preparación de muestras de ADN sin amplificación es valiosa, por ejemplo, cuando la PCR no conserva las secuencias o factores epigenéticos de interés, o no puede recuperar secuencias que son de la longitud necesaria (por ejemplo, mayor que aproximadamente 10 kb, el límite práctico de PCR de largo alcance).

Otra aplicación del método anterior es enriquecer el ADN para la secuenciación epigenética. Las marcas epigenéticas en el ADN no se conservan por la PCR, por lo que su secuenciación requiere ADN no amplificado de los ácidos nucleicos del huésped. Con el método anterior, se puede obtener una cantidad suficiente de ADN para la secuenciación sin necesidad de realizar la PCR y, por tanto, conservar las marcas epigenéticas.

Los métodos anteriores tienen una utilidad particular cuando la longitud del ácido nucleico objetivo excede los límites prácticos de la PCR de largo alcance, por ejemplo, cuando el ácido nucleico es mayor que aproximadamente 10 kb, y/o cuando es conveniente preservar las marcas epigenéticas en el ADN. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo a enriquecer es mayor que aproximadamente 100 kb de longitud, por ejemplo, mayor que aproximadamente 1 megabase de longitud. En algunas modalidades, el ácido nucleico objetivo a enriquecer es de aproximadamente

10 kb a aproximadamente 100 kb, de aproximadamente 100 kb a aproximadamente 500 kb, o de aproximadamente 500 kb a aproximadamente 1 megabase de longitud.

Después de la amplificación y/o purificación, las emulsiones se pueden romper mediante el uso de medios químicos y osmóticos para futuros análisis. Por ejemplo, se puede añadir un volumen igual de 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluoro-1-octanol a una muestra purificada y mezclar mediante pipeteo o agitación vorticial. La mezcla resultante puede entonces dejarse equilibrar, y la capa acuosa puede eluirse para un análisis adicional. De manera similar, se puede añadir un gran exceso de agua purificada a la muestra posterior a la clasificación, mezclar y dejar incubar a temperatura ambiente durante varias horas. La mezcla resultante puede analizarse directamente para obtener la muestra purificada de interés.

#### Amplificación por desplazamiento múltiple

Como se resumió anteriormente, en la práctica de los métodos de la invención, puede usarse MDA para amplificar ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN genómico, de una manera generalmente no sesgada y no específica para el análisis posterior, por ejemplo, a través de la secuenciación de próxima generación.

Una modalidad ilustrativa de un método descrito en la presente descripción incluye encapsular en una gotita monodispersa (por ejemplo, una gotita de emulsión simple monodispersa o una gotita monodispersa de emulsión múltiple) una molécula plantilla de ácido nucleico obtenida a partir de una muestra biológica, introducir los reactivos de MDA y una pluralidad de cebadores de MDA en la gotita monodispersa, e incubar la gotita monodispersa en condiciones efectivas para la producción de productos de amplificación de MDA, en donde la incubación es efectiva para producir productos de amplificación de MDA a partir de la molécula plantilla de ácido nucleico. En algunas modalidades, las etapas de encapsulación e introducción se producen como una sola etapa, por ejemplo, cuando la molécula plantilla de ácido nucleico se mezcla con reactivos de MDA y una pluralidad de cebadores de MDA, y se emulsiona, por ejemplo, mediante el uso de un elemento de enfoque de flujo de un dispositivo microfluídico.

Las condiciones de los ensayos basados en MDA descritos en la presente descripción pueden variar de una o más maneras. Por ejemplo, el número de cebadores de MDA que se pueden añadir a (o encapsular en) una gotita monodispersa puede variar. El término "cebador" se refiere a uno o más cebadores y se refiere a un oligonucleótido, ya sea que se produzca de forma natural, como en una digestión por restricción purificada, o que se produzca sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis a lo largo de una hebra complementaria cuando se coloca en condiciones en las que se cataliza la síntesis de un producto de extensión del iniciador que es complementario a una hebra de ácido nucleico. Tales condiciones incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos diferentes y un agente inductor de polimerización tal como una ADN polimerasa adecuada (por ejemplo, la ADN polimerasa  $\Phi 29$  o la ADN polimerasa Bst), en un tampón adecuado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.), y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación. En el contexto de MDA, se utilizan regularmente cebadores hexámeros aleatorios.

El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en la presente descripción se refiere a un oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de manera que el extremo 5' de una secuencia se empareja con el extremo 3' de la otra, está en "asociación antiparalela". La complementariedad no necesita ser perfecta; los híbridos estables pueden contener pares de bases desiguales o bases no coincidentes. Los expertos en la técnica del ácido nucleico pueden determinar la estabilidad del híbrido empíricamente considerando una serie de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la concentración en por ciento de bases de citosina y guanina en el oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases no coincidentes.

El número de cebadores de MDA que se pueden añadir a (o encapsular en) una gotita monodispersa puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 o más, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 100 cebadores, de aproximadamente 2 a 10 cebadores, de aproximadamente 10 a 20 cebadores, de aproximadamente 20 a 30 cebadores, de aproximadamente 30 a 40 cebadores, de aproximadamente 40 a 50 cebadores, de aproximadamente 50 a 60 cebadores, de aproximadamente 60 a 70 cebadores, de aproximadamente 70 a 80 cebadores, de aproximadamente 80 a 90 cebadores, de aproximadamente 90 a 100 cebadores, de aproximadamente 100 a 150 cebadores, de aproximadamente 150 a 200 cebadores, de aproximadamente 200 a 250 cebadores, de aproximadamente 250 a 300 cebadores, de aproximadamente 300 a 350 cebadores, de aproximadamente 350 a 400 cebadores, de aproximadamente 400 a 450 cebadores, de aproximadamente 450 a 500 cebadores, o de aproximadamente 500 cebadores o más.

Tales cebadores y/o reactivos pueden añadirse a una gotita monodispersa en una etapa, o en más de una etapa. Por ejemplo, los cebadores se pueden añadir en dos o más etapas, tres o más etapas, cuatro o más etapas, o cinco o más etapas. Donde se utiliza un agente lítico, independientemente de si los cebadores se añaden en una etapa o en más de una etapa, se pueden añadir después de la adición de un agente lítico, antes de la adición de un agente lítico, o simultáneamente con la adición de un agente lítico. Cuando se añaden antes o después de la adición de un agente lítico, los cebadores de MDA se pueden añadir en una etapa separada de la adición de un agente lítico.

Una vez que se han añadido cebadores a una gotita monodispersa, la gotita monodispersa puede incubarse en condiciones suficientes para MDA. La gotita monodispersa puede incubarse en el mismo dispositivo microfluídico que se usó para añadir el(los) cebador(es), o puede incubarse en un dispositivo separado. En ciertas modalidades, la incubación de la gotita monodispersa en condiciones suficientes para la amplificación por MDA se realiza en el mismo dispositivo microfluídico usado para la lisis celular. La incubación de las gotitas monodispersas puede tomar una variedad de formas, por ejemplo, las gotitas monodispersas pueden incubarse a una temperatura constante, por ejemplo, 30 grados. C, por ejemplo, durante aproximadamente 8 a aproximadamente 16 horas. Alternativamente, pueden utilizarse ciclos de 25 °C durante 5 minutos, seguidos de 42 °C durante 25 minutos.

Aunque los métodos descritos en la presente descripción para producir productos de amplificación de MDA no requieren el uso de sondas específicas, los métodos de la invención también pueden incluir la introducción de una o más sondas en la gotita monodispersas. Como se usa en la presente descripción con respecto a los ácidos nucleicos, el término "sonda" se refiere generalmente a un oligonucleótido marcado que forma una estructura híbrida con una secuencia en el ácido nucleico objetivo, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región objetivo. La sonda, preferentemente, no contiene una secuencia complementaria a la(s) secuencia(es) utilizada(s) para iniciar la reacción de MDA. El número de sondas que se añaden puede ser de aproximadamente una a 500, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10 sondas, de aproximadamente 10 a 20 sondas, de aproximadamente 20 a 30 sondas, de aproximadamente 30 a 40 sondas, de aproximadamente 40 a 50 sondas, de aproximadamente 50 a 60 sondas, de aproximadamente 60 a 70 sondas, de aproximadamente 70 a 80 sondas, de aproximadamente 80 a 90 sondas, de aproximadamente 90 a 100 sondas, de aproximadamente 100 a 150 sondas, de aproximadamente 150 a 200 sondas, de aproximadamente 200 a 250 sondas, de aproximadamente 250 a 300 sondas, de aproximadamente 300 a 350 sondas, de aproximadamente 350 a 400 sondas, de aproximadamente 400 a 450 sondas, de aproximadamente 450 a 500 sondas, o de aproximadamente 500 sondas o más. La(s) sonda(s) puede(n) introducirse en la gotita monodispersa antes, después o después de la adición de uno o más cebadores.

En ciertas modalidades, puede usarse un ensayo basado en MDA para detectar la presencia de ciertos transcritos de ARN presentes en células o para secuenciar el genoma de uno o más virus de ARN. En tales modalidades, los reactivos de MDA pueden añadirse a la gotita monodispersa mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. Antes o después de la adición (o encapsulación) de los reactivos de MDA, la gotita monodispersa puede incubarse en condiciones que permitan la transcripción inversa seguida de condiciones que permitan la MDA como se describe en la presente descripción. La gotita monodispersa puede incubarse en el mismo dispositivo microfluídico que se usa para añadir los reactivos del MDA, o puede incubarse en un dispositivo separado. En ciertas modalidades, incubar la gotita monodispersa en condiciones que permitan la MDA se realiza en el mismo dispositivo microfluídico usado para encapsular y/o lisar una o más células.

En ciertas modalidades, los reactivos añadidos a la gotita monodispersa para MDA incluyen, además, una sonda de ADN fluorescente capaz de detectar los productos de amplificación de MDA. Puede usarse cualquier sonda de ADN fluorescente adecuada, que incluye, entre otras, SYBR Green, TaqMan®, balizas moleculares y sondas escorpión. En ciertas modalidades, los reactivos añadidos a la gotita monodispersa incluyen más de una sonda de ADN, por ejemplo, dos sondas de ADN fluorescentes, tres sondas de ADN fluorescentes o cuatro sondas de ADN fluorescentes. El uso de múltiples sondas de ADN fluorescentes permite la medición simultánea de los productos de amplificación de MDA en una sola reacción.

#### PCR

Como se resumió anteriormente, en la práctica de los métodos de la invención puede usarse un ensayo basado en PCR para detectar la presencia de ciertos ácidos nucleicos de interés, por ejemplo, genes de interés y/o marcadores genéticos, por ejemplo, oncogenes, presentes en células o una muestra heterogénea de ácidos nucleicos. Tales ensayos basados en PCR pueden realizarse en la misma gotita monodispersa, por ejemplo, gotita de emulsión simple monodispersa o gotita monodispersa de emulsión múltiple como una etapa de amplificación de MDA anterior o posterior. En otras modalidades, las reacciones de PCR pueden realizarse en gotitas monodispersas de independientemente. Las condiciones de tales ensayos basados en PCR pueden variar de una o más maneras.

Por ejemplo, el número de cebadores de PCR que se pueden añadir a una gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV puede variar. El término "cebador" puede referirse a más de un cebador y se refiere a un oligonucleótido, ya sea que se produzca de forma natural, como en una digestión por restricción purificada, o se produzca sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis a lo largo de una hebra complementaria cuando se coloca en condiciones en las que se cataliza la síntesis de un producto de extensión del iniciador que es complementario a una hebra de ácido nucleico. Tales condiciones incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos diferentes y un agente inductor de polimerización tal como la ADN polimerasa o la transcriptasa inversa, en un tampón adecuado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.), y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación.

El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en la presente descripción se refiere a un

oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de manera que el extremo 5' de una secuencia se empareja con el extremo 3' de la otra, está en "asociación antiparalela". La complementariedad no necesita ser perfecta; los híbridos estables pueden contener pares de bases desiguales o bases no coincidentes. Los expertos en la técnica del ácido nucleico pueden determinar la estabilidad del híbrido empíricamente considerando una serie de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la concentración en por ciento de bases de citosina y guanina en el oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases no coincidentes.

El número de cebadores de PCR que se pueden añadir a una gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 o más, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 100 cebadores, de aproximadamente 2 a 10 cebadores, de aproximadamente 10 a 20 cebadores, de aproximadamente 20 a 30 cebadores, de aproximadamente 30 a 40 cebadores, de aproximadamente 40 a 50 cebadores, de aproximadamente 50 a 60 cebadores, de aproximadamente 60 a 70 cebadores, de aproximadamente 70 a 80 cebadores, de aproximadamente 80 a 90 cebadores, de aproximadamente 90 a 100 cebadores, de aproximadamente 100 a 150 cebadores, de aproximadamente 150 a 200 cebadores, de aproximadamente 200 a 250 cebadores, de aproximadamente 250 a 300 cebadores, de aproximadamente 300 a 350 cebadores, de aproximadamente 350 a 400 cebadores, de aproximadamente 400 a 450 cebadores, de aproximadamente 450 a 500 cebadores, o de aproximadamente 500 cebadores o más.

Estos cebadores pueden contener cebadores para uno o más genes de interés, por ejemplo, oncogenes. El número de cebadores para genes de interés que se añaden puede ser de aproximadamente uno a 500, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10 cebadores, de aproximadamente 10 a 20 cebadores, de aproximadamente 20 a 30 cebadores, de aproximadamente 30 a 40 cebadores, de aproximadamente 40 a 50 cebadores, de aproximadamente 50 a 60 cebadores, de aproximadamente 60 a 70 cebadores, de aproximadamente 70 a 80 cebadores, de aproximadamente 80 a 90 cebadores, de aproximadamente 90 a 100 cebadores, de aproximadamente 100 a 150 cebadores, de aproximadamente 150 a 200 cebadores, de aproximadamente 200 a 250 cebadores, de aproximadamente 250 a 300 cebadores, de aproximadamente 300 a 350 cebadores, de aproximadamente 350 a 400 cebadores, de aproximadamente 400 a 450 cebadores, de aproximadamente 450 a 500 cebadores, o de aproximadamente 500 cebadores o más. Los genes y oncogenes de interés incluyen, entre otros, BAX, BCL2L1, CASP8, CDK4, ELK1, ETS1, HGF, JAK2, JUNB, JUND, KIT, KITLG, MCL1, MET, MOS, MYB, NFKBIA, EGFR, Myc, EpCAM, NRAS, PIK3CA, PML, PRKCA, RAF1, RARA, REL, ROS1, RUNX1, SRC, STAT3, CD45, citoqueratinas, CEA, CD133, HER2, CD44, CD49f, CD146, MUC1/2 y ZHX2.

Tales cebadores y/o reactivos pueden añadirse a una gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV en una etapa, o en más de una etapa. Por ejemplo, los cebadores se pueden añadir en dos o más etapas, tres o más etapas, cuatro o más etapas, o cinco o más etapas. Independientemente de si los cebadores se añaden en una etapa o en más de una etapa, se pueden añadir después de la adición de un agente lítico, antes de la adición de un agente lítico, o simultáneamente con la adición de un agente lítico. Cuando se añaden antes o después de la adición de un agente lítico, los cebadores de PCR se pueden añadir en una etapa separada de la adición de un agente lítico.

Una vez que se han añadido cebadores a una gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV, la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita monodispersa de emulsión múltiple y/o GUV pueden incubarse en condiciones que permitan la PCR. La gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV pueden incubarse en el mismo dispositivo microfluídico que se usó para añadir el(los) cebador(es), o pueden incubarse en un dispositivo separado. En ciertas modalidades, la incubación de la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV en condiciones que permiten la amplificación por PCR se realiza en el mismo dispositivo microfluídico usado para encapsular y lisar células. La incubación de la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o GUV pueden tomar una variedad de formas. En ciertos casos, la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV que contiene la mezcla de PCR puede fluir a través de un canal que incubaba las gotitas monodispersas en condiciones efectivas para la PCR. En algunas modalidades, las reacciones de PCR se realizan sin el uso de dispositivos y/o sistemas microfluídicos. Hacer fluir la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV a través de un canal puede implicar un canal que serpentea sobre varias zonas de temperatura mantenidas a temperaturas efectivas para la PCR. Tales canales pueden, por ejemplo, ciclar sobre dos o más zonas de temperatura, en donde al menos una zona se mantiene a aproximadamente 65 °C y al menos una zona se mantiene a aproximadamente 95 °C. Alternativamente, pueden utilizarse zonas para 86 °C, 60 °C y 20 °C. A medida que las gotitas de emulsión simple monodispersas o la emulsión múltiple y/o las GUV se mueven a través de tales zonas, sus ciclos de temperatura, según sea necesario para la PCR. El número preciso de zonas y la temperatura respectiva de cada zona se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica para lograr la amplificación por PCR deseada.

En otras modalidades, la incubación de las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV puede implicar el uso de una matriz de megagotitas. En tal dispositivo, una matriz de cientos, miles o millones de trampas que se indenta en un canal (por ejemplo, un canal PDMS) se sienta sobre un sistema térmico. El canal puede presurizarse, evitando, de esta manera, que el gas se escape. La altura del canal microfluídico es

menor que el diámetro de las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, lo que hace que las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV adopten una forma de panqueque aplanada. Cuando una gotita de emulsión simple monodispersa o una gotita de emulsión múltiple y/o GUV fluye sobre una indentación desocupada, adopta un radio de curvatura más bajo, más energéticamente favorable, lo que conduce a una fuerza que tira de las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV completamente en la trampa. Al fluir las gotitas de emulsión simple o las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV como un paquete compacto, se asegura que todas las trampas de la matriz estén ocupadas. Todo el dispositivo puede someterse a un ciclo térmico mediante el uso de un calentador.

En ciertos casos, el calentador incluye una placa Peltier, un disipador de calor y un ordenador de control. La placa Peltier permite el calentamiento o enfriamiento del chip por encima o por debajo de la temperatura ambiente al controlar la corriente aplicada. Para garantizar una temperatura controlada y reproducible, una computadora puede monitorear la temperatura de la matriz mediante el uso de sondas de temperatura integradas y puede ajustar la corriente aplicada para calentar y enfriar según sea necesario. Una placa metálica (por ejemplo, cobre) permite una aplicación uniforme de calor y disipación de calor excesivo durante los ciclos de enfriamiento, lo que permite el enfriamiento de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 60 °C en menos de aproximadamente un minuto.

Los métodos de la invención también pueden incluir la introducción de una o más sondas a las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Como se usa en la presente descripción con respecto a los ácidos nucleicos, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido marcado que forma una estructura híbrida con una secuencia en el ácido nucleico objetivo, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región objetivo. En algunas modalidades, la sonda no contiene una secuencia complementaria a la(s) secuencia(es) utilizada(s) para la hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa. El número de sondas que se añaden puede ser de aproximadamente una a 500, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10 sondas, de aproximadamente 10 a 20 sondas, de aproximadamente 20 a 30 sondas, de aproximadamente 30 a 40 sondas, de aproximadamente 40 a 50 sondas, de aproximadamente 50 a 60 sondas, de aproximadamente 60 a 70 sondas, de aproximadamente 70 a 80 sondas, de aproximadamente 80 a 90 sondas, de aproximadamente 90 a 100 sondas, de aproximadamente 100 a 150 sondas, de aproximadamente 150 a 200 sondas, de aproximadamente 200 a 250 sondas, de aproximadamente 250 a 300 sondas, de aproximadamente 300 a 350 sondas, de aproximadamente 350 a 400 sondas, de aproximadamente 400 a 450 sondas, de aproximadamente 450 a 500 sondas, o de aproximadamente 500 sondas o más. La(s) sonda(s) puede(n) introducirse en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV antes, posterior a, o después de la adición de uno o más cebadores. Las sondas de interés incluyen, entre otras, sondas TaqMan® (por ejemplo, como se describe en el documento de Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991), "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase", PNAS, 88 (16): 7276-7280).

En ciertas modalidades, puede usarse un ensayo basado en RT-PCR para detectar la presencia de ciertos transcritos de interés, por ejemplo, oncogén(es), presentes en las células. En tales modalidades, la transcriptasa inversa y cualquier otro reactivo necesario para la síntesis de ADNc se añaden a las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV además de los reactivos usados para llevar a cabo la PCR descrita en la presente descripción (denominados colectivamente como los "reactivos de RT-PCR"). Los reactivos de RT-PCR se añaden a las gotitas de emulsión simple monodispersa o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV mediante el uso de métodos adecuados descritos en la presente descripción. Una vez que se han añadido los reactivos para la RT-PCR a una gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV, la gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV puede incubarse en condiciones que permitan la transcripción inversa seguida de condiciones que permitan la PCR como se describe en la presente descripción. La gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV pueden incubarse en el mismo dispositivo microfluídico que se usó para añadir los reactivos de RT-PCR, o pueden incubarse en un dispositivo separado. En ciertas modalidades, incubar la gotita de emulsión simple monodispersa o la gotita de emulsión múltiple y/o GUV en condiciones que permitan la RT-PCR se realiza en el mismo dispositivo microfluídico usado para encapsular y lisar células.

En ciertas modalidades, los reactivos añadidos a la gotita de emulsión simple monodispersa o gotita de emulsión múltiple y/o GUV para RT-PCR o PCR incluyen, además, una sonda de ADN fluorescente capaz de detectar los productos de RT-PCR o PCR. Puede usarse cualquier sonda de ADN fluorescente adecuada, que incluye, entre otras, SYBR Green, TaqMan®, balizas moleculares y sondas escorpión. En ciertas modalidades, los reactivos añadidos a las gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV incluyen más de una sonda de ADN, por ejemplo, dos sondas de ADN fluorescentes, tres sondas de ADN fluorescentes o cuatro sondas de ADN fluorescentes. El uso de múltiples sondas de ADN fluorescentes permite la medición simultánea de productos de RT-PCR o PCR en una sola reacción.

#### PCR doble

Para amplificar transcritos raros, una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV que se ha sometido a una primera etapa de reacción de RT-PCR o PCR como se describe en la presente

descripción puede someterse además a una segunda etapa de reacción de PCR. En algunas modalidades, una primera gotita de emulsión simple monodispersa, gotita de emulsión múltiple y/o GUV que se ha sometido a una primera etapa de la reacción de RT-PCR o PCR se encapsula en una segunda gotita de emulsión simple, gotita de emulsión múltiple y/o GUV que contiene reactivos de PCR adicionales, que incluyen, entre otros, enzimas (por ejemplo, ADN polimerasa), sondas de ADN (por ejemplo, sondas de ADN fluorescentes) y cebadores, seguido de la ruptura de la primera gotita de emulsión simple monodispersa, gotita de emulsión múltiple y/o GUV. En ciertas modalidades, la segunda gotita de emulsión simple, la gotita de emulsión múltiple y/o la GUV que contiene los reactivos de PCR adicionales es más grande que la gotita monodispersa que ha experimentado la primera etapa de la reacción RT-PCR o PCR. Esto puede ser beneficioso, por ejemplo, porque permite la dilución de los componentes celulares que pueden ser inhibitorios para la segunda etapa de la PCR. La segunda etapa de reacción de PCR puede llevarse a cabo en el mismo dispositivo microfluídico usado para llevar a cabo la reacción de la primera etapa, en un dispositivo microfluídico diferente o sin el uso de un dispositivo microfluídico.

En algunas modalidades, los cebadores usados en la segunda etapa de reacción de PCR son los mismos cebadores usados en la primera etapa de reacción de RT-PCR o PCR. En otras modalidades, los cebadores usados en la segunda etapa de reacción de PCR son diferentes de los cebadores usados en la reacción de la primera etapa.

