

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 009**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6806** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2018** **PCT/US2018/044855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19028166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2018** **E 18755643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3662084**

54 Título: **Perlas de hidrogel para secuenciación de nucleótidos**

30 Prioridad:

**01.08.2017 US 201762539956 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.03