#### PCR digital

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para cuantificar los ácidos nucleicos mediante el uso de, por ejemplo, PCR digital. En la PCR digital, los ácidos nucleicos objetivo de una solución se diluyen de manera que, cuando la muestra se aísla en compartimientos, la mayoría de los compartimientos encapsulan cero o una molécula objetivo, aunque a menudo se pueden usar tasas de carga más altas, siempre que se puedan modelar. Los reactivos suficientes para la amplificación de los ácidos nucleicos objetivo también se incluyen en los compartimientos, y los compartimientos se someten a condiciones adecuadas para la amplificación. Los compartimientos pueden tener una variedad de estructuras, que incluyen micropocillos fabricados en un sustrato o gotitas de una emulsión simple. También pueden formarse como, por ejemplo, gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas monodispersas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la muestra se compartimenta en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas monodispersas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles, y/o GUV y las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas monodispersas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles, y/o GUV se someten a condiciones de amplificación. Las gotitas que contienen un objetivo se someten a amplificación, mientras que las que no, no se someten a amplificación y, por lo tanto, no producen productos de amplificación de ácido nucleico. Si se incluye un componente de detección, las emulsiones simples o múltiples que incluyen el objetivo pueden llenarse con una señal detectable, lo que permite identificarlas por, por ejemplo, la obtención de imágenes o la caída de flujo. Una ventaja poderosa de usar emulsiones dobles para realizar dicha PCR digital es que las emulsiones dobles pueden suspenderse en una fase portadora acuosa que es miscible con la muestra particionada y, por lo tanto, puede detectarse y/o clasificarse fácilmente mediante el uso de citómetros de flujo y clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS) disponibles comercialmente. Esto permite enriquecer las entidades objetivo de una muestra que no es posible con otros métodos en los que la clasificación no se logra fácilmente.

En algunas modalidades, los métodos descritos pueden usarse para cuantificar los ácidos nucleicos en solución al contar la fracción de emulsiones simples o múltiples que son fluorescentes y se someten a amplificación y, por tanto, contienen al menos un único ácido nucleico objetivo, en la mayoría de los casos; la amplificación falsa puede ocurrir por razones estocásticas o, por ejemplo, la encapsulación de polvo u otros contaminantes que interfieren con la especificidad de la reacción de amplificación. También se pueden incluir sondas TaqMan<sup>®</sup>, balizas moleculares, SYBR y otros tipos de componentes de detección, lo que permite el uso de múltiples espectros ópticos para detectar simultáneamente la amplificación de diferentes secuencias de ácido nucleico en el objetivo o debido a múltiples objetivos que se encapsulan en las mismas gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas monodispersas de emulsión múltiple, por ejemplo, las emulsiones dobles y/o GUV, lo que puede ser ventajoso en algunos casos.

Como otros métodos de análisis de PCR, la dPCR se puede multiplexar mediante el uso de sondas marcadas con diferentes colorantes fluorescentes. Dado que la dPCR actúa sobre moléculas en gotitas, esto proporciona oportunidades de medición únicas que no son posibles con los métodos comunes, como la asociación física de secuencias distintas. Esto es valioso para una variedad de aplicaciones importantes en biología genómica, que incluye la caracterización de la diversidad de virus, la fase de los genomas microbianos, el haplotipado de los genomas de cáncer, la medición de las formas de empalme de ARNm y la caracterización de las distribuciones de longitud de las moléculas objetivo en solución.

#### Secuenciación de ARN (RNAseq)

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para la encapsulación de células individuales y la RNAseq. La RNAseq utiliza la secuenciación paralela masiva que se hace posible por las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS), otra forma de abordar la enumeración de transcritos de ARN en una muestra de tejido. Específicamente, la RNAseq puede usarse para estudiar fenómenos tales como los cambios en la

expresión génica, los eventos de empalme alternativo, la expresión génica específica del alelo y los transcritos quiméricos, que incluyen los eventos de fusión génica, los transcritos novedosos y la edición de ARN. El ADN complementario (ADNc) se puede recuperar de las emulsiones monodispersas y la transcripción estándar in vitro y la preparación de la biblioteca para la NGS que se realiza para recopilar los datos del análisis del perfil de expresión génica de una célula individual.

En la presente descripción se proporciona un método de secuenciación de ARN de célula única, el cual incluye: combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el primer fluido comprende una pluralidad de células; combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmisible con el primer fluido; y cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que comprenden el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas, y una de la pluralidad de células. Tal método puede incluir una etapa de lisis celular como se describe en la presente descripción, por ejemplo, una etapa de lisis de proteasa y/o proteinasa como se describe en la presente descripción, por ejemplo, una etapa de lisis de proteinasa K como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, una proteasa y/o proteinasa, por ejemplo, una proteasa y/o proteinasa que tiene una amplia especificidad del sustrato, por ejemplo, una serina proteasa no específica, por ejemplo, la proteinasa K, una proteasa de *Bacillus licheniformis* (por ejemplo, Número CAS 9014-01-1), o la proteasa de OB (disponible en Omega Bio-Tek) puede añadirse a las células, por ejemplo, en ausencia de detergentes, antes o simultáneamente con, la encapsulación de las células en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. La proteasa y/o la proteinasa pueden añadirse a una temperatura lo suficientemente baja para garantizar que la proteasa y/o la proteinasa no esté en un estado activado antes o durante la encapsulación celular, por ejemplo, aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C, que incluye aproximadamente 1 °C a aproximadamente 5 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 15 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C, o aproximadamente 1 °C a aproximadamente 25 °C. En algunas modalidades, la proteasa y/o la proteinasa pueden añadirse a aproximadamente 4 °C. Subsecuentemente, la temperatura de las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV pueden aumentarse a una temperatura suficiente para garantizar la activación de la proteasa y/o la proteinasa, por ejemplo, 37-80 °C, tal como 30-50 °C, 37-55 °C, 40-60 °C, 50-60 °C, 60-70 °C, o 70-80 °C, para facilitar la activación de la proteinasa K y la lisis celular. La incubación con proteinasa K puede ser durante un tiempo suficiente para dar como resultado la lisis celular, por ejemplo, 15-60 minutos (o más tiempo según corresponda), por ejemplo, 15-20 minutos. La emulsión puede entonces romperse, y la proteasa y/o la proteinasa, por ejemplo, la proteinasa K, se eliminan según sea necesario. El ARN de las células lisadas puede capturarse para la secuenciación posterior mediante el uso de cualquier método y reactivo adecuado en las gotitas monodispersas, por ejemplo, antes de romper la emulsión. Por ejemplo, las perlas de captura de ARN funcionalizadas, tales como las perlas de Drop-seq comercialmente disponibles de ChemGenes Corporation, pueden encapsularse con las células en las gotitas monodispersas. En algunas modalidades, tales perlas de captura de ARN funcionalizadas pueden incorporarse directamente en las partículas de plantilla. Por ejemplo, las perlas de captura de ARN funcionalizadas pueden encapsularse en un material de polímero adecuado (por ejemplo, hidrogel), por ejemplo, el hidrogel de poli(acrilamida) BAC mediante el uso de Bis(acrilóil)cistamina como un reticulante para la síntesis de perlas de poli(acrilamida).

#### Medición de las longitudes de los ácidos nucleicos

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para medir las distribuciones de longitud de los ácidos nucleicos en solución. Esto se puede lograr diseñando secuencias de sonda que se hibridan con los ácidos nucleicos objetivo en diferentes regiones de distancia conocida a lo largo de sus longitudes. Las sondas se pueden mezclar con los ácidos nucleicos objetivo y compartimentalizar en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Cada gotita de emulsión simple monodispersa, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV puede contener, por ejemplo, dos conjuntos de cebador y sonda que señalan la presencia de dos regiones diferentes en el objetivo a una distancia conocida. Esto se puede repetir para diferentes combinaciones de sondas de manera que diferentes pares sondeen diferentes distancias y diferentes regiones del objetivo. Las muestras pueden someterse a amplificación, análisis y clasificación, si se desea. En el análisis, se encontrará que algunas gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV se someten a amplificación solo con una de las sondas mientras que otras, por ejemplo, se amplifican solo con la otra sonda. Esto sugiere que en estas gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, un tipo contiene la región solo para una de las sondas, mientras que el otro tipo contiene la región de la otra sonda. En esta población, también puede haber gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, que se someten a amplificación con ambas sondas, lo que indica que el ácido nucleico objetivo que contiene en el mismo ambas regiones. En esta misma suspensión habrá un gran número de gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que incluyen una fracción medible de cada uno de los tres tipos de gotitas, además de las que, por supuesto, no experimentan amplificación y, por tanto, presumiblemente, no contienen las regiones objetivo. Estos datos pueden usarse para inferir las longitudes de los ácidos nucleicos en solución.

Por ejemplo, si los ácidos nucleicos en solución están en gran medida intactos como moléculas completas, entonces la mayoría de las gotitas que se someten a amplificación exhibirán amplificación tanto con conjuntos de sonda como

de cebador y por tanto mostrarán una señal mixta. Por el contrario, si los objetivos de ácido nucleico están muy fragmentadas, la mayoría de los eventos de detección serán de una u otra sonda, con solo casos raros de ambas sondas. Dado que se pueden conocer las distancias entre las sondas, esto permite estimar las longitudes y la fragmentación de las moléculas en la solución. Este proceso se puede repetir con diferentes conjuntos de sondas que se dirigen a diferentes regiones y/o que tienen diferentes distancias entre ellas, para caracterizar más completamente la fragmentación de los ácidos nucleicos objetivo.

Enriquecimiento microfluídico para análisis de secuencias (MESA) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para realizar el enriquecimiento microfluídico para análisis de secuencias (MESA) de los ácidos nucleicos objetivo. Esto se logra mediante el uso del método para encapsular los ácidos nucleicos objetivo en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV y realizar la amplificación en esas gotitas, lo que produce señales fluorescentes cuando las gotitas contienen una secuencia objetivo. Estas gotitas pueden luego clasificarse, enriqueciendo, de esta manera, los ácidos nucleicos en el grupo clasificado. La reacción también puede multiplexarse, si se desea, para diferenciar entre moléculas que contienen múltiples subsecuencias distintas. La amplificación también puede usarse para amplificar los ácidos nucleicos que se clasifican antes, simultáneamente o después de la clasificación, para permitir la secuenciación.

Una ventaja clave de este enfoque es que la región que se amplifica en las gotitas puede usarse simplemente como una "región de detección": los amplicones no necesitan incluir las moléculas que se someten a secuenciación. En cambio, ellos señalan cuando una molécula objetivo está presente en una gotita de manera que la molécula completa se pueda recuperar para el análisis posterior. Esto es potente porque permite recuperar un ácido nucleico grande, incluso uno que es demasiado grande para amplificarse eficientemente, para su análisis posterior. Por ejemplo, suponga que existe un gen que se cree que es parte de una vía biológica importante, por ejemplo, la cascada de señalización, en un microorganismo que aún no se ha descubierto. El objetivo es recuperar los genes que codifican las proteínas implicadas en esta vía para que puedan secuenciarse y estudiarse. Esto no se puede lograr fácilmente mediante el uso de los métodos de enriquecimiento existentes ya que el microbio, al ser desconocido, puede no ser cultivable específicamente y, además la vía, al ser en gran medida de secuencia desconocida, no se puede purificar mediante el uso de sondas de hibridación, ya que no se conocen las secuencias para las que las sondas se hibridan, aparte del gen individual, que puede ser demasiado pequeño para extraer toda la vía. Sin embargo, esto se puede lograr mediante el uso del método MESA descrito en la presente descripción.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos del objetivo pueden fragmentarse en un tamaño lo suficientemente grande como para encapsular toda la trayectoria, tal como, por ejemplo, decenas o cientos de kilobases, o incluso megabases o fragmentos más largos. Si la vía existe dentro de un fragmento, puede contener el gen conocido. Los ácidos nucleicos fragmentados, la mayoría de los cuales no contienen el objetivo, se someten a las técnicas descritas en la presente descripción, lo que da como resultado las gotitas de emulsión simple monodispersas, que, en su mayor parte, no contienen una vía y, por tanto, no exhiben amplificación, mientras que las gotas raras que sí contienen la vía, se someten a amplificación. Las gotitas positivas se pueden recuperar, por ejemplo, mediante la clasificación FACS de las emulsiones dobles que son fluorescentes. Estos pueden luego someterse a manipulaciones adicionales tales como, si es necesario, amplificación específica y no específica, cuantificación a través de PCR digital o cuantitativa y secuenciación de ADN. Una ventaja poderosa de MESA sobre otras estrategias de enriquecimiento es que permite detectar y recuperar ácidos nucleicos muy grandes, incluso hasta el tamaño de un genoma completo, en base a una secuencia corta conocida de solo decenas de cientos de pares de bases. Pocas otras metodologías de enriquecimiento tienen la capacidad de enriquecer tales secuencias de ácido nucleico grandes fuera de un grupo heterogéneo mediante el uso de tales cantidades limitadas de información sobre la secuencia.

El método también puede usarse para identificar las secuencias de ADN de genomas individuales. En esta modalidad, los ácidos nucleicos de un objetivo pueden fragmentarse y encapsularse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV con reactivos y cebadores de PCR específicos para la secuencia de ADN de interés. Después de la amplificación, las gotitas de emulsión simple monodispersas positivas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV se pueden clasificar en compartimientos individuales, tales como matrices de placas de pocillos, mediante el uso de FACS o MACS. Los compartimientos individuales pueden luego someterse a una manipulación adicional, tal como una amplificación específica o no específica. Los amplicones resultantes pueden usarse entonces para hacer bibliotecas para las técnicas de secuenciación de próxima generación, o como material usado directamente en la secuenciación de Sanger. Esta técnica sería útil, por ejemplo, en un método diseñado para identificar diferencias genéticas en una población retroviral, como el VIH, que se encuentra en un paciente individual.

Como se discutió anteriormente, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para PCR digital y, en relación con ello, enriquecimiento microfluídico para análisis de secuenciación (MESA). En algunas modalidades, una muestra que incluye ácidos nucleicos, virus, células, partículas, etc., se divide en emulsiones simples o múltiples como se describe en la presente descripción. Las gotitas se recogen en un depósito, tal como un tubo de PCR, y se

incubaban en condiciones adecuadas para la amplificación, tal como el ciclo térmico. También se pueden usar métodos isotérmicos, tales como MDA, MALBAC, LAMP, etc. Se puede incluir un indicador fluorescente en las gotitas o añadir a la fase portadora para inducir una diferencia en la fluorescencia entre las gotitas que contienen los ácidos nucleicos objetivo y las gotitas que no contienen los ácidos nucleicos objetivo.

Por ejemplo, se puede añadir Sybrgreen a la fase portadora de manera que se divida en la emulsión simple o múltiple. Dado que Sybr se vuelve mucho más fluorescente en presencia de ADN bicatenario, las gotitas que se someten a amplificación serán más brillantes de forma fluorescente que las que no. Para cuantificar el número de moléculas objetivo en la muestra, las gotitas pueden someterse a análisis de citometría de flujo, o incluso a clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

A medida que las gotitas fluyen a través del citómetro de flujo, se puede registrar la información sobre su tamaño y fluorescencia. En el caso de que las moléculas objetivo se carguen en dilución limitante, algunas gotitas se detectarán como fluorescentes, porque contenían una molécula objetivo, y otras se detectarán como tenues, porque no lo hacen. La fracción de gotitas de brillante a tenue puede usarse, de acuerdo con una distribución de Poisson para estimar la concentración inicial de la molécula objetivo en la muestra original. Mediante el uso de un FACS para clasificar las gotitas en base a la fluorescencia, es posible recuperar las emulsiones dobles que contienen las moléculas objetivo y, al romper las emulsiones dobles, recuperar las moléculas objetivo. Esto puede usarse para filtrar poblaciones grandes y heterogéneas de ácidos nucleicos para recuperar selectivamente las secuencias objetivo. El método anterior también puede realizarse mediante el uso de GUV, donde sea adecuado, en lugar de las gotitas de emulsión múltiple.

Clasificación de células activadas por PCR (PACS) en gotitas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV

La tecnología MESA permite el enriquecimiento de los ácidos nucleicos desnudos fuera de una solución, pero un enfoque similar se puede aplicar a los ácidos nucleicos contenidos dentro de las entidades, tales como dentro de las células, virus, esporas, partículas, etc., en donde el proceso es en gran medida el mismo. Por ejemplo, las entidades que incluyen los ácidos nucleicos objetivo se pueden encapsular en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, y someterse a condiciones suficientes para amplificar los ácidos nucleicos objetivo, como se describió anteriormente. Las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV pueden luego clasificarse en base a la amplificación, para recuperar las entidades que tienen el objetivo.

Una consideración importante al aplicar esta técnica a entidades biológicas, especialmente aquellas que tienen una membrana o cubierta protectora, por ejemplo, células, es que los ácidos nucleicos deben ser accesibles a los reactivos de amplificación para que se produzca una detección específica, lo que puede requerir procedimientos especializados. Por ejemplo, las entidades pueden encapsularse en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV con agentes que liberan ácidos nucleicos, tales como proteasas, lisozima, detergentes, bases fuertes, etc. También pueden encapsularse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV y luego sumergirse en una solución que contiene el agente lítico, que puede dividirse a través de la capa de las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o cubiertas de GUV para inducir la lisis. También pueden encapsularse, por ejemplo, en partículas de gel que pueden empaparse en un agente lítico. Luego, estas partículas de gel que contendrán los ácidos nucleicos de las entidades, se pueden encapsular en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV para la detección a través del procedimiento de amplificación. El gel puede seleccionarse de manera que no inhiba la lisis o la reacción de amplificación, tal como, por ejemplo, al garantizar que su tamaño de los poros sea lo suficientemente grande como para permitir que un reactivo se difunda a través del gel mientras atrapa los ácidos nucleicos, o al permitir que se funda al calentar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, como cuando se usa agarosa. El gel también puede funcionalizarse, si se desea, para unir los compuestos celulares deseados, tales como las moléculas de ARN que de cualquier otra manera pueden escapar de los geles y ser indetectables. Aún otro procedimiento que se puede implementar para permitir el acceso de los reactivos de síntesis a los ácidos nucleicos objetivo es usar corriente eléctrica para lisar células, virus, partículas, etc., a medida que se encapsulan en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV. Esto se puede lograr, por ejemplo, al hacer fluir las células a través de un canal en el que fluye una corriente eléctrica, que puede crear poros en una membrana celular, por ejemplo, y facilitar la lisis celular.

Clasificación de células activadas por PCR de células vivas (PACS)

La aplicación de la PCR de emulsión y la clasificación a las células como se describe en la presente descripción ha incluido la lisis y, en la mayoría de los casos, la muerte del organismo. Sin embargo, al modificar el enfoque y mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción, también es posible recuperar células intactas y vivas. Esto se puede lograr, por ejemplo, encapsulando células vivas en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV en condiciones de manera que el contenido de la célula se escape en la gotita de emulsión simple monodispersa de encapsulación, la gotita monodispersa de emulsión múltiple y/o GUV mientras

se mantiene la viabilidad de la célula. Esto es posible, por ejemplo, al hacer fluir la célula a través de un canal en el que también fluye una corriente eléctrica, que puede inducir la formación de poros en la membrana celular y permitir que el lisado celular se escape. Cuando la célula sale de este canal, su membrana puede volver a sellarse, mientras que el lisado que se escapó aún existe alrededor de la célula. Para las condiciones de flujo laminar, esto se puede realizar de manera que el lisado alrededor de la célula fluya con la célula y se encapsule en el mismo compartimiento, tal como una gotita de una emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV. También se pueden incluir reactivos adecuados para la amplificación de los ácidos nucleicos celulares o la detección de otros componentes celulares de manera que el lisado alrededor de la célula pueda interactuar con los reactivos cuando está en la gotita. La reacción puede diseñarse de manera que se produzca una señal fluorescente, lo que permite recuperar las gotitas que contienen la célula objetivo mediante clasificación, y permite la recuperación en vivo de las células. Este es un uso poderoso de la tecnología porque proporciona los beneficios de PACS: la capacidad de diferenciar entre células en base a los biomarcadores de secuencia, tales como las moléculas y el ARN, al tiempo que se preserva la vida celular para que se puedan realizar otras reacciones y análisis.

#### 15 Clasificación de células activadas por espectrometría de masas (MS-ACS)

Los métodos descritos en la presente descripción se basan, en algunas modalidades, en la capacidad de compartimentar reacciones en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles, y/o GUV, detectar productos de reacción dentro de las gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, y/o GUV, y clasificar las gotitas y/o GUV para recuperar entidades específicas en base a esos productos y realizar análisis adecuados. Se pueden realizar muchos tipos de ensayos, tales como ensayos enzimáticos, por ejemplo, PCR, para diferenciar entre diferentes entidades, tales como células y virus. Sin embargo, en algunos casos, las técnicas enzimáticas pueden no ser capaces de detectar el analito de interés. En estos casos, se pueden implementar otros métodos, tales como los métodos espectrográficos. Un método de detección muy potente es la espectrometría de masas, porque es sensible y general. Sin embargo, una limitación de la espectrometría de masas es que es una tecnología destructiva, que destruye la muestra que analiza. Si el objetivo es la recuperación de información solamente, esto puede ser aceptable, pero en algunos casos es conveniente recuperar adicionalmente material del sistema que, normalmente, sería destruido por el espectrómetro de masas.

Mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción, puede usarse la espectrometría de masas para analizar una muestra al tiempo que aún permite la recuperación de la muestra. Por ejemplo, suponga que el objetivo es identificar células que expresan proteínas implicadas en una vía. Las células se pueden cargar en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV y se cultivan, de modo que hay muchas en cada gotita de emulsión simple monodispersa, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, y/o para que se les permita producir los productos de las vías, por ejemplo, moléculas, compuestos, etc., que llenarán la gotita de emulsión simple monodispersa, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV pueden fluir en un dispositivo que dividirá una porción de las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, capturando parte del material de las células o secreciones celulares, que pueden someterse a espectrometría de masas destructiva. La otra porción puede entonces clasificarse. El espectrómetro de masas puede usarse para analizar los compuestos en la porción muestreada y esta información puede usarse para determinar cómo clasificar la porción hermana de la gotita. Mediante el uso de este método, es posible usar espectrometría de masas muy sensible y general para clasificar específicamente las células, al tiempo que permite la recuperación de células completas o lisados de células.

#### Crecimiento y lisis de colonias

La capacidad de encapsular células en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV, es valiosa para cultivar organismos, tales como células y virus. Por ejemplo, si las células se cultivan en un solo volumen compartido, la competencia entre las células puede dar como resultado que ciertas células se apoderen de la población, de manera que incluyan la mayoría de las células después de algún tiempo de cultivo. Al compartimentar las células en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV y cultivarlas, se puede controlar y/o mitigar la competencia. Además, la permeabilidad de las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV puede establecerse de manera que ciertas moléculas puedan pasar a través de ellas mientras que otras no. Esto permite, por ejemplo, que las moléculas de señalización u otras moléculas importantes para el crecimiento pasen libremente a través de las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las cubiertas de GUV, para controlar mejor las condiciones del cultivo.

#### Multiplexación

En ciertas modalidades de los métodos de la presente invención, pueden detectarse y analizarse múltiples biomarcadores para una célula en particular. Los biomarcadores detectados pueden incluir, entre otros, una o más proteínas, transcritos y/o firmas genéticas en el genoma de la célula o sus combinaciones. Con la detección basada en fluorescencia estándar, el número de biomarcadores que se pueden investigar simultáneamente puede limitarse

al número de colorantes fluorescentes que se pueden visualizar independientemente dentro de cada gotita de emulsión simple monodispersa, gotita de emulsión múltiple y/o GUV. En ciertas modalidades, se puede aumentar el número de biomarcadores que se pueden detectar individualmente dentro de una gotita de emulsión simple monodispersa particular, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV. Por ejemplo, esto se puede lograr mediante la segregación de colorantes en diferentes partes de una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV. En modalidades particulares, las perlas (por ejemplo, LUMINEX® perlas) conjugadas con colorantes y sondas (por ejemplo, sondas de ácido nucleico o anticuerpos) pueden encapsularse en una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV para aumentar el número de biomarcadores analizados. En otra modalidad, la polarización de fluorescencia puede usarse para lograr un mayor número de señales detectables para diferentes biomarcadores para una célula individual. Por ejemplo, los colorantes fluorescentes se pueden unir a diversas sondas y una gotita de una emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV se pueden visualizar bajo diferentes condiciones de polarización. De esta manera, el mismo colorante de color se puede utilizar para proporcionar una señal para diferentes objetivos de sonda para una célula individual. El uso de células fijas y/o permeabilizadas (como se analiza en mayor detalle más abajo) también permite el aumento de los niveles de multiplexación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos marcados para dirigirse a los objetivos de proteínas localizadas en los componentes celulares, mientras que los productos de PCR y/o RT-PCR marcados son libres dentro de una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o GUV. Esto permite que se usen colorantes del mismo color para anticuerpos y para los amplicones producidos por RT-PCR.

#### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) digital

En algunas modalidades, los métodos y dispositivos descritos pueden usarse para cuantificar epítomos en una muestra mediante el uso de un procedimiento de ELISA digital. En algunas modalidades, por ejemplo, los epítomos unidos a un sustrato sólido, tal como una superficie plana del sustrato o las superficies de las perlas, pueden unirse adicionalmente con un reactivo de afinidad marcado con un catalizador enzimático. La muestra se puede lavar para eliminar los reactivos de afinidad y las enzimas no unidos. Los epítomos etiquetados o una porción de estos pueden liberarse en solución de diversas maneras. Para facilitar, el catalizador enzimático se puede unir al reactivo de afinidad a través de un enlace que se puede degradar químicamente o con la aplicación, por ejemplo, de calor o luz. Alternativamente, la interacción entre el reactivo de afinidad y el epítomo se puede romper, o la interacción entre el epítomo y el sustrato se puede romper. Si la unión se produce en las perlas, entonces las perlas se pueden suspender en solución después de la etapa de lavado, suspendiendo, de esta manera, los catalizadores enzimáticos. Los catalizadores enzimáticos suspendidos pueden encapsularse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV, con reactivos suficientes para detectar el catalizador enzimático, tal como un sustrato que el catalizador enzimático puede convertir en un producto fluorescente. Las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV pueden incubarse luego en condiciones adecuadas para la catálisis, lo que da como resultado gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que contienen una gran cantidad de producto de reacción cuando el catalizador está presente y una baja cantidad cuando no lo está. El número de gotitas monodispersas de emulsión simple fluorescentes, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV se puede cuantificar en comparación con las gotitas monodispersas de emulsión simple, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, proporcionando una medida del número de moléculas de catalizador presentes en la muestra. Esta información puede usarse para inferir la concentración de epítomos en la muestra original.

Mediante el uso de los métodos de multiplexación descritos en la presente descripción, esto también se puede lograr sin la necesidad de lavar la muestra después de la unión. Por ejemplo, se pueden introducir dos anticuerpos que detectan el mismo objetivo en la muestra, cada uno etiquetado con un catalizador diferente. La muestra puede encapsularse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV. En el caso de que esté presente un objetivo, este debe unirse, en muchos casos, por ambos anticuerpos, como ocurre en un ELISA "sándwich" típico, excepto en este caso las moléculas están libres para difundir en solución en lugar de unirse a un sustrato. Los resultados serán gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que, a veces, contienen solo uno de los anticuerpos o que contienen ambos anticuerpos, que pueden detectarse al monitorear la presencia de las reacciones del catalizador en las gotitas. Siempre que las diluciones se controlen adecuadamente de manera que la mayoría de las gotitas estén vacías, debería ser posible atribuir la presencia de ambos productos catalizadores a un objetivo presente en la gotita, mientras que la presencia de solo uno de los productos catalizadores probablemente corresponde a un anticuerpo no unido. Al cuantificar la fracción de gotitas doble positivas, es posible estimar la fracción de objetivos en solución sin tener que realizar procedimientos de lavado.

#### Ensayo inmunoabsorbente ligado a oligonucleótidos digital (dOLISA)

Los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para la detección sensible y la cuantificación absoluta de las moléculas de ARN. Los enfoques de ensayo de interés también incluyen, entre otros, los descritos por Chang y otros, documento J. Immuno. Methods. 378(1-2), 102-15 (2012). Esta aplicación se aplica a concentraciones extremadamente bajas de analitos y las características de unión pueden desviarse de las plataformas típicas de inmunoensayo o ELISA. El análisis teórico aclara qué métricas de rendimiento (sensibilidad

de detección, velocidad del ensayo, etc.) se pueden esperar de un conjunto de parámetros experimentales.

El método implica la unión de las moléculas de proteínas objetivo a los anticuerpos conjugados a una superficie de perlas. La cantidad de proteínas unidas (eficiencia de captura) en estado de equilibrio se determina mediante la constante de disociación  $K_D$ , estableciendo el límite superior para la eficiencia de captura. La reacción de unión es un proceso dinámico que se rige por las velocidades de encendido y apagado ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ) y la evolución dependiente del tiempo del sistema se puede simular resolviendo numéricamente la ecuación diferencial que describe la cinética. Sin la intención de estar obligado por ninguna teoría, la cinética de unión depende principalmente del valor de  $k_{on}$  mientras que el valor de  $K_D$  tiene un efecto insignificante sobre él. La cinética lenta se puede rescatar si se puede proporcionar una mayor concentración de anticuerpos para la unión.

En algunas modalidades, la velocidad  $k_{on}$  dicta la duración requerida de la incubación para lograr la eficiencia de detección deseada. En el caso de dOLISA, el anticuerpo secundario se conjuga con un oligo de ADN. El complejo ternario (Ab-Ligand-oligoAb) se encapsula en 0,1-10 millones de gotitas, por ejemplo, gotitas de emulsión simple monodispersas, (5-50 pl cada una en volumen) de manera que haya moléculas de plantilla de ADN únicas por gotita, se realiza la amplificación por PCR de gotitas en presencia de un reactivo fluorogénico y se cuentan las gotitas fluorescentes.

#### Formación de microgeles de núcleo-cubierta a través de PTE

En la presente descripción se proporcionan métodos para crear microgeles de núcleo-cubierta mediante el uso de PTE. Tales métodos generalmente incluyen combinar una pluralidad de partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el primer fluido comprende una pluralidad de partículas objetivo y un componente polimérico; combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el segundo fluido es inmisible con el primer fluido y el componente polimérico; y cizallar la segunda mezcla de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla monodispersas se encapsulan en una pluralidad de gotitas monodispersas en el segundo fluido; proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas monodispersas que comprenden el primer fluido, una de las partículas de plantilla monodispersas rodeadas por una cubierta del componente polimérico, y una de la pluralidad de partículas objetivo.

La nueva cubierta exterior formada puede usarse para retener materiales biológicos y reactivos para ampliar el rango de aplicaciones para la tecnología de emulsión instantánea. En algunas modalidades, la cubierta puede formarse después del cizallamiento. En algunas modalidades, la cubierta del componente polimérico puede solidificarse incubando a una temperatura adecuada, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C, que incluye aproximadamente 1 °C a aproximadamente 5 °C, aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C, aproximadamente 15 °C a aproximadamente 20 °C, y aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C. En algunas modalidades, se usa una temperatura de incubación de 4 °C.

Tales métodos pueden combinarse con análisis dirigido a través de la emulsificación con plantilla de partículas basada en afinidad como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, las partículas de plantilla monodispersas se funcionalizan con agentes de captura, por ejemplo, anticuerpos o reactivos de captura de ácido nucleico, por ejemplo, oligos.

#### Clasificación

En la práctica de los métodos descritos en la presente descripción, se pueden emplear uno o más etapas de clasificación. Los enfoques de clasificación de interés incluyen, pero no se limitan necesariamente a, enfoques que implican el uso de válvulas de membrana, canales de bifurcación, ondas acústicas superficiales, coalescencia selectiva, desviación dielectroforética, control de flujo y/u otro estímulo que se usa para desviar selectivamente las gotitas monodispersas. Los enfoques de clasificación de interés incluyen, además, los descritos por Agresti y otros, documento PNAS, vol. 107, Núm. 9, 4004-4009. Una población puede enriquecerse mediante clasificación, en el que una población que contiene una mezcla de miembros que tienen o no tienen una propiedad deseada puede enriquecerse al eliminar esos miembros que no tienen la propiedad deseada, produciendo, de esta manera, una población enriquecida que tiene la propiedad deseada.

La clasificación puede aplicarse antes o después de cualquiera de las etapas descritas en la presente descripción. Además, pueden aplicarse dos o más etapas de clasificación a las gotitas, por ejemplo, gotitas monodispersas y/o GUV, por ejemplo, aproximadamente 2 o más etapas de clasificación, aproximadamente 3 o más, aproximadamente 4 o más, o aproximadamente 5 o más, etc. Cuando se aplica una pluralidad de etapas de clasificación, las etapas pueden ser sustancialmente idénticas o diferentes de una o más maneras (por ejemplo, clasificación en base a una propiedad diferente, clasificación mediante el uso de una técnica diferente y similares).

Las gotitas, incluidas las gotitas monodispersas preparadas como se describe en la presente descripción, pueden clasificarse en base a una o más propiedades. Las propiedades de interés incluyen, entre otras, el tamaño, la viscosidad, la masa, la flotabilidad, la tensión superficial, la conductividad eléctrica, la carga, el magnetismo, la fluorescencia y/o la presencia o ausencia de uno o más componentes. En ciertos casos, la clasificación puede ser en

base a, al menos en parte, la presencia o ausencia de una célula en la gotita monodispersa. En ciertos casos, la clasificación puede ser en base a, al menos en parte, en base a la detección de la presencia o ausencia de productos de amplificación de ácido nucleico tales como productos de amplificación o síntesis, por ejemplo, como se indica mediante la detección de un producto de amplificación fluorescente; o indicado mediante la detección de un antígeno de superficie de un producto de amplificación.

Se puede emplear la clasificación de gotitas monodispersas, por ejemplo, para eliminar las gotitas monodispersas en las que no hay células presentes. La encapsulación puede dar como resultado una o más gotitas monodispersas, que incluyen la mayoría de las gotitas monodispersas, en las que no está presente ninguna célula. Si tales gotitas monodispersas vacías se dejaran en el sistema, se procesarían como cualquier otra gotita monodispersa, durante la cual se desperdiciarían reactivos y tiempo. Para lograr la velocidad y eficiencia más altas, estas gotitas monodispersas vacías se pueden eliminar con la clasificación de gotitas monodispersas. Por ejemplo, un generador de gotas puede funcionar cerca de la transición de goteo a chorro de manera que, en ausencia de una célula, se forman gotas de 8  $\mu\text{m}$ ; por el contrario, cuando una célula está presente, la perturbación creada en el flujo desencadenará la ruptura del chorro, formando gotitas de 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo tanto, el dispositivo puede producir una población bidispersa de gotitas vacías de 8  $\mu\text{m}$  y gotas de 25  $\mu\text{m}$  que contienen una célula individual, que luego pueden clasificarse por tamaño mediante el uso de, por ejemplo, un clasificador hidrodinámico para recuperar solo las gotas más grandes que contienen una célula individual.

Los clasificadores pasivos de interés incluyen los clasificadores hidrodinámicos, que clasifican las gotitas monodispersas en diferentes canales de acuerdo con el tamaño, en base a las diferentes formas en que las gotitas monodispersas pequeñas y grandes viajan a través de los canales microfluidicos. También son de interés los clasificadores a granel, un ejemplo simple de los cuales es un tubo que contiene gotitas monodispersas de diferente masa en un campo gravitacional. Al centrifugar, agitar y/o sacudir el tubo, las gotitas monodispersas más ligeras que son más flotantes migrarán naturalmente a la parte superior del contenedor. Las gotitas monodispersas que tienen propiedades magnéticas podrían clasificarse en un proceso similar, excepto al aplicar un campo magnético al contenedor, hacia el cual las gotitas monodispersas con propiedades magnéticas migrarán naturalmente de acuerdo con la magnitud de esas propiedades. Un clasificador pasivo como se usa en los métodos de la presente invención también puede implicar canales relativamente grandes que clasificarán grandes números de gotitas monodispersas simultáneamente en base a sus propiedades de flujo.

La picoinyección también puede usarse para cambiar las propiedades eléctricas de las gotitas monodispersas. Esto podría usarse, por ejemplo, para cambiar la conductividad de las gotitas monodispersas añadiendo iones, que luego podrían usarse para clasificarlas, por ejemplo, mediante el uso de dielectroforesis. Alternativamente, la picoinyección también puede usarse para cargar las gotitas monodispersas. Esto podría lograrse al inyectar un fluido en las gotitas monodispersas que se cargan, de modo que después de la inyección, las gotitas monodispersas se cargarían. Esto produciría una colección de gotitas monodispersas en las que algunas estaban cargadas y otras no, y las gotitas monodispersas cargadas podrían entonces extraerse al hacerlas fluir a través de una región de campo eléctrico, que las desviaría en base a su cantidad de carga. Al inyectar diferentes cantidades de líquido al modular la picoinyección, o al modular la tensión para inyectar diferentes cargas para el volumen de inyección fijo, la carga final en las gotitas monodispersas podría ajustarse, para producir gotitas monodispersas con una carga diferente. Estos se desvían entonces en diferentes cantidades en la región del campo eléctrico, lo que permite que se clasifiquen en diferentes contenedores.

La citometría de flujo (FC) puede utilizarse como una alternativa a la clasificación de gotitas monodispersas en chip en cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. Tal método, junto con los dispositivos que pueden utilizarse en la práctica del método, se describen en el documento de Lim y Abate, Lab Chip, 2013, 13, 4563-4572. Brevemente, las gotitas monodispersas pueden formarse y manipularse, por ejemplo, mediante el uso de técnicas como la división y la picoinyección como se describe en la presente descripción, lo que da como resultado emulsiones simples. Estas emulsiones simples pueden luego ser doblemente emulsificadas, por ejemplo, para proporcionar gotitas de emulsión múltiple y/o GUV como se describe en la presente descripción, por ejemplo, mediante el uso de uno o más dispositivos como se describe en la presente descripción o en el documento de Lim y Abate, Lab Chip, 2013, 13, 4563-4572. Las emulsiones dobles pueden analizarse a través de FC, por ejemplo, FACS.

Las gotitas, por ejemplo, las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión doble, y/o las GUV, generadas mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para realizar una variedad de reacciones químicas y biológicas encapsuladas, que incluyen, por ejemplo, las reacciones que implican enzimas, tales como la PCR. En muchos casos, el resultado de la reacción puede ser un producto que puede ser de interés detectar. Además, puede ser de interés recuperar gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que tienen diferentes niveles del producto, o una combinación de múltiples productos. Esto se puede lograr mediante el uso de la invención de diversas maneras. Por ejemplo, las reacciones pueden dividirse en los reactores de gotitas de emulsión simple monodispersos, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV de manera que diferentes gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV reaccionen a diferentes niveles y tengan diferentes concentraciones de producto final. Las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV se pueden investigar luego mediante el uso de, por

ejemplo, técnicas espectrográficas, tales como imágenes ópticas o fluorescentes, citometría de flujo, espectroscopía Raman, espectrometría de masas, etc. Estos métodos, o sus combinaciones, pueden usarse para determinar las concentraciones de diferentes compuestos en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV. Estos métodos se pueden combinar con un mecanismo para clasificar gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV mediante el uso, por ejemplo, de clasificación basada en microfluídica o citometría de flujo en el caso de las emulsiones dobles. El contenido de las gotitas de emulsión simple monodispersas clasificadas positiva y negativamente, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV se puede analizar para identificar diferentes propiedades de estos grupos clasificados.

Adicionalmente, en algunos casos, puede ser conveniente cargar gotitas individuales clasificadas positivamente en pocillos aislados para un estudio adicional que permita, por ejemplo, un análisis individual adicional y detallado de cada gotita clasificada positivamente. Como un ejemplo no limitante, los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción pueden usarse para investigar virus que contienen una secuencia de ácido nucleico específica. Los virus de una población heterogénea pueden, por ejemplo, cargarse en gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV con reactivos suficientes para la lisis y amplificación de los ácidos nucleicos objetivo. Las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV se pueden analizar y clasificar, por ejemplo, con citometría de flujo para las emulsiones dobles, para detectar y recuperar todas las gotitas que se sometieron a amplificación de los ácidos nucleicos objetivo. Estas gotitas se pueden clasificar en un solo grupo positivo o clasificar individualmente en pocillos en una matriz de placa de pocillos, por ejemplo. Incluso pueden cargarse en grupos específicos, si se desea, de modo que cada pocillo de la matriz tenga una combinación deseada de eventos positivos, que pueden ser todos iguales o exhibir diferentes objetivos de amplificación. Las gotitas clasificadas pueden luego someterse a un análisis adicional tal como, por ejemplo, espectrometría de masas o secuenciación de próxima generación.

En el caso de análisis agrupado, los ácidos nucleicos de todas las células cargadas en el contenedor positivo se mezclarán y analizarán en su conjunto. Sin embargo, al cargar gotitas individuales en los pocillos, el contenido de cada pocillo se puede analizar individualmente, tal como, por ejemplo, al codificar los ácidos nucleicos en cada pocillo antes de la agrupación y secuenciación. Esto permite, por ejemplo, la lisis de genomas virales individuales de la especie objetivo para no solo detectar la especie objetivo, sino recuperar los genomas individuales de manera que se puedan obtener comparaciones entre diferentes miembros de la misma especie. Dicho análisis es útil para una variedad de aplicaciones tales como metagenómica o para estudiar la diversidad viral.

En algunas modalidades de la invención, es conveniente amplificar las moléculas objetivo además de la amplificación que se usa para la detección para permitir, por ejemplo, análisis adicionales en los ácidos nucleicos objetivo que se clasifican. Por ejemplo, en algunas aplicaciones, el objetivo incluirá los ácidos nucleicos convenientes para la secuenciación, pero la cantidad de ácidos nucleicos proporcionados por el objetivo será demasiado pequeña para permitir la secuenciación. En estos casos, se puede aplicar un procedimiento de amplificación, tal como una PCR específica y/o una amplificación por desplazamiento múltiple no específica, antes o después de clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Por ejemplo, en el caso de un virus con un genoma lineal relativamente pequeño, tal como el poliovirus o el VIH, se puede realizar una PCR antes o después de la clasificación para proporcionar copias suficientes de cada genoma después de la clasificación para permitir el análisis de secuenciación. Por ejemplo, los genomas individuales pueden encapsularse en gotitas y someterse a la amplificación de la totalidad o una porción del genoma. Simultáneamente o después de esta reacción, se puede realizar una amplificación adicional para identificar el genoma en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, y las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV clasificadas en base a esta información. Estas emulsiones simples o múltiples clasificadas, que ahora contienen un gran número de copias del ácido nucleico objetivo, pueden luego someterse más fácilmente a análisis posteriores.

Alternativamente, los genomas individuales se pueden encapsular y someter a la amplificación de detección de manera que, por ejemplo, cada una de las gotitas de emulsión simple monodispersas positivas, la gotita monodispersa de emulsión múltiple y/o GUV contiene solo una copia de la longitud completa del ácido nucleico objetivo y un gran número de los amplicones de la región de detección pequeña. En base a estos amplicones, las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV se pueden recuperar como un grupo, proporcionando para cada evento de clasificación positivo una copia de longitud completa del genoma objetivo. Para preparar una biblioteca de secuenciación, estos genomas positivos pueden luego amplificarse mediante el uso de una PCR que es específica y tiene cebadores que flanquean las regiones deseadas o, alternativamente, un método no específico para amplificar la totalidad del genoma, tal como la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) o ciclos de amplificación basados en hibridación múltiple y en lazo (MALBAC). Además, si las gotitas de emulsión simple monodispersas positivas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV no se agrupan, por ejemplo, si las gotitas de emulsión simple monodispersas positivas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV se clasifican en una matriz de placa de pocillos, y luego se someten a amplificación mediante el uso de una PCR que es específica y tiene cebadores que flanquean la región deseada, los amplicones individuales resultantes pueden usarse directamente como material para la secuenciación de Sanger.

Una ventaja poderosa de los métodos y dispositivos descritos es su capacidad para realizar un gran número de

reacciones independientes e aisladas y luego aplicar una variedad de técnicas espectrográficas para detectar productos de reacción y clasificar para recuperar reactores específicos que experimentaron una reacción deseada. Un desafío que puede surgir en el desempeño de los métodos descritos es que, en algunos casos, los eventos positivos que se desean para un análisis adicional podrían ser muy raros. Por ejemplo, si los métodos descritos se usan para detectar un virus específico en un grupo grande y diverso de virus, en el que el virus deseado está presente a un nivel muy bajo, entonces puede ser necesario analizar un gran número de virus individuales para recuperar el virus específico. Y, si es conveniente recuperar múltiples instancias de la especie, entonces podría ser necesario analizar un número aún mayor de virus totales. Dado que el número de reacciones que se pueden realizar y clasificar con los métodos descritos es finito, puede haber casos en los que el objetivo sea demasiado raro para detectarlo de manera confiable.

En ciertos casos, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse en un proceso de clasificación en niveles para recuperar eventos extremadamente raros, cada ronda de clasificación proporciona un factor de enriquecimiento. Al realizar la clasificación de la muestra repetidamente, la muestra se puede enriquecer para los objetivos de manera que el enriquecimiento total se convierta en el producto multiplicativo de todos los enriquecimientos individuales. Por ejemplo, suponga que un sistema descrito en la presente descripción es capaz de generar, analizar y clasificar a lo máximo 1 millón de gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. En condiciones ideales, esto significa que un evento que está presente en, por ejemplo, 1 en mil millones es poco probable que se detecte con un uso sencillo del sistema. Sin embargo, al realizar la clasificación por niveles y enriquecer el objetivo en cada ronda de clasificación, tales eventos raros se pueden recuperar.

Por ejemplo, en una primera ronda, se pueden aislar 10 mil millones de entidades para la prueba en el millón de gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV de manera que cada gotita y/o GUV contiene aproximadamente 10 000 entidades. Si la entidad objetivo está presente en 1 en 1 mil millones, entonces en tal muestra habrá a lo máximo 10 gotitas de emulsión simple monodispersas, gotitas de emulsión múltiple y/o GUV que contienen el objetivo y por tanto son positivas. Estos se clasificarán, cada uno proporciona 10 000 entidades, lo que produce un número total de 100 000 entidades en las que se mezclan las 10 deseadas. En algunos casos, este enriquecimiento puede ser suficiente, pero en otros, puede ser conveniente enriquecer aún más, incluso hasta una pureza del 100 %. En este caso, puede usarse el enfoque de clasificación en niveles, cargando las 100 000 entidades en 1 millón de gotitas de manera que, por ejemplo, 1 en 10 gotitas contenga 1 entidad, cargando de acuerdo con una distribución de Poisson. En este caso, la mayoría de las gotitas que se determinan positivas para el objetivo contendrán solo esa entidad objetivo, aunque debido a la naturaleza aleatoria de la carga de Poisson, algunas también contendrán entidades fuera del objetivo negativas que se coencapsularon con un positivo.

Cuando se analizan y clasifican las 1 millón de gotitas, se determinará que 10 contienen de nuevo la entidad objetivo y se recuperarán con la clasificación, proporcionando una población altamente enriquecida que es casi completamente pura para el objetivo. Para enriquecer más, se puede realizar una ronda adicional de clasificación. El poder de la clasificación por niveles es que en este caso el enriquecimiento final es el producto multiplicativo de los enriquecimientos individuales. Por ejemplo, si el método es capaz de enriquecer un máximo de  $10^3$  en una ronda, luego al realizar la clasificación dos veces en la misma muestra, el enriquecimiento final se convertirá en  $10^3 \times 10^3 = 10^6$ , mientras que otra ronda proporcionará un enriquecimiento final de, por ejemplo,  $10^9$ . Adicionalmente, los enriquecimientos pueden ser similares en cada ronda o diferentes, en dependencia de los deseos del usuario. Por ejemplo, una primera ronda con un pequeño número de relaciones puede usarse para proporcionar un enriquecimiento de, por ejemplo,  $10^3$ , y luego puede usarse una ronda más intensiva para realizar un enriquecimiento de  $10^6$ , lo que produce nuevamente un enriquecimiento final de  $10^9$ . Estos valores se pueden ajustar según sea necesario para optimizar la aplicación particular, pero los métodos de clasificación por niveles generalmente proporcionan la ventaja muy poderosa de poder enriquecer eventos extremadamente raros de poblaciones masivas incluso con una potencia de enriquecimiento finita.

Cuando se usan los métodos descritos para enriquecer con clasificación activada por PCR, pueden ser necesarias consideraciones especiales para garantizar que cada enriquecimiento tenga éxito y aumente la concentración del objetivo en la solución. Por ejemplo, si el objetivo es detectar un virus muy raro en una población grande, entonces en la primera ronda, se pueden generar cebadores de amplificación contra una secuencia específica en el genoma viral. Estas producirán muchas copias de esa región que se recogerán en la cámara clasificada. Si esta misma región se usa en rondas de clasificación adicionales, entonces los amplicones del producto de rondas anteriores se detectarán y clasificarán, lo que conducirá a un gran número de eventos positivos que erosionarán el poder del método para lograr grandes enriquecimientos. En este caso, los cebadores en rondas posteriores se pueden modificar para no detectar los productos de amplificación de rondas anteriores. Esto se puede lograr de varias maneras, que incluyen, por ejemplo, el uso de un enfoque de PCR anidada en el que los cebadores en las rondas posteriores se amplifican más allá de la región que se usa en las rondas tempranas, de modo que los productos de las rondas tempranas no se pueden amplificar en las rondas posteriores. Alternativamente, se pueden dirigirse regiones completamente distintas en rondas posteriores, tales como diferentes porciones del mismo gen o diferentes genes en su totalidad. Las combinaciones de estos métodos también se pueden usar para lograr muestras altamente enriquecidas.

Sujetos y/o muestras adecuadas

Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a muestras biológicas tomadas de una variedad de sujetos diferentes. En muchas modalidades, los sujetos son "mamíferos" o "mamíferos", donde estos términos se usan en un sentido amplio para describir organismos que están dentro de la clase mamíferos, que incluye los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, humanos, chimpancés y monos). En muchas modalidades, los sujetos son seres humanos. Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a sujetos humanos de ambos sexos y en cualquier etapa de desarrollo (es decir, recién nacidos, lactantes, juveniles, adolescentes, adultos), donde en ciertas modalidades el sujeto humano es un juvenil, adolescente o adulto. Si bien la presente invención puede aplicarse a un sujeto humano, debe entenderse que los métodos de la presente invención también pueden llevarse a cabo en otros sujetos animales (es decir, en "sujetos no humanos") tales como, pero sin limitarse a, aves, ratones, ratas, perros, gatos, ganado y caballos. En consecuencia, debe entenderse que cualquier sujeto que necesite una evaluación como se describe en la presente descripción es adecuado.

Además, los sujetos adecuados incluyen aquellos que tienen y aquellos que no se han diagnosticado con una afección, tal como el cáncer. Los sujetos adecuados incluyen aquellos que tienen y no tienen presentaciones clínicas de uno o más cánceres. En ciertos casos, un sujeto puede ser uno que puede estar en riesgo de desarrollar cáncer, debido a uno o más factores tales como antecedentes familiares, exposición química y/o ambiental, mutación genética (por ejemplo, mutación BRCA1 y/o BRCA2), hormonas, agentes infecciosos, exposición a la radiación, estilo de vida (por ejemplo, dieta y/o tabaquismo), presencia de una o más afecciones de la enfermedad y similares.

Como se describió más completamente anteriormente, puede obtenerse una variedad de diferentes tipos de muestras biológicas de tales sujetos. En ciertas modalidades, se extrae sangre total de un sujeto. Cuando se desea, la sangre total puede tratarse antes de practicar los métodos de la presente invención, tal como mediante centrifugación, fraccionamiento, purificación y similares. El volumen de la muestra de sangre total que se extrae de un sujeto puede ser de 100 ml o menos, por ejemplo, aproximadamente 100 ml o menos, aproximadamente 50 ml o menos, aproximadamente 30 ml o menos, aproximadamente 15 ml o menos, aproximadamente 10 ml o menos, aproximadamente 5 ml o menos, o aproximadamente 1 ml o menos.

Los métodos y dispositivos de la presente invención descritos en la presente descripción son compatibles tanto con células fijadas como con células vivas. En ciertas modalidades, los métodos y dispositivos de la presente invención se practican con células vivas. En otras modalidades, los métodos y dispositivos de la presente invención se practican con células fijadas. La fijación de una muestra celular permite que la muestra se lave para extraer moléculas pequeñas y lípidos que pueden interferir con el análisis posterior. Además, fijar y permeabilizar las células permite que las células se tiñan con anticuerpos para proteínas de superficie, así como también para proteínas intracelulares. Combinado con los métodos de amplificación de nucleótidos descritos en la presente descripción, dicha tinción puede usarse para lograr altos niveles de multiplexación porque los anticuerpos se localizan en la muestra de células, mientras que los productos de amplificación de nucleótidos están libres dentro de una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple monodispersa y/o GUV. Tal configuración permite que se usen colorantes del mismo color para anticuerpos y para los amplicones producidos por la amplificación de ácido nucleico. Puede usarse cualquier método adecuado para fijar las células, que incluye, entre otros, la fijación con formaldehído, metanol y/o acetona.

#### Detección de proteínas o ADN con sondas enlazadas a enzimas

Los métodos y dispositivos descritos en la presente descripción pueden usarse de diversas maneras para detectar y clasificar entidades en una solución heterogénea. Algunas modalidades descritas hasta ahora logran esto mediante el uso de la amplificación de ácido nucleico que se realiza en gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple, por ejemplo, emulsiones dobles y/o GUV, pero otros métodos también se habilitan como se describe en la presente descripción. Cuando los métodos y dispositivos descritos se usan para detectar ácidos nucleicos, esto se puede lograr, por ejemplo, encapsulando entidades de ácido nucleico individuales en las gotitas de emulsión simple monodispersas, las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV y luego someterlas a amplificación con cebadores específicos para los ácidos nucleicos objetivo, detectar los amplicones objetivo y luego clasificarlos en base a la amplificación. Sin embargo, pueden generarse otras señales detectables mediante el uso de otros medios, tal como por medio de la unión de los reactivos de afinidad a los objetivos. Por ejemplo, si el objetivo es un ácido nucleico, se pueden sintetizar sondas específicas para el objetivo que pueden hibridarse con el objetivo cuando están presentes; estas sondas pueden etiquetarse con colorantes o, en algunos casos, catalizadores, tales como catalizadores en base a enzimas o en base a no enzimas. Los objetivos, ahora unidos por sus sondas, pueden someterse a purificación para eliminar las sondas no unidas y, el material restante puede encapsularse en las gotitas y/o GUV mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

En el caso de una sonda enlazada al catalizador, el sustrato para el catalizador también puede incluirse en las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV. En este caso, las emulsiones simples monodispersas o las emulsiones múltiples que contienen los objetivos se unirán con las sondas y, por tanto, incluirán los catalizadores, lo que dará como resultado la catálisis del sustrato y la generación de un producto, que puede ser, por ejemplo, fluorescente. Con el tiempo, esto hará que las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV se rellenen con el producto fluorescente. Por el

contrario, las gotitas de emulsión simple monodispersas o las gotitas de emulsión múltiple y/o las GUV que están vacías o que contienen moléculas fuera del objetivo no contendrán catalizadores, lo que da como resultado ninguna generación de producto y, por lo tanto, ninguna señal detectable. El resultado de tal enfoque es una gran colección de gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV, algunas de las cuales son fluorescentes y otras tenues, lo que permite la recuperación de los objetivos al clasificar las gotitas de emulsión simple monodispersas fluorescentes o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV. Este procedimiento también se puede aplicar a otros tipos de objetivos, tales como biomoléculas, virus, células, etc., que se pueden unir con reactivos de afinidad, tales como anticuerpos. En este caso, los reactivos de afinidad se unirían, por ejemplo, con un catalizador, y el procedimiento se realizaría como se describió anteriormente para los objetivos de ácido nucleico unidos por sondas de ácido nucleico.

En ambos ejemplos, se puede implementar un lavado para eliminar los catalizadores no unidos, que de cualquier otra manera se encapsularían en gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV y producirían falsos positivos. Sin embargo, si no es conveniente o posible lavar para eliminar los catalizadores no unidos, entonces un enfoque alternativo sería usar un ensayo multiplexado en el que, por ejemplo, la localización de dos señales se usa para identificar un evento positivo. Por ejemplo, si el objetivo es detectar un objetivo de ácido nucleico que está en una solución, las sondas para dos secuencias diferentes en el objetivo se pueden sintetizar, cada una unida con un catalizador diferente que realiza, por ejemplo, una reacción que produce un producto fluorescente. En una modalidad, los productos fluorescentes para los distintos catalizadores pueden ser de diferentes colores, por ejemplo, uno que produce un producto fluorescente verde y el otro un producto fluorescente rojo. Las sondas se pueden unir a los objetivos, como es normal. En este caso, aunque habrá muchas sondas no unidas en solución, en la mayoría de los casos, las sondas correspondientes al primer tipo de catalizador no estarán unidas físicamente a la segunda sonda con un catalizador diferente a menos que ambas estén unidas al mismo ácido nucleico objetivo.

Las soluciones también se pueden diluir según sea necesario para realizar la hibridación a una alta concentración. La concentración puede entonces reducirse de manera que cualquier volumen de solución equivalente a una gotita dada contendrá solo una sonda o un objetivo con ambas sondas unidas. Esta solución puede encapsularse luego con los sustratos para los catalizadores, incubarse, detectarse y clasificarse. En esta modalidad, muchas gotitas de emulsión simple monodispersas o gotitas de emulsión múltiple y/o GUV contendrán solo un catalizador rojo o verde, pero otros contendrán tanto un rojo como un verde, los que se unen al objetivo. Esto permitirá que las gotitas que contienen el ácido nucleico objetivo se diferencien de las que solo contienen catalizadores al detectar las gotitas que emiten fluorescencia en ambas longitudes de onda, sin necesidad de lavar.

De nuevo, puede ocurrir un falso positivo cuando las sondas no unidas de ambos catalizadores se encuentran coencapsuladas en la misma gotita, pero esto puede mitigarse al diluir la solución lo suficiente para garantizar que este evento sea sustancialmente más raro que la presencia de los objetivos, de manera que las gotitas de emulsión simple monodispersas de doble positivo o las gotitas de emulsión múltiple y/o GUV identificadas pueden asociarse con mayor frecuencia con la presencia de un objetivo. Pueden aplicarse técnicas similares a otros tipos de objetivos como células o proteínas mediante el uso de diferentes tipos de reactivos de afinidad, tales como moléculas de unión como anticuerpos, que pueden unirse nuevamente con catalizadores de diferente reactividad, etc.

#### Detección del cáncer

Los métodos descritos en la presente descripción también implican métodos para detectar el cáncer. Dichos métodos pueden incluir la encapsulación en una gotita de emulsión simple monodispersa, una gotita de emulsión múltiple y/o los oligonucleótidos de GUV obtenidos a partir de una muestra biológica del sujeto, en donde al menos un oligonucleótido está presente en la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV; introducir los reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un componente de detección, y una pluralidad de cebadores de PCR en la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV e incubar la gotita de emulsión simple monodispersa, la gotita de emulsión múltiple y/o GUV en condiciones que permiten la amplificación por PCR para producir productos de amplificación por PCR, en donde la pluralidad de cebadores de PCR incluye uno o más cebadores que se hibridan con uno o más oncogenes; y detectar la presencia o ausencia de los productos de amplificación por PCR mediante la detección del componente de detección, en donde la detección del componente de detección indica la presencia de los productos de amplificación por PCR.

La detección de uno o más productos de amplificación por PCR correspondientes a uno o más oncogenes puede ser indicativa de que el sujeto tiene cáncer. Los oncogenes específicos que se añaden a la gotita pueden variar. En ciertos casos, el(los) oncogén(es) puede(n) ser específicos para un tipo particular de cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon y similares.

Además, en la práctica de los métodos de la presente invención, la muestra biológica a partir de la cual se detectarán los componentes puede variar, y puede basarse al menos en parte en el tipo particular de cáncer para el que se busca la detección. Por ejemplo, el tejido mamario puede usarse como la muestra biológica en ciertos casos, si se desea determinar si el sujeto tiene cáncer de mama y similares. En la práctica de los métodos para detectar el cáncer, se pueden realizar variantes de las etapas generales descritas en la presente descripción, como el número

de cebadores que se pueden añadir, la forma en que se añaden los reactivos, los sujetos adecuados y similares. El método anterior también puede realizarse mediante el uso de gotitas de emulsión simple en lugar de gotitas de emulsión múltiple.

## 5 Ejemplos

Se exponen los siguientes ejemplos. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso promedio en peso molecular, la temperatura es en grados Celsius y la presión es igual o cercana a la atmosférica. Pueden usarse las abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, par de bases; kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o seg, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, par de bases; nt, nucleótido(s); i.m., intramuscular(mente); i.p., intraperitoneal(mente); s.c., subcutánea(mente); y similares.

## 15 Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se aplican generalmente a los resultados presentados en los Ejemplos descritos en la presente descripción, excepto cuando se indique de cualquier otra manera.

## 20 Preparación de partículas de hidrogeles monodispersas

Las partículas de poli(acrilamida) (PAA) monodispersas se generaron mediante el uso de 6,2 % de acrilamida (Sigma-Aldrich), 0,18 % de N,N'-metileno-bisacrilamida (Sigma-Aldrich) y 0,3 % de persulfato de amonio (Sigma-Aldrich). Las partículas de polietilenglicol (PEG) se generaron mediante el uso de 14 % (p/v) de PEGSH de 8 brazos (Creative PEGworks) en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM y PEGDA(6 kDa) (Creative PEGworks) en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. Las partículas de agarosa se generaron mediante el uso de agarosa de baja temperatura de fusión al 1 % (Sigma-Aldrich). La suspensión de agarosa se calentó con un calentador de espacio durante la emulsificación para evitar la solidificación. Se inyectaron soluciones de agarosa y PEG en un dispositivo generador de gotitas (Figura 1) con aceite (HFE-7500 aceite fluorado suplementado con 5 % (p/p) de Krytox 157 FSH desprotonado) mediante el uso de bombas de jeringa (New Era, NE-501). La solución de PAA se inyectó en el dispositivo de generación de gotitas con el aceite fluorado suplementado con 1 % de tetrametiletilendiamina (TEMED). La solución de hidrogel y el aceite se cargaron en jeringas de 1 ml separadas (BD) y se inyectaron a 300 y 500 µl, respectivamente, en el dispositivo de generación de gotitas mediante el uso de bombas de jeringa, controladas con una secuencia de comandos de Python, ver el ejemplo en el sitio web que se ubica al colocar "https://" delante de "github.com/AbateLab/Pump-Control-Program". Las gotitas de PAA y PEG se recolectaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente para la gelificación. Las gotitas de agarosa se incubaron en hielo para la gelificación. Después de la gelificación, las gotitas gelificadas se transfirieron a un portador acuoso al desestabilizarlas en aceite con la adición de un volumen igual de perfluoro-1-octanol al 20 % (v/v) en HFE-7500. Las partículas se lavaron dos veces con hexano que contenía un 2 % de Span-80 (Sigma-Aldrich) para eliminar el aceite residual. Después del lavado con hexano, las partículas se lavaron con agua estéril hasta que se eliminó el aceite. Las gotitas se visualizaron mediante el uso del Sistema de obtención de imágenes de células EVOS (Thermo Fisher). Las imágenes se tomaron bajo un objetivo de 4x y 10x mediante el uso de fuentes de luz LED EVOS FITC.

## 45 Fabricación del dispositivo

El dispositivo de polidimetilsiloxano (PDMS) usado para hacer partículas de hidrogel monodispersas se fabricó al verter PDMS sin curar (relación de polímero a reticulante 10:1) sobre una capa de fotopolímero con patrón fotolitográfico (SU-8 3025, MicroChem) sobre una oblea de silicio. El dispositivo se curó durante 1 hora en un horno a 80 °C, se cortó con un bisturí y los puertos de entrada se perforaron mediante el uso de un perforador de biopsia de 0,75 mm (World Precision Instruments, #504529). El dispositivo se unió a un portaobjetos de vidrio mediante el uso de plasma de oxígeno y la superficie interna de los canales se trataron con Aquapel (PPG Industries) para volverlos hidrófobos. El dispositivo sellado se horneó a 80 °C durante 10 minutos.

## 55 dPCR

Las partículas de PAA monodispersas o las partículas de PAA comerciales (Bio-Rad) se lavaron con tritón-X100 al 0,5 % (Sigma-Aldrich) en agua estéril. Se mezclaron 33 µl de partículas de PAA lavadas con 17 µl de reactivos de PCR para hacer una reacción total de 50 µl. La mezcla de 50 µl incluyó tampón de reacción LongAmp Taq 1x (NEB), 2 unidades de ADN polimerasa LongAmp Taq (NEB), 0,6 µM de cebadores directos e inversos (IDT), 0,6 µM de TaqMan<sup>®</sup> sonda (IDT), 300 µM de dNTP (Fisher Scientific) y una cantidad variable de levadura en brote *Saccharomyces cerevisiae* ADN genómico (Milipore). Para la ddPCR multiplexada, se incluyeron 0,6 µM adicionales de cebadores directos e inversos y sondas TaqMan<sup>®</sup> para el ADN del virus Lambda. La secuencia de los cebadores y sondas que se usaron fue - DIR de levadura: 5' - GCAGACCAGACCAGAACAAA - 3' (ID de SEC Núm: 1), INV de levadura: 5' - ACACGTATGTCTAGCCGAATAAC - 3' (ID de SEC Núm: 2), Sonda de levadura: 5' - /56-FAM/ATATGTTGT/ZEN/TCACCTCGCGCTGGG/3IABkFQ/ - 3' (ID de SEC Núm: 3), DIR de Lambda: 5' - GTGGCATTGCAGCAGATTAAG - 3' (ID de SEC Núm: 4), INV de Lambda: 5' - GGCAGTGAAGCCCAGATATT - 3'

(ID de SEC Núm: 5), sonda de Lambda: 5' - /Cy5/TATCCGTCAGGCAATCGACCGT TG/3IAbrQSp/ - 3' (ID de SEC Núm: 6). La mezcla se incubó durante 15 minutos para permitir que el reactivo de PCR se difunda en las partículas y se centrifugó durante 1 minuto a 6000 g. Se eliminó el exceso de fase acuosa con una micropipeta. Se mezclaron bien 20 µl de partículas y 25 µl de aceite HFE-7500 suplementado con 2 % (p/p) de surfactante de copolímero anfifílico PEG-PFPE (008-Fluoro-surfactante, Ran Technologies) al golpear en un tubo Eppendorf de 1,7 ml. La mezcla se agitó a 2300 rpm durante 30 s con un agitador vorticial (VWR). Después de transferir la emulsión a los tubos de PCR, el aceite debajo de las gotitas flotantes se eliminó con una pipeta y se reemplazó con aceite FC-40 (Sigma-Aldrich) que contiene un 5 % (p/p) de surfactante de copolímero anfifílico PEG-PFPE. Esta combinación de aceite/surfactante produjo una mayor termoestabilidad durante la PCR. La emulsión se transfirió a un termociclador T100 (Bio-Rad) y se sometió al siguiente programa: 94 °C durante 30 s, seguido de 45 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 60 s y 65 °C durante 50 s, seguido de una extensión final de 10 min a 65 °C y mantenido a 12 °C. Las gotitas se visualizaron mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de células EVOS (ThermoFisher Scientific) bajo un objetivo 10x y 20x con fuentes de luz LED EVOS GFP y FITC.

#### 15 Cultivo celular

Una cepa de levadura brotante *Saccharomyces cerevisiae* que expresa la proteína fluorescente amarilla (YSP) se cultivó a 30 °C en un medio rico estándar (YPD) y la densidad celular se midió mediante el uso de NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Las partículas de PAA se lavaron con Tritón al 0,5 % en YPD y se centrifugaron para eliminar el exceso de acuoso. Se preparó una suspensión de levadura diluida para lograr la ocupación de células distribuida de Poisson por gotita. Se mezclaron bien 1 µl de suspensión de levadura, 20 µl de partículas y 25 µl de aceite HFE-7500 con un 2 % (p/p) de surfactante de copolímero anfifílico PEG-PFPE al golpear en un tubo Eppendorf de 1,7 ml. La mezcla se agitó vorticialmente a 2300 rpm durante 30 segundos. Se perforaron agujeros en la tapa del tubo para el intercambio de oxígeno para las células de levadura y se añadió 1 ml de medio YPD. Las células se incubaron a 30 °C durante 10 h y se obtuvieron imágenes mediante el uso del sistema de obtención de imágenes de células EVOS bajo un objetivo de 20x con fuentes de luz LED RFP y FITC de EVOS.

#### Escalado de la generación de emulsiones monodispersas

30 Las emulsiones se generaron al resuspender las partículas de PAA monodispersas en 0,3 % de IGEPAL y al añadir 20 µl de las partículas de PAA resuspendidas a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La mezcla combinada se agitó vorticialmente a 2900 rpm durante 1 min, o alternativamente, se pipeteó 30 veces, para producir 96 emulsiones monodispersas.

#### 35 Generación de emulsión doble (liposoma) a través de PTE

40 Las emulsiones simples se formaron mediante agitación vorticial a velocidad 10 en un agitador vorticial de mesa (de VWR) durante 1 min con perlas de poli(acrilamida) en una fase acuosa interna de TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, EDTA 10 mM y TritonX100 al 0,01 %. Los liposomas se formaron mediante la adición de una solución acuosa externa de TrisHCl 5 mM pH 8 y TritonX100 al 0,01 %, seguido de agitación vorticial a velocidad 7 en un agitador vorticial de mesa (de VWR) durante 20 s. Los liposomas, un tipo de emulsión doble, se formaron con lípido fluorescente adicional en la fase oleosa de una mezcla de escualano que contiene 5 % (p/v) de monooleato de glicerilo y 5 mg/ml de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

#### 45 scRNA-seq de alto rendimiento a través de PTE

50 La nueva tecnología expandió la capacidad de scRNA-seq al aumentar el rendimiento y simplificar el protocolo descrito en Chemgene (ver, por ejemplo, el sitio web de Chemgenes). Las perlas de Drop-seq se encapsularon en hidrogel de poli(acrilamida) BAC mediante el uso de bis(acrililoil)cistamina como un reticulante para la síntesis de perlas de poli(acrilamida). Las células, la proteinasa K y el tampón de hibridación se mezclaron junto con las perlas de poli(acrilamida) BAC a 4 °C. Se añadió aceite presaturado con 2-mercaptoetanol. La mezcla se agitó vorticialmente para la emulsificación. Durante la disociación del hidrogel de gotitas, 2-Me se difunde en la gotita y conduce a la disociación de la partícula de poli(acrilamida) de BAC y la liberación de las perlas de Drop-seq. La lisis celular se realizó mediante la incubación con proteinasa K a 55 °C durante 15 minutos. El ARN se capturó en las perlas de Drop-seq. Se recuperaron las perlas de Drop-seq. Se realizó la secuenciación de transcriptasa inversa y el análisis de datos.

#### Experimento de mezcla de especies

60 Las células 3T3 de ratón y las células HEK293 humanas se lavaron, resuspendieron y mezclaron en una relación 1:1 y se almacenaron en tampón PBS. Las partículas de poli(acrilamida) con perlas de Drop-seq se sintetizaron mediante el uso del mismo protocolo para la síntesis de partículas de poli(acrilamida) con perlas de Drop-seq añadidas a la solución como se describe con mayor detalle más abajo. Las partículas sintetizadas eran de 125 µm de diámetro.

#### 65 Síntesis de perlas de hidrogeles

La mezcla de hidrogeles de BAC usada para la síntesis de partículas de hidrogeles fue la siguiente: Tris pH 7,5 10mM, EDTA 1mM, NaCl 15mM, acrilamida 6,2 %, BAC (bisacrilcistamina (BAC) disuelto en etanol al 2 %) 0,54 %, persulfato de amonio 0,3 % y aceite que comprende HFE 2 % Weitz con 1 % TEMED.

5 Se usó un dispositivo estándar de Drop-seq para la síntesis de hidrogel (canal de entrada de células de bloque con una pieza de soldadura de plata). Las perlas de Drop-seq se resuspendieron a una concentración de 100/μl con el objetivo de alcanzar 1 perla por cada 10 gotitas en la mezcla de síntesis del hidrogel BAC. El régimen de flujo fue de 2000 μl/h de acuoso y 3200 μl/h de aceite. Después de la generación de gotitas, las gotitas se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la desemulsificación. Se siguió el mismo protocolo de lavado con el tampón TBEST y se almacenó en el tampón TBEST a 4 °C.

10 Se verificó el tamaño de las perlas (generalmente aproximadamente del tamaño de la gotita) y la eficiencia de carga de Drop-seq. Para aumentar la porción de perlas con Drop-seq cargado, se podría usar Ficoll al 40 % para resuspender el hidrogel seguido de centrifugación (500 g durante 2 minutos). Esta etapa se repitió según fuera necesario para lograr una mejor eficiencia de carga.

Formación instantánea de la emulsión

20 Se prepararon suspensiones de células individuales y se diluyeron a la concentración adecuada. Las perlas de hidrogeles de BAC se lavaron con tampón PTE-seq (tampón de lisis Drop-seq sin sarcosilo, sin DTT, con NaCl 500 mM) para intercambiar completamente el tampón.

25 Las perlas de hidrogel se empaquetaron estrechamente mediante centrifugación y se usó la Proteinasa K (de NEB) a 20X. La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos para equilibrarla. El bME-aceite se preparó añadiendo bME al 5 % de Weitz HFE aceite (0,2 %). La mezcla se agitó vorticialmente durante 1 min a la velocidad máxima, se mezcló bien y se almacenó en hielo.

30 La concentración de perlas empaquetadas estrechamente es de aproximadamente 300 perlas de hidrogel por μl. El número de células necesarias para la emulsión de agitación se calculó en base al número de perlas de hidrogel. La entrada de células se dirigió a ser el 10 % del número de perlas de hidrogel. Las células se añadieron a las perlas de hidrogeles compactadas y se mezclaron suavemente. Se añadió al menos 2 volúmenes del volumen de las perlas de hidrogel de bME-aceite seguido de agitación vorticial a velocidad 7 durante 30 s. La calidad de la emulsión se examinó mediante el uso de microscopía y las emulsiones se agitaron vorticialmente más si era necesario. La disociación del hidrogel se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos y las células se lisaron a 55 °C durante 20 minutos y luego se pusieron en hielo durante 20 minutos para la captura de ARN.

Protocolo de Drop-seq

40 Se añadieron 30 ml de 6X SSC con 50 μl adicionales de sarkosilo al 10 % sobre la emulsión y la emulsión se rompió con 1 ml de PFO. Los protocolos de Drop-seq para la limpieza de las perlas de Drop-seq y la reacción de RT y el análisis de secuenciación se siguieron de acuerdo con los protocolos enumerados en el sitio web que se ubica al colocar "http://" in front of "mccarrollab.com/dropseq".

45 Formación de microgel núcleo-cubierta a través de PTE y análisis dirigido

Las perlas de poliacrilamida se conjugaron con oligonucleótidos, que se usaron como cebadores durante la PCR. Las perlas se sumergieron en el reactivo de PCR. Se eliminó el exceso de solución acuosa. Se añadió agarosa, Tritón y células, seguido de aceite. La PTE se realizó como se describe en la presente descripción. El aceite se transfirió y se realizó un termociclado. Las emulsiones se rompieron y lavaron. Se usó FACS y se recolectaron perlas positivas antes de recuperar el genoma.

55 Las perlas de poliacrilamida se modificaron con oligo (MH075, 2 μM final). Se capturaron *B. subtilis* (cepa 168) y se usaron MH 100 y 101 para PCR. La fracción con gotitas positivas de fluorescencia correspondió con concentración de la plantilla de *B. subtilis* (cepa 168). Las gotitas positivas a fluorescencia se clasificaron mediante el uso del FACSAria II de BD y se observaron bajo un microscopio. Las perlas clasificadas eran fluorescentes y estaban rodeadas por una cubierta de agarosa después de la FACS. Se realizó la qPCR para ver la recuperación del genoma en la cubierta de agarosa. Se usaron cuatro conjuntos de cebadores en diferentes loci. Las señales se observaron después de 35 ciclos y el ADN genómico se encapsuló en una cubierta de agarosa.

60 MH075: /5Acryd//iSpPC/ATATTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC (ID de SEC Núm: 7)  
MH100:  
CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCACGAACTGGACAAGAA (ID de SEC Núm: 8)  
MH101: /56-FAM/ATGGAGCGTTCAAGGTTCTCAA (ID de SEC Núm: 9)

65 Ejemplo 1: Generación de emulsiones simples monodispersas mediante el uso de la emulsificación con plantilla de partículas (PTE)

## Resultados

Se usaron partículas de hidrogel que eran más del 95 % acuoso para la formación de plantillas, de modo que la gotita final era principalmente acuosa, como se necesitaba para realizar reacciones bioquímicas en las gotitas resultantes. Las partículas se añadieron a la solución para encapsularse, con aceite y surfactante, y la mezcla se agitó vorticialmente (Figura 2, Paneles A-C y Figura 3, Paneles A-E). Las partículas de hidrogel eran permeables a las moléculas con diámetros hidráulicos menores que el tamaño de los poros, como las moléculas pequeñas, pero eran impermeables a las moléculas grandes, tales como el ADN genómico, que permanecieron dentro de la capa fina de la solución acuosa que rodea las partículas en las gotitas. Durante la agitación vorticial, las partículas se dispersaron en gotitas continuamente más pequeñas hasta que cada gotita contenía solo una partícula y una fina cubierta de solución acuosa, como se ilustra en (Figura 3, Panel E). Más allá de esto, se suprimió la ruptura adicional de las gotitas porque requería fracturar las partículas sólidas. El resultado fue una emulsión en la que las gotitas eran de un tamaño similar a las partículas monodispersas originales y, por tanto, ellas mismas monodispersas.

La PTE encapsuló cualquier reactivo presente en la solución inicial en las gotitas, lo que les permite realizar reacciones compartimentadas similares a las que se logran normalmente con microfluídica. Los compuestos más pequeños que el tamaño de los poros del hidrogel se absorbieron antes de la emulsificación y, por tanto, estaban presentes en la gotita final que contenía el hidrogel. Los compuestos más grandes terminaron en la capa fina de la solución acuosa que rodea el hidrogel, como se ilustra en la Figura 3, Panel E. Se usó la agitación vorticial para PTE debido a su reproducibilidad, aunque otras técnicas de agitación fueron compatibles, como el pipeteo y golpear el tubo.

## Ejemplo 2: Optimización de la emulsificación con plantilla de partículas

## Resultados

Mientras que las emulsiones preparadas mediante agitación vorticial en ausencia de partículas de plantilla se prepararon fácilmente, tales emulsiones fueron polidispersas y de valor limitado para la biología de precisión (Figura 4, Panel A). Como se muestra en la Figura 4, el Panel A (izquierda), las emulsiones agitadas vorticialmente sin partículas generaron gotitas polidispersas que tienen una distribución de tamaño variada, de 8-218  $\mu\text{m}$  de diámetro ( $n=561$ ) y el 4,3 % de las gotitas son de 35-40  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, las emulsiones microfluídicas requerían dispositivos y habilidades especializadas, pero mostraron una monodispersidad superior y fueron muy valiosas (Figura 4, Panel A). Como se muestra en la Figura 4, el Panel A (derecha), la emulsión microfluídica generó gotitas monodispersas: el 95,7 % de las gotitas son de 35-38  $\mu\text{m}$  de diámetro ( $n=816$ ). Un método mejorado para la encapsulación de muestras combinaría, por tanto, la simplicidad de la agitación vorticial con la calidad de la microfluídica.

La PTE logró esto al explotar la rigidez de las partículas para resistir la ruptura de las gotitas por debajo del tamaño de la partícula, incluso con agitación vorticial. Como se muestra en la Figura 4, Panel C, la PTE generó un tamaño similar a las partículas de PAA originales, el 58,2 % de las gotitas son de 35-40  $\mu\text{m}$  ( $n=1421$ ) de diámetro. El tiempo para alcanzar el tamaño final de la gotita y la monodispersión de la emulsión resultante dependieron de las propiedades del fluido y de las partículas. Por ejemplo, las propiedades de las partículas como el tamaño y la autoafinidad, y las propiedades de la solución como la viscosidad y la tensión interfacial, afectaron el proceso de formación de plantillas de gotitas. Para caracterizar el impacto de estos parámetros en la calidad de la emulsión, se realizó la PTE con diferentes materiales de hidrogel y tensiones interfaciales de la solución (Figura 4, Panel B). El tamaño de partícula, el aceite portador y el surfactante soluble en aceite, se fijaron ya que estas propiedades generalmente se dictaron por las necesidades de las reacciones biológicas y son menos flexibles.

Para modular la tensión interfacial, se añadieron surfactantes solubles en acuoso a la fase de gotitas, que es compatible con la mayoría de las reacciones bioquímicas. Cuando se omitió el surfactante de fase acuosa, las gotitas agitadas vorticialmente fueron polidispersas para todos los tipos de hidrogel (Figura 4, Panel B); sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, esto puede deberse a la afinidad entre partículas y la alta tensión interfacial que evita la ruptura de las gotitas grandes, no uniformes y multinúcleos. El aumento de la agitación vorticial hasta 20 minutos no cambió apreciablemente la calidad de la emulsión. Se observaron emulsiones multinúcleos y la emulsión fue polidispersa (Figura 5, Panel A). Por el contrario, cuando se incluyeron surfactantes en la fase acuosa, la afinidad de las partículas y la tensión interfacial se redujeron; se generaron gotitas monodispersas de un solo núcleo con 30 segundos de agitación vorticial (Figura 4, Panel B), las duraciones de agitación vorticial más largas no alteraron sustancialmente la apariencia de la emulsión resultante (Figura 6, Paneles A-D). Se usaron partículas de PAA con 0,5 % de Tritón en aceite HFE con 2 % de fluorosurfactante y se agitaron vorticialmente durante 5 segundos (Figura 6, Panel A), 15 segundos (Figura 6, Panel B), 1 minuto (Figura 6, Panel C) y 2 minutos (Figura 6, Panel D). Los histogramas mostraron la distribución del tamaño de las gotitas con diferentes tiempos de agitación vorticial.

Como se muestra en la Figura 4, el Panel B, se usaron partículas de PAA, PEG o agarosa como plantillas y se emulsionaron con diferentes surfactantes. Se generaron gotitas monodispersas con un surfactante de fase acuosa (triton e IGEPAL). De las partículas probadas, las gotitas formadas a partir de partículas de poliacrilamida (PAA) y

metacrilato de polietilenglicol (PEG) produjeron las emulsiones más uniformes (Figura 4, Panel B). Las emulsiones de partículas de agarosa eran menos uniformes. Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, esto puede deberse a su autoafinidad. También se usaron otros surfactantes de fase acuosa, aunque los requisitos de los parámetros de la agitación vorticial y la calidad de la emulsión difirieron (Figura 5, Paneles B-E).

La PTE fue escalable, porque el tiempo requerido para generar una emulsión no dependió del volumen de la emulsión (Figura 7, Paneles A y B). La PTE permitió la producción rápida y fácil de emulsiones monodispersas de escalas de microlitros a mililitros. Las muestras comprendieron partículas de PAA con 0,5 % de Tritón suspendido en 1,25 volúmenes de aceite HFE con 2 % (20  $\mu$ l) o 5 % (200  $\mu$ l y 2 ml) de surfactante (Figura 7, Panel A). Todas las emulsiones, independientemente del volumen total, se agitaron vorticialmente durante 30 segundos para generar las gotitas. Los histogramas de la distribución del tamaño de las gotitas para las emulsiones de 200  $\mu$ l y 2 ml demostraron una monodispersidad equivalente (Figura 7, Panel B).

Estos resultados difirieron de la emulsificación microfluídica convencional donde el tiempo de generación escaló con el volumen. Se compararon los tiempos de generación de gotitas de PTE y microfluídica para una tasa de generación de gotitas típica de 1 kHz. Con la PTE, generar 20  $\mu$ l de emulsión requirió el mismo tiempo que generar 2 ml de emulsión (Figura 7, Panel C, arriba), mientras que generar 2 ml de emulsión requirió aproximadamente 11 horas (Figura 7, Panel C, abajo) mediante el uso de microfluídica. La escalabilidad de PTE fue una ventaja para las aplicaciones que requieren la emulsificación de muestras de gran volumen. Además, debido a que la generación de la emulsión se produjo en el depósito de la muestra y no requirió el transporte de las muestras hacia y desde un instrumento microfluídico, la PTE también fue escalable para emulsionar grandes cantidades de muestras.

Se usaron hidrogeles que tienen un diámetro de aproximadamente 30  $\mu$ m a aproximadamente 80  $\mu$ m con resultados similares, con datos para hidrogeles de 50  $\mu$ m mostrados, pero otros tipos de partículas pueden ser compatibles con el método, que incluye diferentes tamaños, composiciones de hidrogeles y porosidades. Si bien se usó aceite fluorado y surfactante para la fase portadora, otras formulaciones pueden ser compatibles, incluidos aceites de silicona y de hidrocarburos y surfactantes. También se podrían usar otras fases polares, siempre que formen emulsiones estables, lo que puede ser valioso para generar estructuras núcleo-cubierta. Estas propiedades pueden proporcionar la flexibilidad necesaria para extender la PTE a otras áreas, tal como la encapsulación rentable y escalable de compuestos en emulsiones dobles.

Además de las gotitas monodispersas deseadas con un tamaño similar a las partículas de plantilla, la PTE generó "gotitas satélites" diminutas que no contenían partículas. El número de gotitas satélite dependió de la cantidad de exceso de solución acuosa que rodea las partículas, la tensión interfacial de la emulsión y el tiempo y la potencia de la agitación vorticial. Para reducir su número, el exceso de solución acuosa se puede eliminar de la mezcla de muestra de partículas antes de la agitación vorticial. Sin embargo, aunque estéticamente desagradables, las gotitas de satélite contribuyeron de manera insignificante a las reacciones biológicas realizadas en las emulsiones, porque generalmente comprendieron una fracción relativamente pequeña del volumen total de la muestra (< 3 %).

El volumen absorbido podría preverse después de considerar la potencia del agitador vorticial, la tensión superficial y el tamaño de partícula, etc. La agitación vorticial generó una distribución de velocidades en la muestra, y cada gotita experimentó una muestra aleatoria de estas velocidades durante la emulsificación. La agitación vorticial fue un método razonablemente controlado para agitar fluidos y, por tanto, fue posible identificar una potencia que produjo predominantemente gotitas de un solo núcleo con volúmenes de engullimiento uniformes, como se muestra en la presente descripción.

Un desafío común en la microfluídica de gotitas fue la necesidad de encapsular eficientemente entidades discretas, como perlas y células. Las técnicas microfluídicas normalmente encapsularon estas entidades aleatoriamente, lo que dio como resultado una carga de Poisson ineficiente en la que solo una pequeña fracción de las gotitas se cargó adecuadamente. Una propiedad única y valiosa de la PTE fue que cada gotita del tamaño apropiado contenía una partícula de plantilla (Figura 4, Panel B). Si estas partículas fueran un componente esencial de la reacción, la mayoría de las gotitas contenían lo que se necesitaba. Sin embargo, otros componentes, tales como células, perlas y moléculas de ADN, se cargaron aleatoriamente. De hecho, la encapsulación eficiente de hidrogeles fue una etapa clave en las tecnologías de secuenciación de células únicas recientemente reportadas y explotadas en instrumentos comerciales (documento de Zhu Z. Yang CJ (2017), Hydrogel Droplet Microfluidics for High-Throughput Single Molecule/Cell Analysis, Acc Chem Res 50(1):22-31).

Ejemplo 3: PTE permitió una cuantificación precisa de ADN con PCR de gotitas digital (ddPCR)

Resultados

PTE permitió una ddPCR fácil y sin microfluídica. Para ilustrar esto, se usó PTE para encapsular varias muestras de ADN a diferentes concentraciones de una molécula objetivo (Figura 8, Panel A). Al igual que en la ddPCR microfluídica, el aumento de la concentración del objetivo aumentó el número de gotitas fluorescentes. Para determinar si esta estimación de concentración permitida, se siguió el análisis ddPCR convencional y la fluorescencia de las gotitas se cuantificó mediante el uso de imágenes, al trazar los resultados como fluorescencia

frente a diámetro (Figura 8, Panel B). Tres poblaciones de gotitas eran visibles, con baja fluorescencia y diámetro pequeño (gotitas satélite), con el diámetro esperado de 30-40  $\mu\text{m}$  y baja fluorescencia (PCR-negativo) y un intervalo de tamaño similar pero alta fluorescencia (PCR-positivo). Las gotitas satélite se ignoraron y la concentración objetivo para las gotitas del modelo de tamaño correcto se modeló a través de estadísticas de Poisson,  $\lambda = -\ln(1 - p)$ , donde  $\lambda$  es el número de copias de la plantilla por gotita y  $p$  es la fracción positiva.

La concentración medida siguió la escala esperada en el intervalo probado de tres décadas, lo que demuestra que la ddPCR basada en PTE (Figura 8, Panel C) rindió como la ddPCR basada en microfluídica (Figura 9). El método PTE utilizó partículas de hidrogel que sirvieron de plantilla para las gotitas, que se fabricaron mediante el uso de microfluídica. Incluso con partículas obtenidas microfluídicamente, la PTE representó una simplificación sustancial para la ddPCR, ya que un gran lote de partículas sintetizadas podría usarse para muchos análisis.

Las microesferas de hidrogel con una variedad de composiciones, tamaños y uniformidad se podrían adquirir de proveedores comerciales. Estas esferas se vendieron generalmente como componentes para columnas de purificación y, por tanto, controladas por la calidad y libres de contaminantes que pudieran interferir con las reacciones de las gotitas. Para mostrar que la PTE podría realizarse con partículas de plantilla monodispersas comerciales (Figuras 10 A y 10B), se compraron esferas de PAA monodispersas que varían de 45-90  $\mu\text{m}$  de diámetro; esta distribución de tamaño fue mayor que para partículas hechas con microfluídica, típicamente por debajo del 5 %, pero fue aceptable para la mayoría de las aplicaciones, que incluyen ddPCR. Para demostrar esto, las partículas se usaron para realizar ddPCR con PTE, y se observaron propiedades de fluorescencia de gotitas similares (Figura 10B, Panel A). La distribución de diámetro más grande dio como resultado una dispersión más amplia en el gráfico, tanto en tamaño como en fluorescencia, pero las poblaciones positivas y negativas de PCR fueron, sin embargo, discernibles (Figura 10B, Panel B). Se varió la concentración objetivo y se realizó un análisis estándar de ddPCR, logrando mediciones precisas en el mismo intervalo (Figura 10B, Panel C). Cuando la variabilidad en el tamaño de las gotitas se incluyó mediante el uso de múltiples distribuciones de Poisson ponderadas por volumen de gotitas, los factores de corrección para los números de copia estimados fueron pequeños, que varían del 0,1 % (para la concentración más baja) hasta el 4,5 % (para la concentración más alta).

Se usaron partículas hechas por microfluídica para caracterizar la PTE, ya que eran monodispersas y por lo tanto permitieron una medición precisa de la variación del volumen de las gotitas. Sin embargo, como se muestra en la presente descripción, las perlas disponibles comercialmente que eran relativamente uniformes fueron suficientes para muchas aplicaciones.

#### Ejemplo 4: PTE-ddPCR multiplexada

##### Resultados

Para demostrar que la ddPCR basada en PTE podría multiplexarse, se analizó el ADN genómico de una mezcla de virus Lambda y *S. cerevisiae*. Se usaron sondas TaqMan dirigidas a los genomas del virus Lambda (rojo) o de la levadura (verde). El ADN de ambos organismos se mezcló y la muestra se emulsionó con PTE. Muchas gotitas eran de color rojo puro o verde, lo que indica que contenían ADN genómico de Lambda o de levadura, respectivamente (Figura 11, Panel A). Sin embargo, en casos raros, una gotita contenía uno de cada objetivo y, por tanto, era doble positiva, apareciendo amarillo (Figura 11, Panel A, fusionado). Dado que estos ácidos nucleicos no se asociaron físicamente, la posibilidad de un doble positivo podría describirse mediante un proceso de doble encapsulación de Poisson. Las desviaciones de las estadísticas de Poisson por tanto representan asociaciones de secuencias.

#### Ejemplo 5: PTE usado en células de levadura

##### Resultados

La PTE se usó para encapsular células individuales de levadura mediante el uso de esferas de hidrogel para la generación de gotitas de plantilla. Las partículas de plantilla monodispersas de PAA se añadieron a una suspensión de levadura y la mezcla se emulsificó mediante agitación vorticial. Las células se suspendieron a una baja concentración de manera que la mayoría de las gotitas estaban vacías, pero una pequeña fracción contenía células individuales, al igual que con la encapsulación de células microfluídica. Debido a que la levadura a escala de micras no pudo difundirse en los poros nanométricos de las partículas de plantilla monodispersas, terminaron en la cubierta acuosa cerca de la periferia de las gotitas (Figura 11, Panel B). El número de levaduras encapsuladas por gotita podría modularse por la concentración de células en la muestra.

Los entornos de gotitas fueron compatibles con el crecimiento de la levadura. Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, esto puede deberse a que la PAA es un hidrogel biológicamente inerte que comprende más del 95 % de acuoso. En consecuencia, cuando las células de levadura encapsuladas se incubaron durante 10 horas, crecieron en microcolonias clonales (Figura 11, Panel B).

#### Ejemplo 6: RNAseq (Profética)

Las perlas de hidrogel de poliacrilamida se sintetizan primero con más de  $10^9$  oligonucleótidos monocatenarios

unidos a él, seguido de lavado y resuspensión. El procedimiento de fabricación de perlas se realiza con un método de "dividir y agrupar" para la síntesis de códigos de barras en las perlas. Las perlas de código de barras terminadas contienen ADN monocatenario codificado de manera única con otros componentes que incluyen la cola de polT y una secuencia promotora T7. Estos ADN monocatenarios se pueden liberar de las perlas de hidrogel tras la exposición a UV. Las perlas, las células y la mezcla de RT se combinan y se realiza PETE como se describe en la presente descripción para encapsular una célula individual en gotitas con la mezcla de reacción de transcripción inversa. La emulsión se expone a luz UV seguido de calentamiento hasta 50 °C para realizar la reacción de transcripción inversa. Durante el proceso, el ADN monocatenario en las perlas se libera para funcionar como cebadores de RT y el ARN de la célula se libera para funcionar como plantillas. La emulsión se rompe y se recupera el ADNc seguido de la transcripción estándar in vitro y la preparación de la biblioteca para la secuenciación de próxima generación para recopilar los datos del análisis del perfil de expresión génica de una célula individual.

Ejemplo 7: Escalado de la generación de emulsiones monodispersas

Resultados

Las partículas de poliacrilamida monodispersas se sintetizaron primero de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción, y luego se lavaron con IGEPAL. Las partículas monodispersas se añadieron a una placa de 96 pocillos. La PTE se realizó de acuerdo con la descripción para crear 96 emulsiones uniformes de células individuales simultáneamente (Figura 12).

Ejemplo 8: Generación de emulsiones dobles mediante el uso de la emulsificación con plantilla de partículas (PTE)

Resultados

La tecnología descrita en la presente descripción permitió la producción de liposomas, un tipo de emulsión doble, con un control preciso. Como se muestra en la Figura 13, Panel A, las partículas de poliacrilamida se proporcionaron en una fase acuosa interna (TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, EDTA 10 mM y TritonX100 al 0,01 %) se usaron para generar emulsiones dobles (o liposomas) a través de PTE. Como se muestra en la Figura 13, Panel B, las emulsiones simples se formaron primero al añadir una fase oleosa (mezcla de escualano que contiene 5 % (p/v) de monooleato de glicerilo y 5 mg/ml de DPPC. Como se muestra en la Figura 13, Panel C, las emulsiones dobles se generaron al añadir una fase acuosa externa que contiene TrisHCl 5 mM pH 8 y TritonX100 al 0,01 % y agitación vorticial. Los liposomas se formaron a través de la separación de fases. Como se muestra en la Figura 13, Panel D, los liposomas formados con lípido fluorescente adicional en la fase oleosa se visualizaron con un microscopio fluorescente EVOS.

Ejemplo 9: Secuenciación de ARN de alto rendimiento a través de PTE

Como se muestra en las Figuras 14A-14C, se desarrolló un protocolo que permite la secuenciación de ARN de célula única (scRNA-seq) sin microfluídica, que permitió el perfilado del transcriptoma de miles de células individuales con reactivos simples. Se utilizó una combinación de la aproximación de lisis basada en proteasas, despolimerización de hidrogeles activados químicamente y perlas de captura de ARN codificadas para lograr la formación de gotitas, la lisis celular y la captura de ARN en una sola etapa. La tecnología amplió la capacidad de scRNA-seq al aumentar el rendimiento y simplificar el protocolo convencional.

Las perlas de secuencia de gotitas (Figura 14 A; Figura 15, Panel A) se encapsularon primero en hidrogel de poliacrilamida BAC mediante el uso de bis(acrilóil)ocistamina (BAC) como reticulante para la síntesis de perlas de poliacrilamida, seguido de lavado y resuspensión. Las perlas, las células, la proteinasa K y el tampón de hibridación se combinaron. Se añadió aceite presaturado con 2-Mercaptoetanol (2-Me) y se realizó PTE como se describe en la presente descripción para encapsular células individuales en gotitas (Figura 14B; Figura 15, Panel B). Las células se lisaron mediante proteinasa K. No se usó detergente para la lisis celular para evitar la lisis antes de la formación de gotitas. La proteinasa K requería un tiempo más largo y una temperatura más alta para lisar las células de manera eficiente y, por lo tanto, era adecuada para el método. Después de la adición de proteinasa K y la formación de gotitas, la temperatura se elevó de 4 °C a 55 °C para facilitar la activación de la proteinasa K y la lisis celular. Después de la lisis celular y la captura de ARN, las emulsiones se rompieron, la proteinasa K se lavó y se recuperaron las perlas de Drop-seq (Figura 14C).

En la Figura 15, las imágenes microscópicas representan células encapsuladas en gotitas antes de la lisis (Figura 15, Panel C) y después de la lisis (Figura 15, Panel D) teñidas con calceína verde. Los datos de un experimento de células mixtas humano-ratón ilustraron la efectividad del flujo de trabajo de scRNA-seq descrito en la presente descripción (Figura 15, Panel E).

Ejemplo 10: Formación de microgel núcleo-cubierta a través de PTE y análisis dirigido

Como se muestra en la Figura 16, se desarrolló un método para crear microgel núcleo-cubierta mediante el uso de la tecnología de emulsión instantánea, que combinó la PTE basada en la afinidad con el análisis dirigido. Se contempla que el microgel núcleo-cubierta creado mediante el uso de la tecnología de emulsión instantánea podría usarse para

retener una variedad de material biológico y reactivos para ampliar el rango de aplicaciones para la tecnología de emulsión instantánea. Las perlas de poliacrilamida (Figura 17, Panel A) se conjugaron con oligonucleótidos, que se usaron como cebadores durante la PCR. Dicho análisis dirigido con la tecnología de emulsión instantánea al funcionalizar la partícula de plantilla con ADN permite un amplio rango de aplicaciones, tal como la scRNA-seq dirigida (hacia un tipo de célula específico) a partir de una población heterogénea de células. Mientras que el presente ejemplo utilizó perlas funcionalizadas con oligos, otras funcionalizaciones, por ejemplo, con anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, pueden visualizarse fácilmente por un experto en la técnica. Las perlas se sumergieron en el reactivo de PCR. Se eliminó el exceso de solución acuosa. Se añadió agarosa, Tritón y células, seguido de aceite. La PTE se realizó como se describe en la presente descripción. El aceite se transfirió y se realizó un termociclado. La ddPCR en perlas de núcleo de poliacrilamida con una cubierta de agarosa se realizó con dos factores de dilución (Figura 17, Panel B). La fracción con gotitas positivas de fluorescencia corresponde a la concentración de la plantilla. La imagen de las perlas del núcleo de poliacrilamida con la cubierta de agarosa mostró las perlas del núcleo de poliacrilamida rodeadas por la cubierta de agarosa después de que las gotitas se rompieron y se lavaron. Como se muestra en la Figura 17, Panel C, que representa imágenes de las gotitas después del FACS, las gotitas positivas de fluorescencia se clasificaron, recolectaron y observaron bajo un microscopio. Las perlas clasificadas eran fluorescentes y estaban rodeadas por una cubierta de agarosa después de la FACS. Se realizó la qPCR para examinar la recuperación del genoma en la cubierta de agarosa (Figura 17, Panel D). Se usaron cuatro conjuntos de cebadores en diferentes loci. Se observaron señales después de 35 ciclos y el ADN genómico se encapsuló en la cubierta de agarosa.

#### Referencias

1. Costa, L. da F.; Rodrigues, F. A.; Cristino, A. S. Complex networks: The key to systems biology. *Genet. Mol. Biol.* 2008, 31, 591-601.
2. Blainey, P. C.; Quake, S. R. Dissecting genomic diversity, one cell at a time. *Nat. Methods* 2014, 11, 19-21.
3. Civelek, M.; Lusk, A. J. Systems genetics approaches to understand complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 2014, 15, 34-48.
4. Weaver, W. M. y otros. Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 25, 114-123.
5. Fritzsche, F. S. O.; Dusny, C.; Frick, O.; Schmid, A. Single-Cell Analysis in Biotechnology, Systems Biology, and Biocatalysis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2012, 3, 129-155.
6. Soon, W. W.; Hariharan, M.; Snyder, M. P. High-throughput sequencing for biology and medicine. *Mol. Syst. Biol.* 2013, 9, 640.
7. Macosko, E. Z. y otros. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* 2015, 161, 1202-1214.
8. Mazutis, L. y otros. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nat. Protoc.* 2013, 8, 870-891.
9. Kimmerling, R. J. y otros. A microfluidic platform enabling single-cell RNA-seq of multigenerational lineages. *Nature Commun.* 2016, 7, 10220.
10. Kim, J. H. y otros. Droplet Microfluidics for Producing Functional Microparticles. *Langmuir* 2014, 30, 1473-1488.
11. Guo, M. T.; Rotem, A.; Heyman, J. A.; Weitz, D. A. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab Chip* 2012, 12, 2146-2155.
12. Joanicot, M.; Ajdari, A. Droplet control for microfluidics. *Science* 2005, 309, 887-888.
13. Tran, T. M.; Lan, F.; Thompson, C. S.; Abate, A. R. From tubes to drops: droplet-based microfluidics for ultrahigh-throughput biology. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2013, 46, 114004.
14. Abate, A. R. y otros. DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics. *Lab Chip* 2013, 13, 4864-4869.
15. Autour, A.; Ryckelynck, M. Ultrahigh-throughput improvement and discovery of enzymes using droplet-based microfluidic screening. *Micromachines* 2017, 8, 128.
16. Mashaghi, S.; Abbaspourrad, A.; Weitz, D. A.; van Oijen, A. M. Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2016, 82, 118-125.
17. Abbaspourrad, A. y otros. Label-free single-cell protein quantification using a drop-based mix-and-read system. *Sci. Rep.* 2015, 5, 12756.
18. Baker, M. Digital PCR hits its stride. *Nat. Methods* 2012, 9, 541-544.
19. Kolodziejczyk, A. A.; Kim, J. K.; Svensson, V.; Marioni, J. C.; Teichmann, S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol. Cell* 2015, 58, 610-620.
20. Zilionis, R. y otros. Single-cell barcoding and sequencing using droplet microfluidics. *Nat. Protoc.* 2017, 12, 44-73.
21. Spencer, S. J. y otros. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* 2016, 10, 427-436.
22. Tamminen, M. V.; Virta, M. P. J. Single gene-based distinction of individual microbial genomes from a mixed population of microbial cells. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 195.
23. Katepalli, H.; Bose, A. Response of Surfactant Stabilized Oil-in-Water Emulsions to the Addition of Particles in an Aqueous Suspension. *Langmuir* 2014, 30, 12736-12742.
24. Abate, A. R.; Chen, C.-H.; Agresti, J. J.; Weitz, D. A. Beating Poisson encapsulation statistics using close-packed ordering. *Lab Chip* 2009, 9, 2628-2631.

25. Yan, K. S. y otros. Intestinal Enteroendocrine Lineage Cells Possess Homeostatic and Injury-Inducible Stem Cell Activity. *Cell Stem Cell* 2017, 21, 78-90.e6.
26. Spies, N. y otros. Genome-wide reconstruction of complex structural variants using read clouds. *Nat. Methods* 2017, 14, 915-920.
- 5 27. Hindson, B. J. y otros. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 2011, 83, 8604-8610.
28. Pinheiro, L. B. y otros. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1003-1011.
- 10 29. Taly, V. y otros. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin. Chem.* 2013, 59, 1722-1731.
30. Elnifro, E. M.; Ashshi, A. M.; Cooper, R. J.; Klapper, P. E. Multiplex PCR : Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000, 13, 559-570.
31. Lance, S. T.; Sukovich, D. J.; Stedman, K. M.; Abate, A. R. Peering below the diffraction limit: robust and specific sorting of viruses with flow cytometry. *Virology* 2016, 13, 201.
- 15 32. Collins, D. J.; Neild, A.; deMello, A.; Liu, A-Q.; Ai, Y. The Poisson distribution and beyond: methods for microfluidic droplet production and single cell encapsulation. *Lab Chip* 2015, 15, 3439-3459.
33. Halldorsson, S.; Lucumi, E.; Gómez-Sjöberg, R.; Fleming, R. M. T. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 63, 218-231.
- 20 34. Bjork, S. M.; Sjostrom, S. L.; Andersson-Svahn, H.; Joensson, H. N. Metabolite profiling of microfluidic cell culture conditions for droplet based screening. *Biomicrofluidics* 2015, 9, 044128.
- 35 35. Brouzes, E. y otros. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106, 14195-14200.
36. Zhu, Z.; Yang, C. J Hydrogel Droplet Microfluidics for High-Throughput Single Molecule/Cell Analysis. *Acc. Chem. Res.* 2017, 50, 22-31.
- 25 37. Shembekar, N.; Chaipan, C.; Utharala, R.; Merten, C. A Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics. *Lab Chip* 2016, 16, 1314-1331.
38. Gielen, F. y otros. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance- activated droplet sorting (AADS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016, 113, E7383-E7389.
- 30 39. Romero, P. A.; Tran, T. M.; Abate, A. R. Dissecting enzyme function with microfluidic-based deep mutational scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, 112, 7159-7164.
40. Sukovich, D. J.; Lance, S. T.; Abate, A. R. Sequence specific sorting of DNA molecules with FACS using 3dPCR. *Sci. Rep.* 2017, 7, 39385.
41. Lim, S. W.; Abate, A. R. Ultrahigh-throughput sorting of microfluidic drops with flow cytometry. *Lab Chip* 2013, 13, 4563-4572.
- 35 42. Griffiths, A. D.; Tawfik, D. S. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends Biotechnol.* 2006, 24, 395-402.
43. Sandberg, J.; Ståhl, P. L.; Ahmadian, A.; Bjursell, M. K.; Lundeberg, J. Flow cytometry for enrichment and titration in massively parallel DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, e63.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para generar una emulsión, el método que comprende:

5           combinar una pluralidad de partículas de plantilla con un primer fluido para proporcionar una primera mezcla, en donde el 99 % o más de la pluralidad de partículas de plantilla varían en diámetro por menos de un factor de 10 y en donde el primer fluido comprende una pluralidad de partículas objetivo;  
          combinar la primera mezcla con un segundo fluido para proporcionar una segunda mezcla, en donde el  
10           segundo fluido es inmiscible con el primer fluido; y  
          cizallar la segunda mezcla mediante agitación vorticial durante 30 segundos, de manera que una pluralidad de las partículas de plantilla se encapsulan en una pluralidad de gotitas, que varían de 0,1 a 1000 micras de diámetro en el segundo fluido, proporcionando, de esta manera, una pluralidad de gotitas que comprenden el primer fluido, una de las partículas de plantilla y una de la pluralidad de partículas objetivo, en donde la pluralidad de gotitas cuando se examinan mediante microscopía de LED tiene una variación en el diámetro de  
15           menos de un factor de 10  
          en donde las partículas de plantilla comprenden PAA, PEG o agarosa y en donde el primer fluido comprende un surfactante seleccionado del grupo que consiste en etoxilato de octilfenol y octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL) y el segundo fluido es el aceite fluorado 2-(trifluorometil)-3-etoxidodecafluorohexano,  
20           en donde no se usa un dispositivo microfluídico en la formación de gotitas.

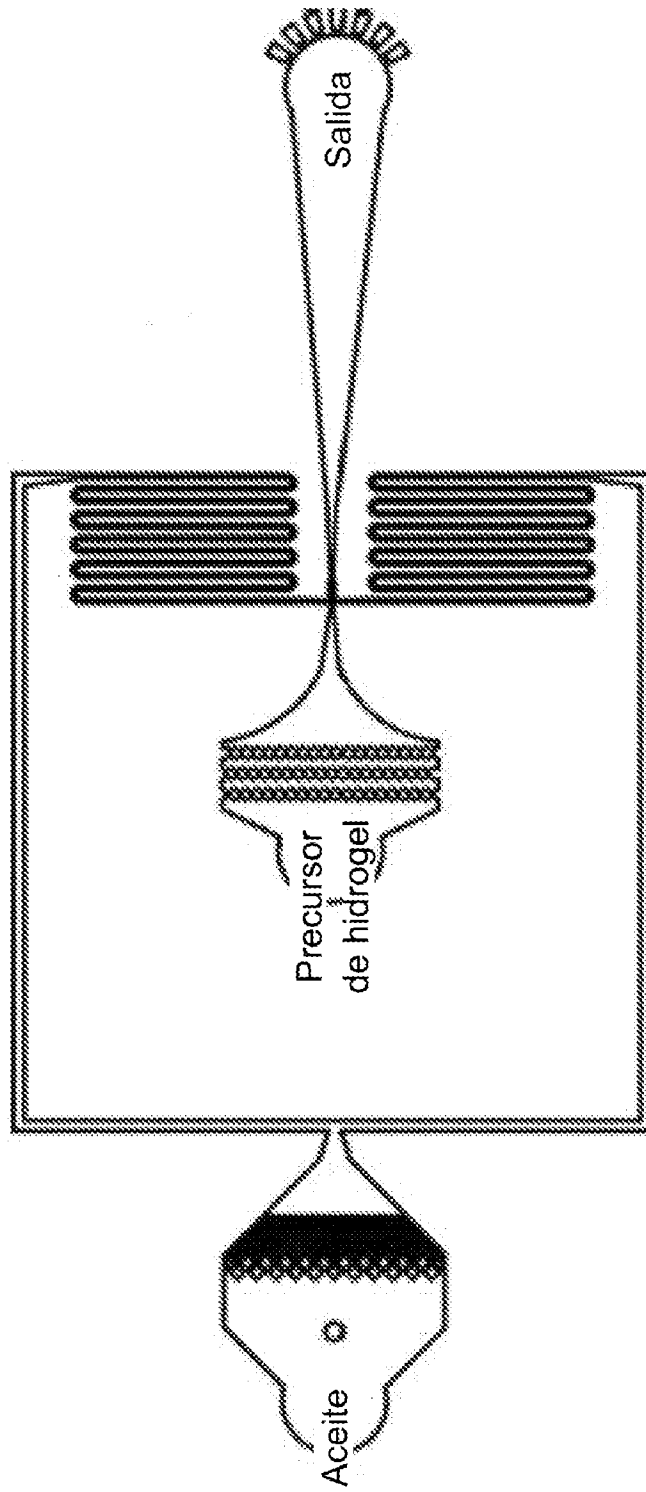
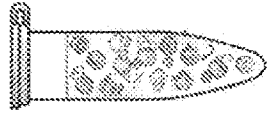


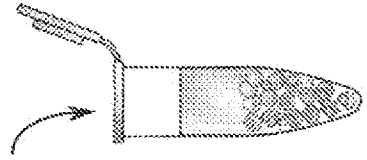
FIGURA 1

# FIGURA 2

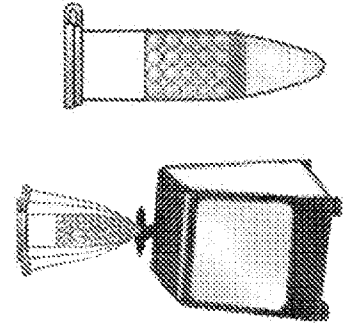
A. Combinar las partículas de plantilla monodispersas con un primer fluido que comprende partículas objetivo



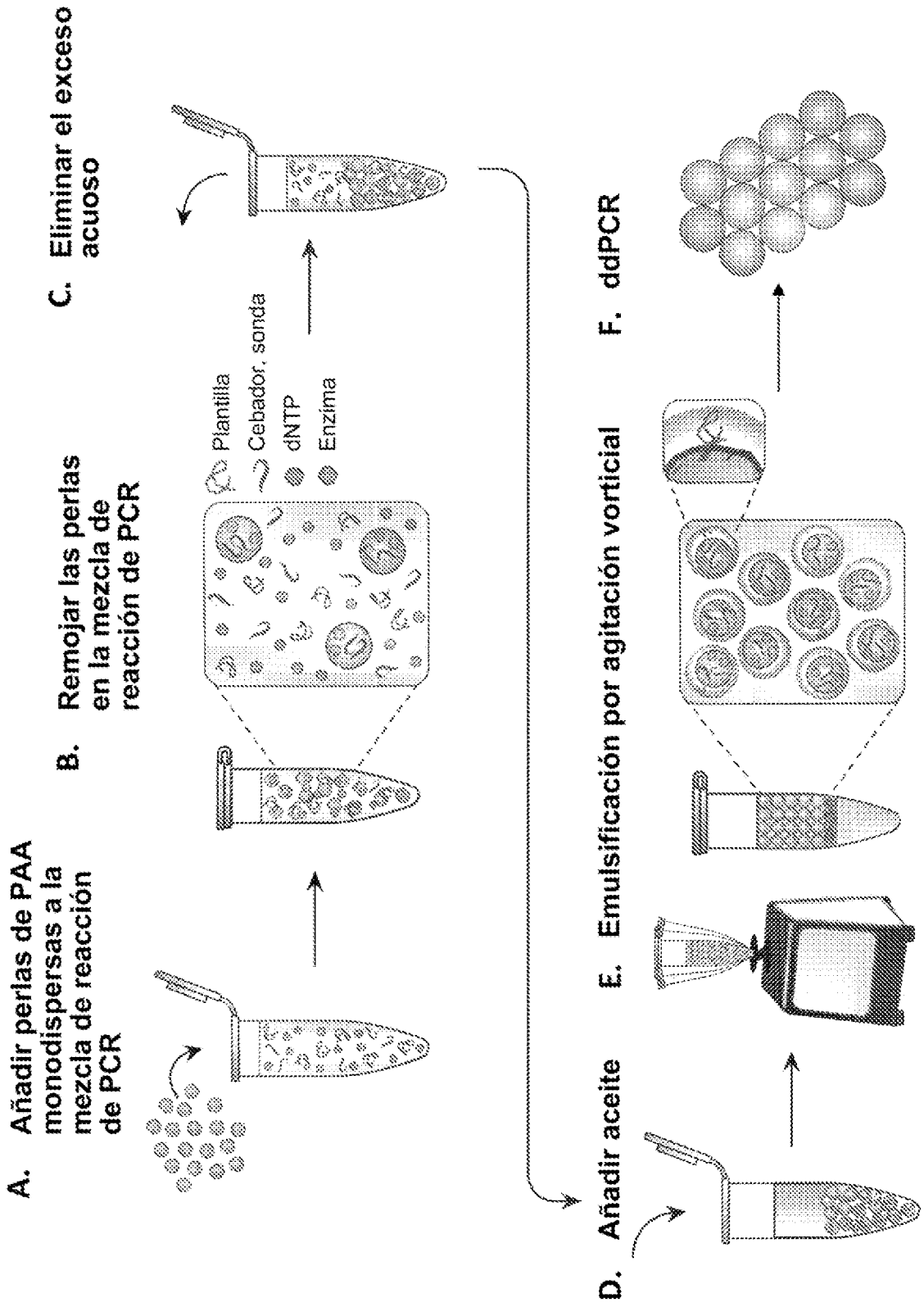
B. Combinar con un segundo fluido



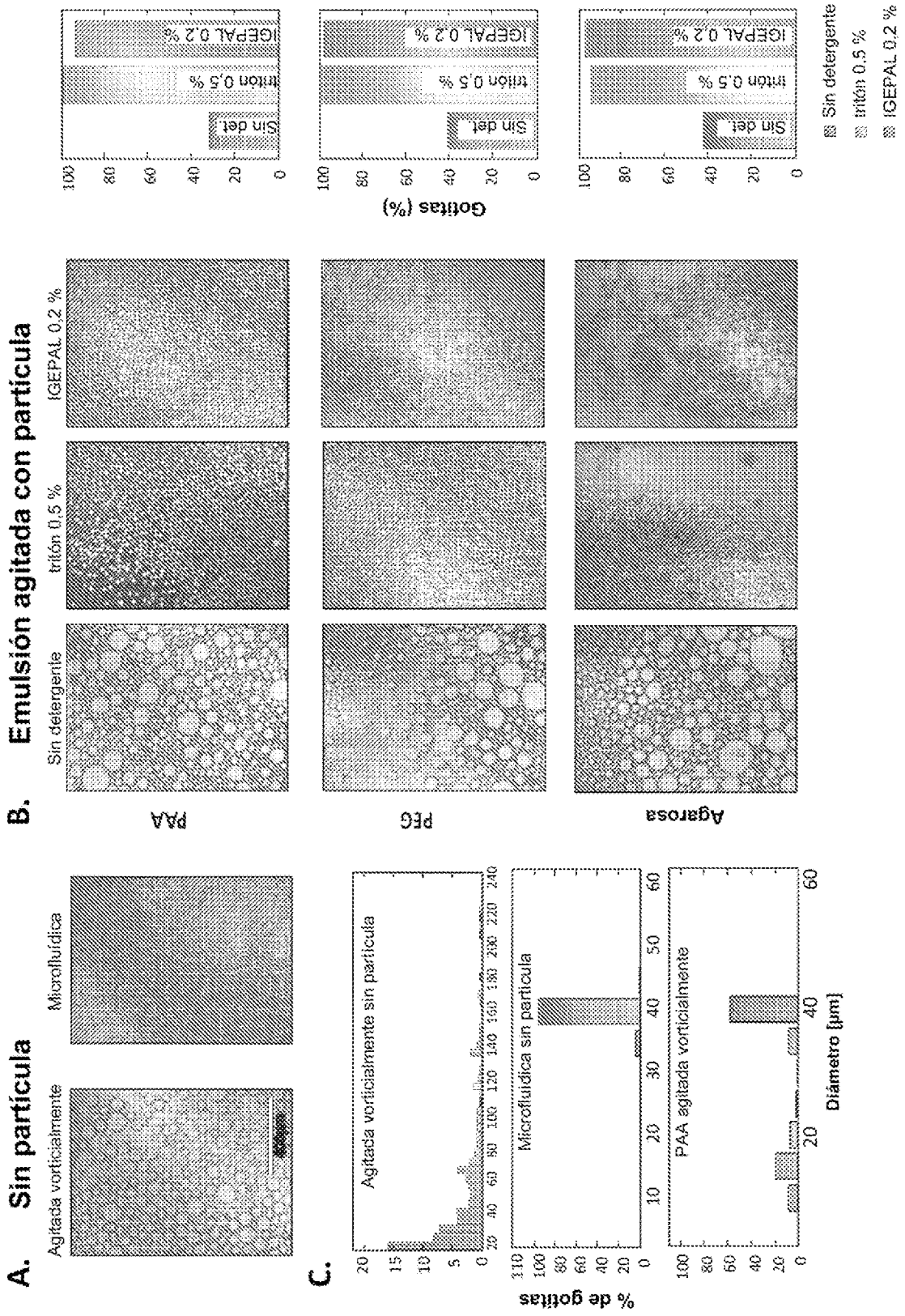
C. Cizallamiento



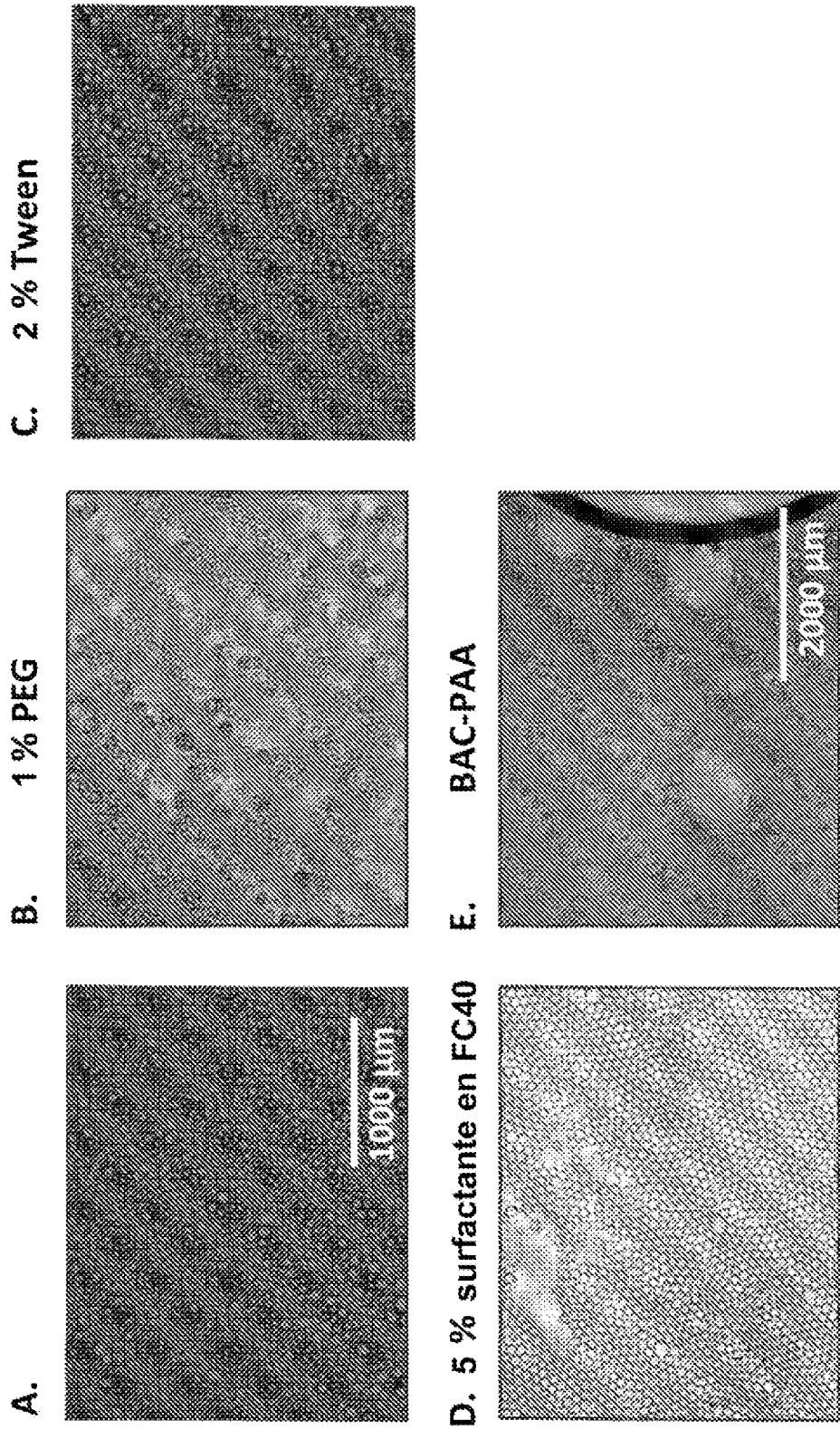
**FIGURA 3**



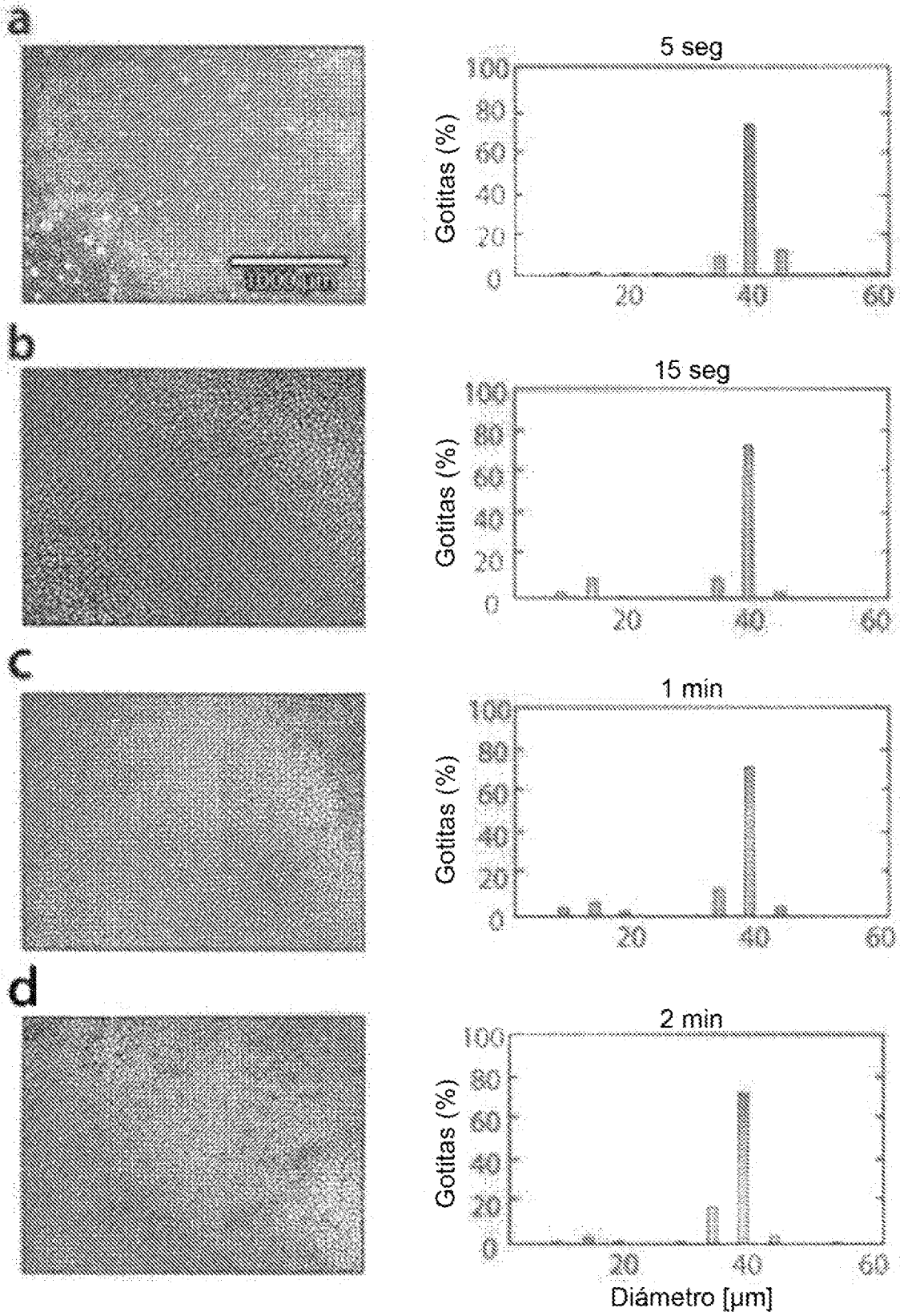
**FIGURA 4**



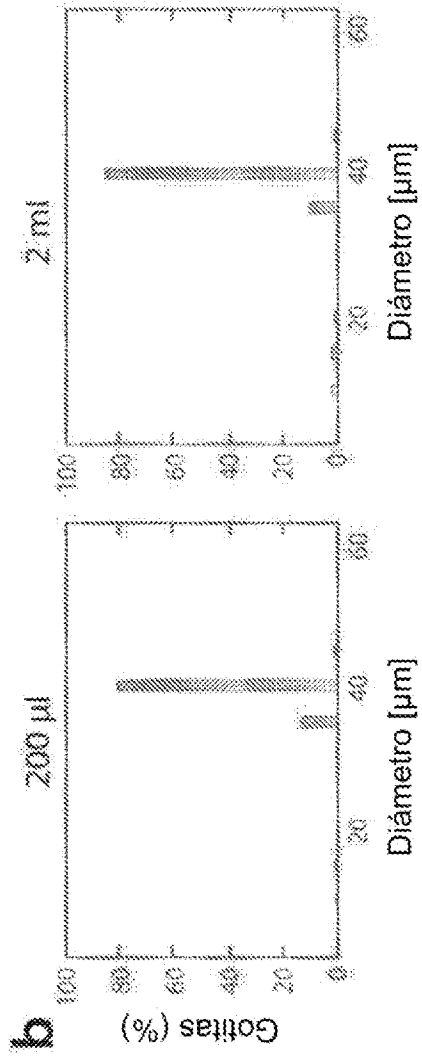
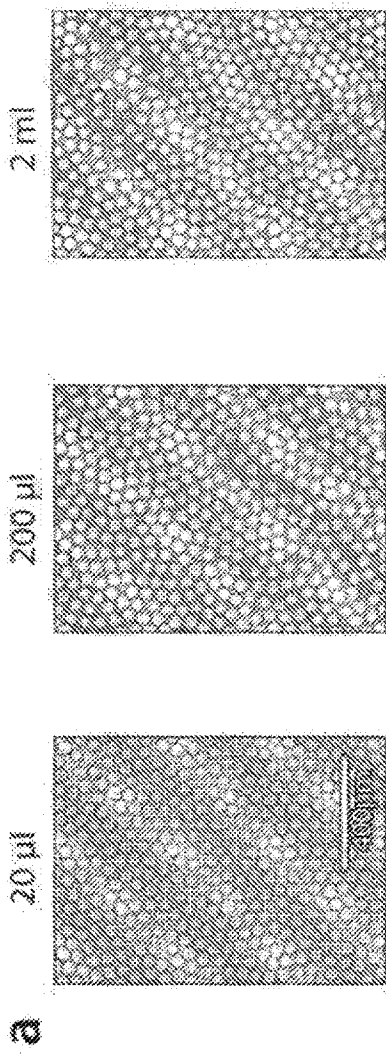
**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**c**

PTE	30%	30%	30%
	20 µl	200 µl	2 ml
Microfluidica	7 min	1 h 10 min	11 h 40 min

**FIGURA 8**

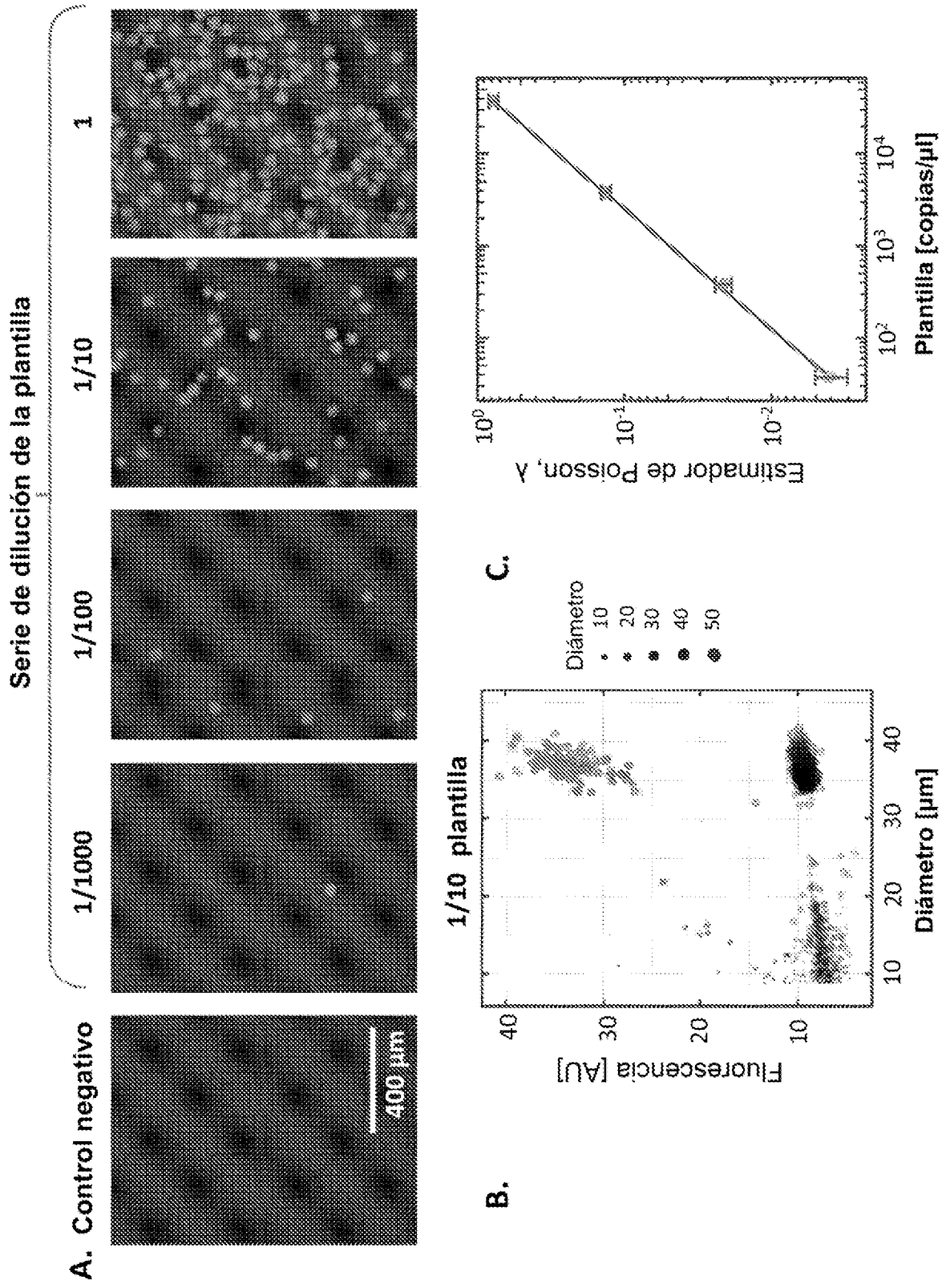
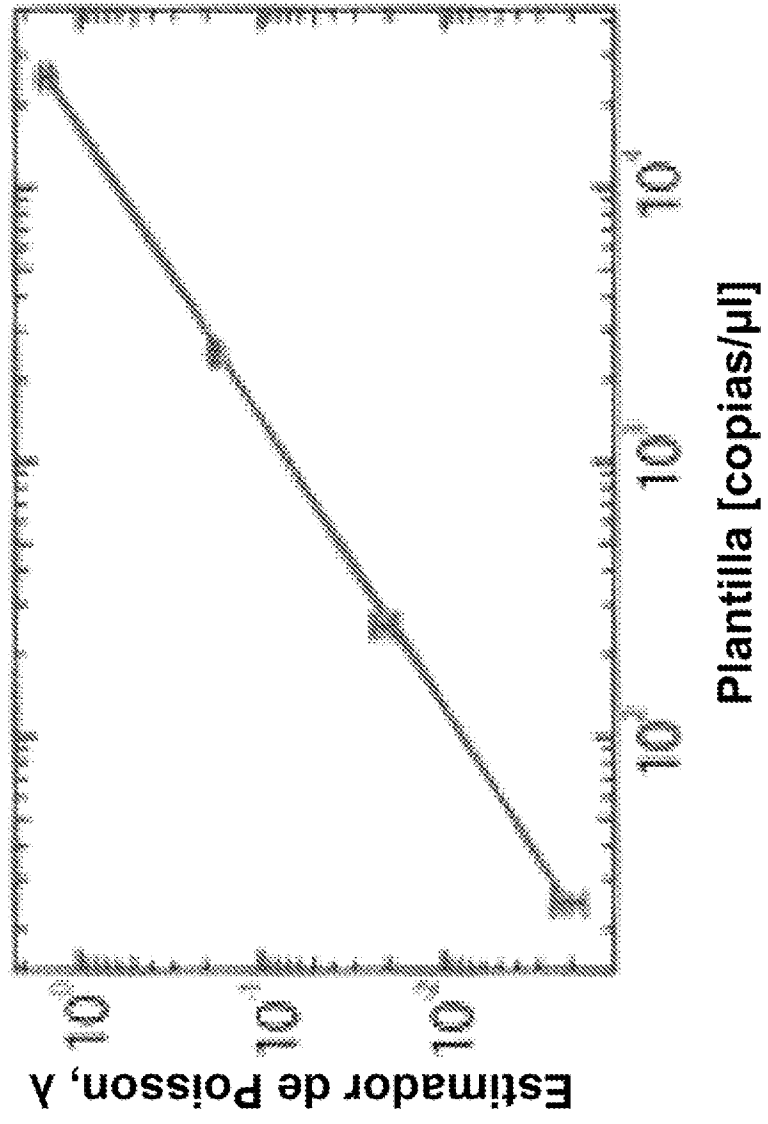


FIGURA 9



**FIGURA 10A**

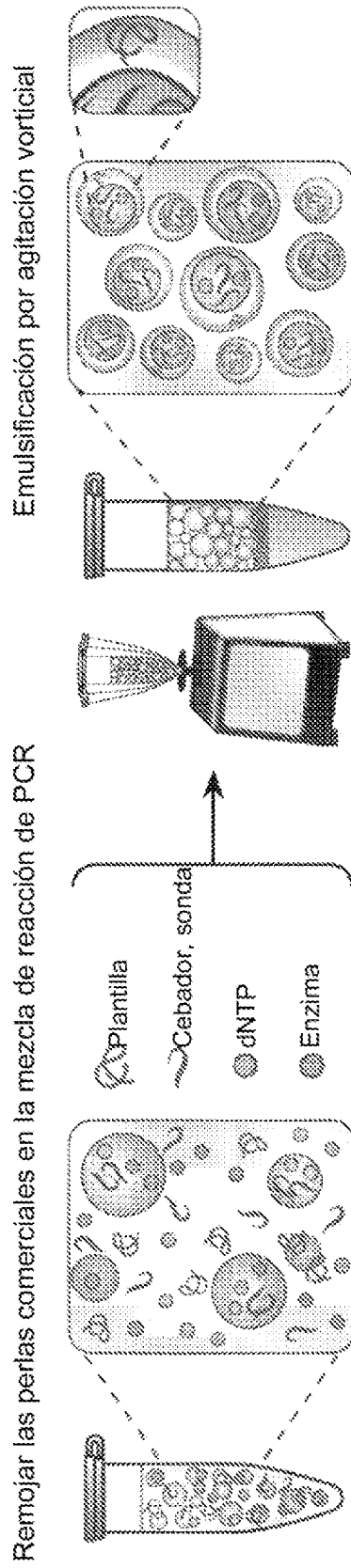
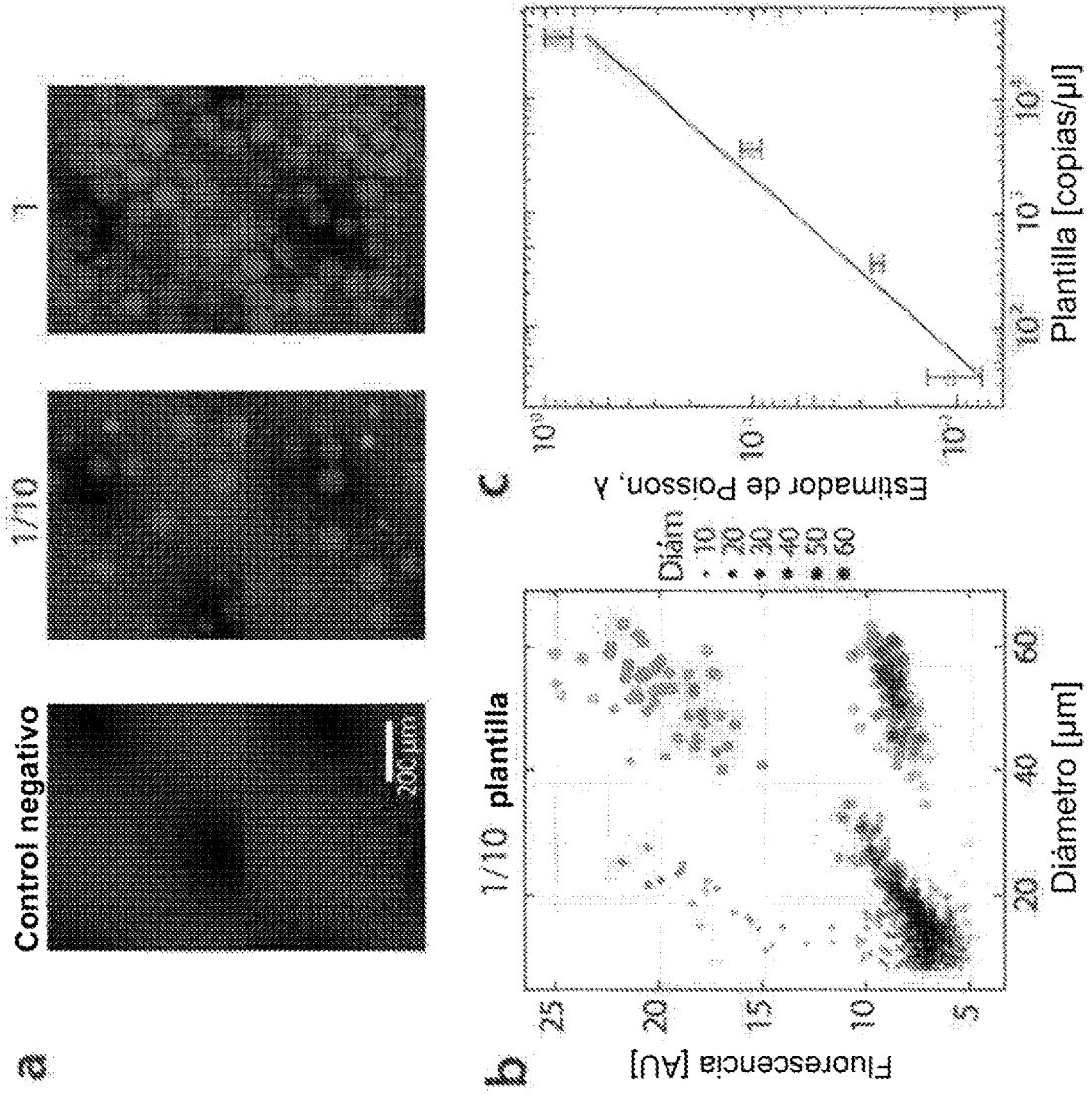


FIGURA 10B



# FIGURA 11

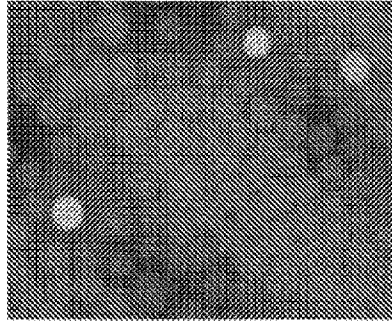
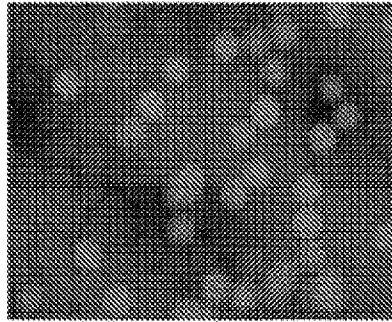
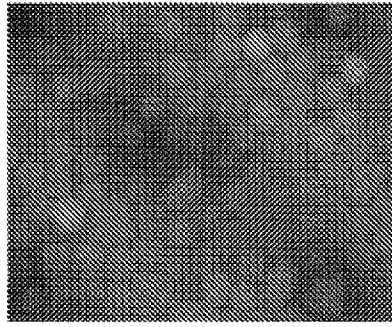
A.

PCR multiplexada

Fusionado

Lambda

Levadura



B.

Capturar células y cultivar 10 h

0 h

10 h

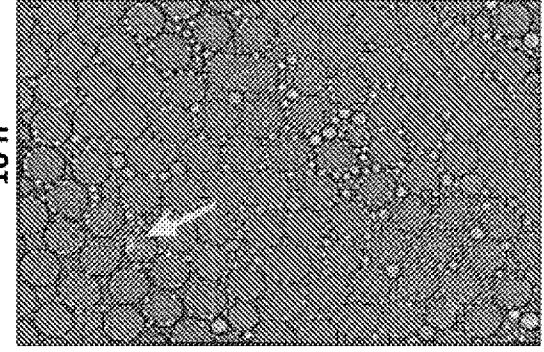
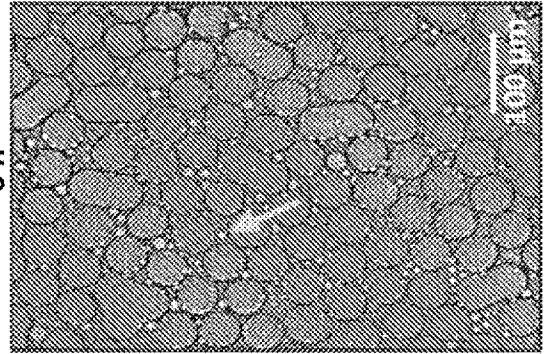


FIGURA 12

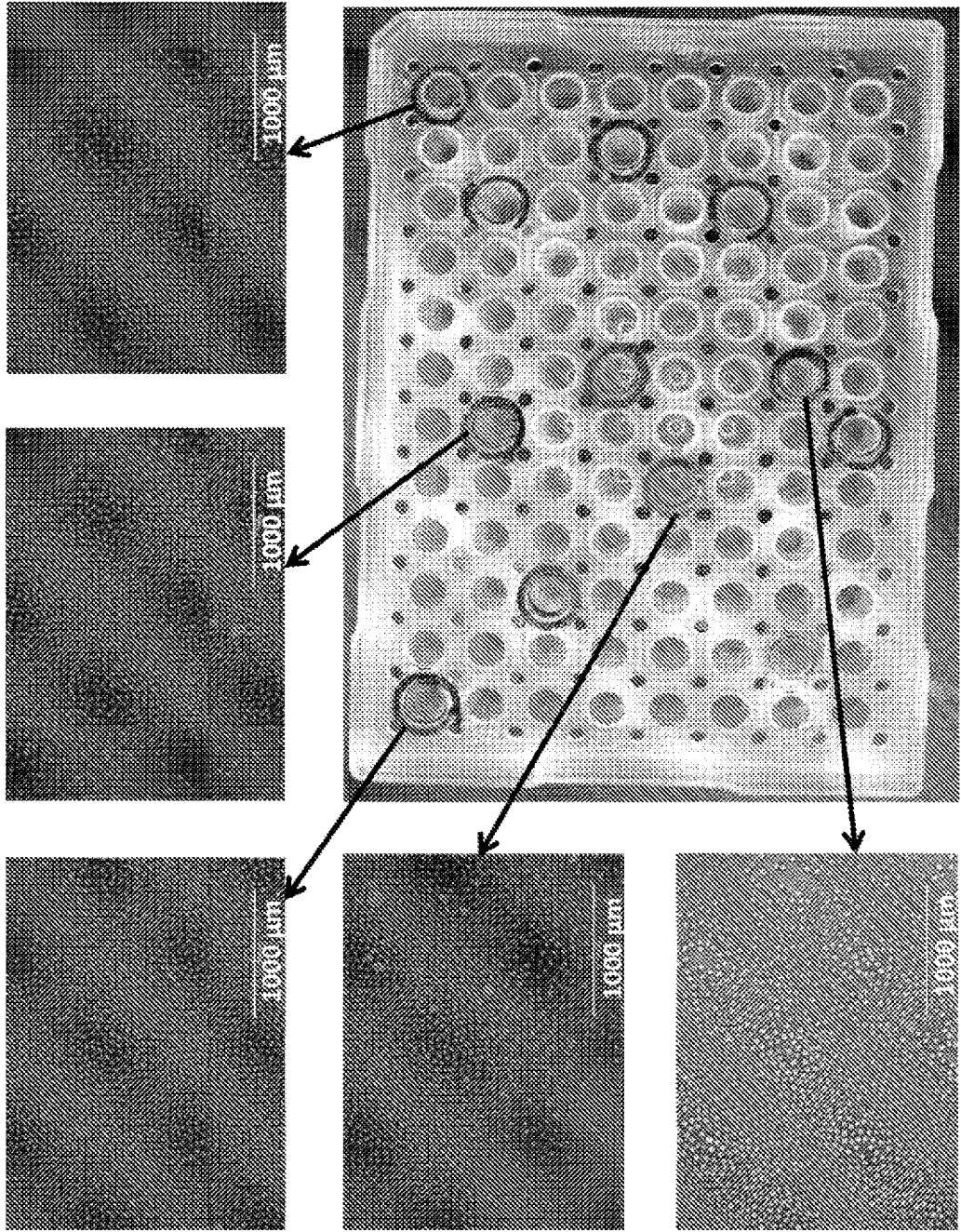


FIGURA 13

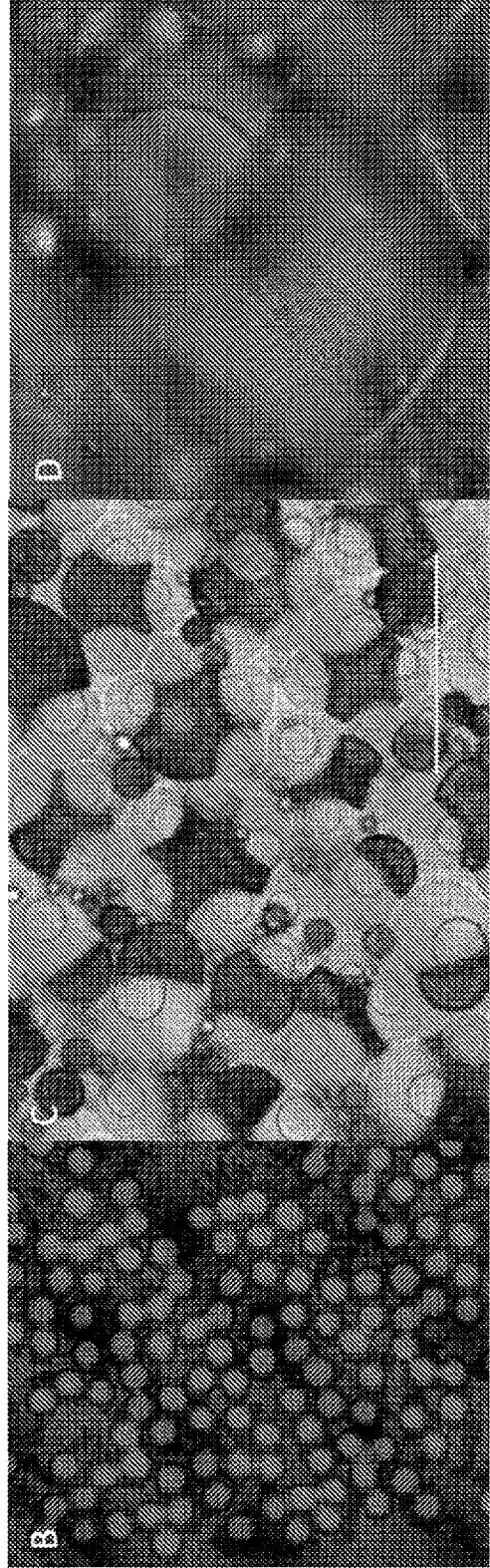
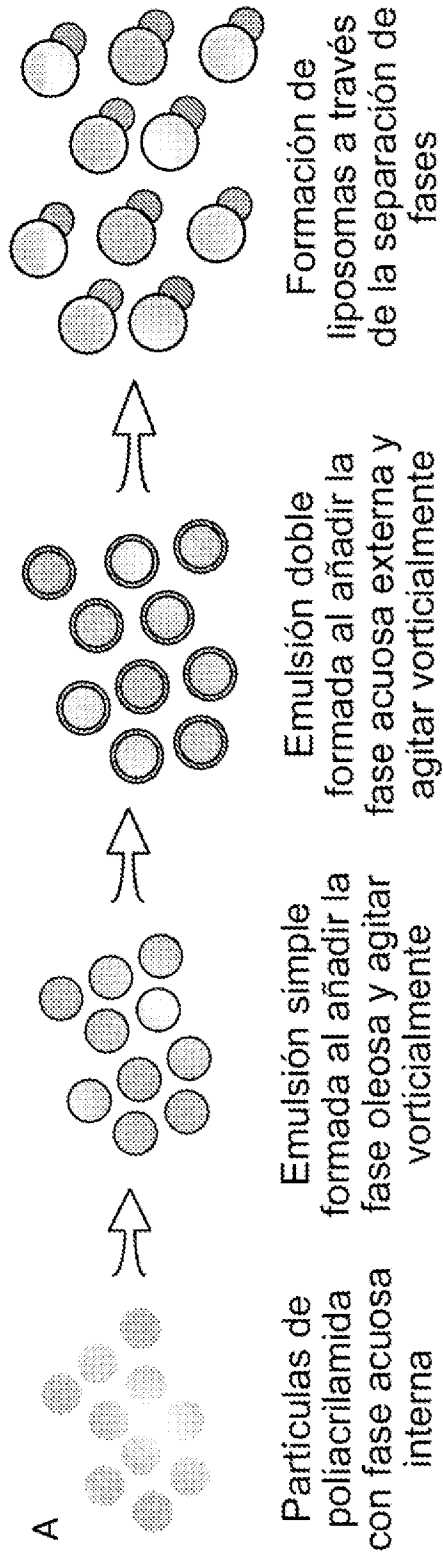


FIGURA 14A

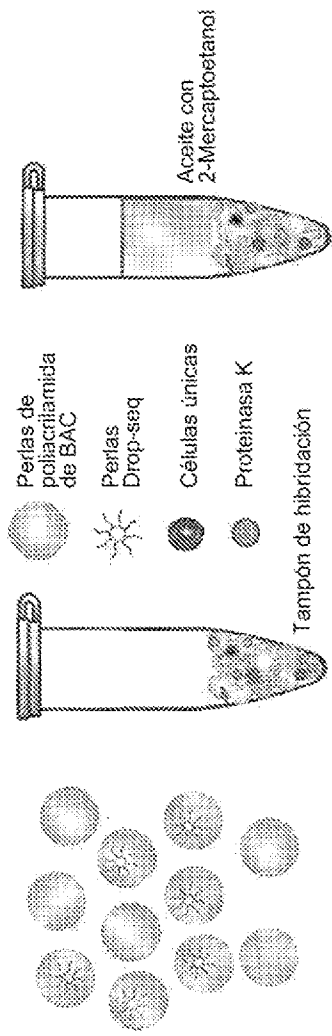


FIGURA 14B

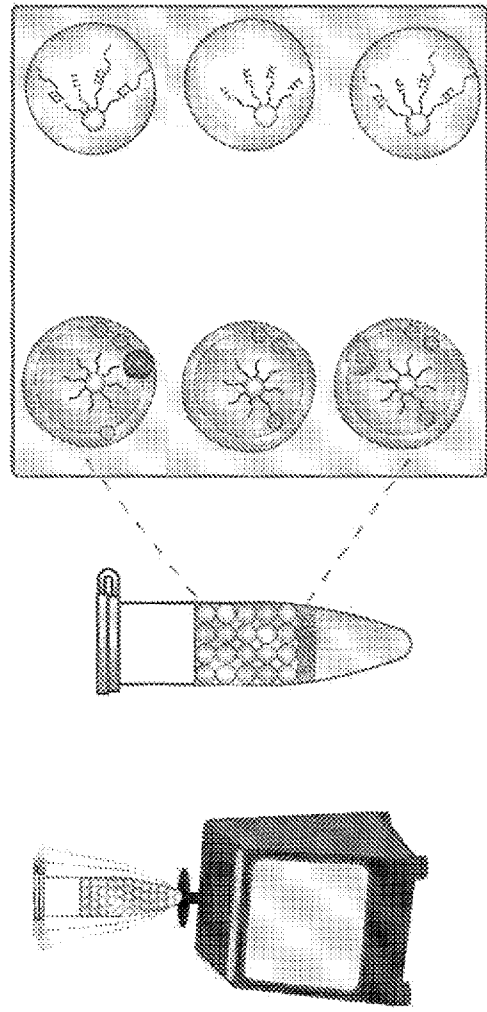
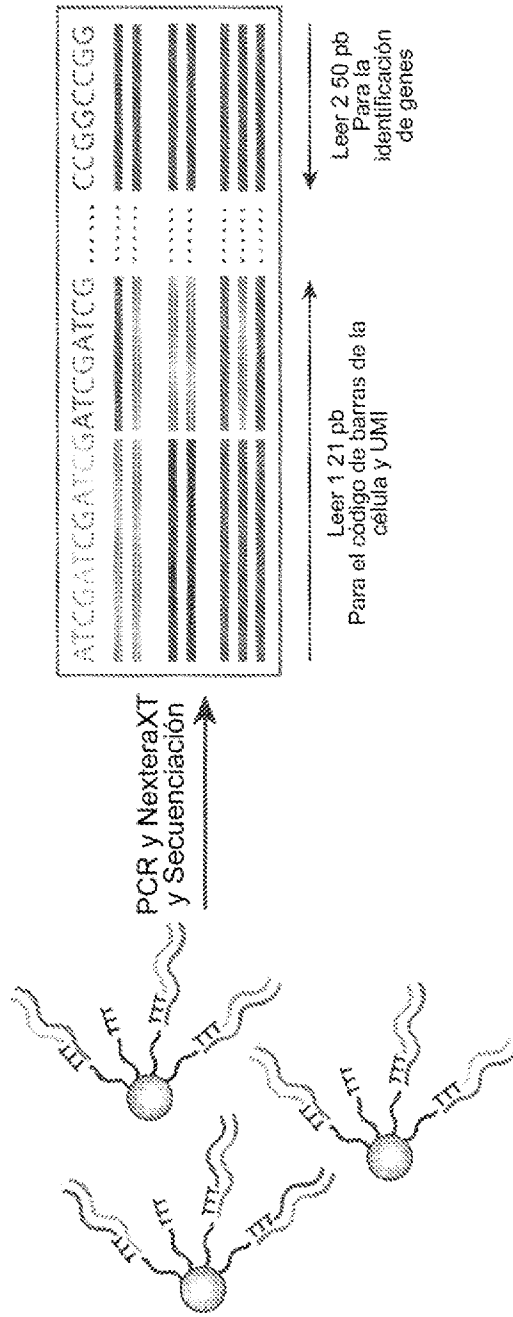
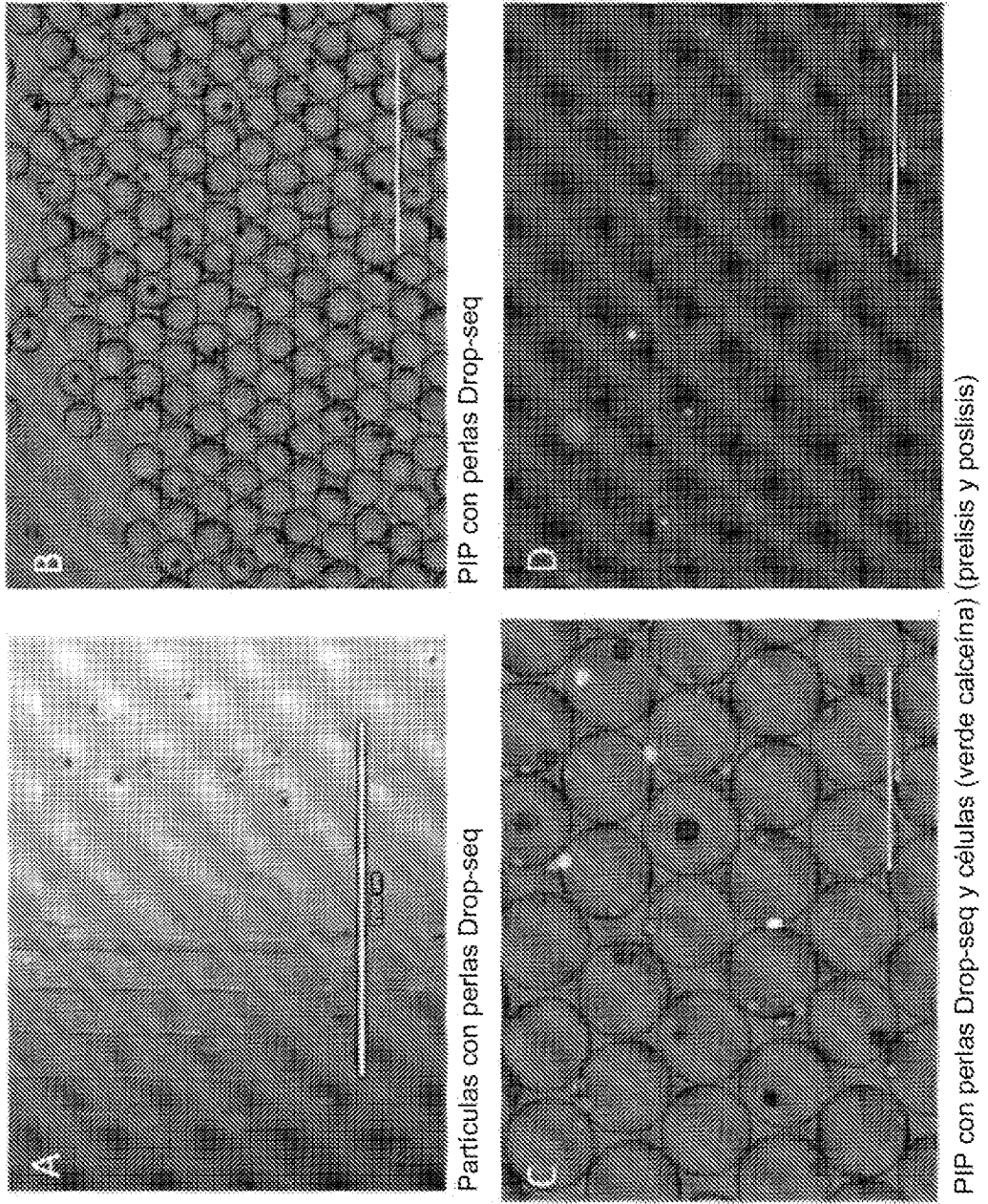


FIGURA 14C



**FIGURA 15**



**FIGURA 15 Continuación**

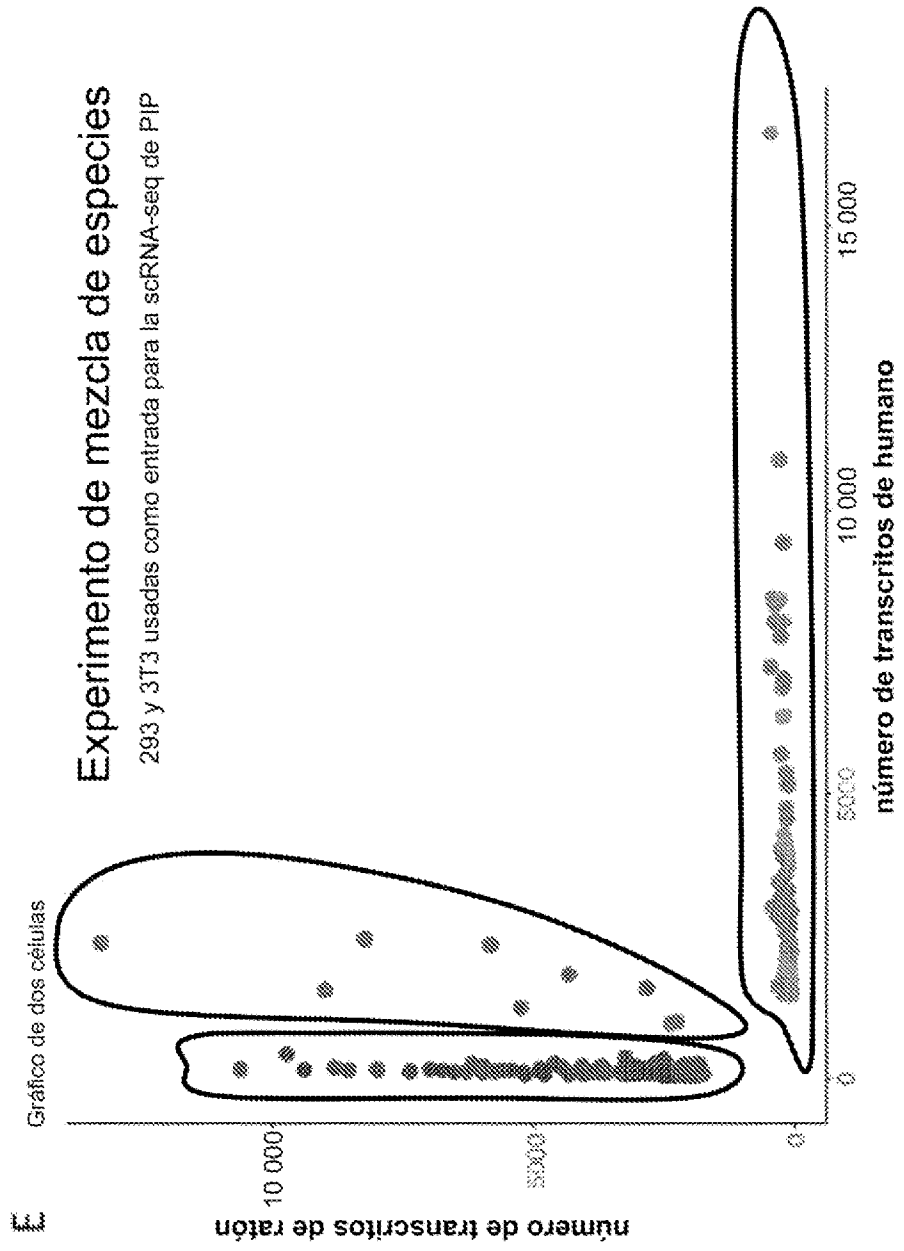
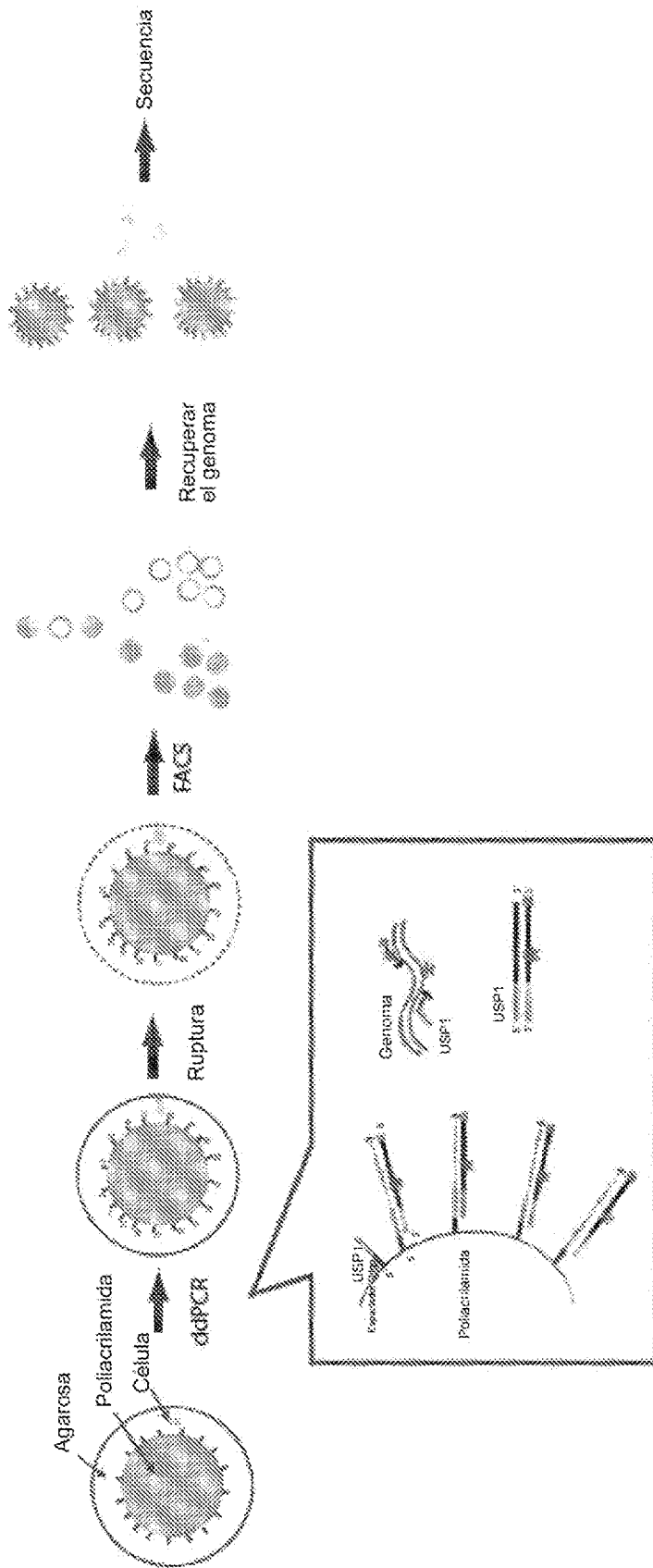


FIGURA 16



**FIGURA 17**

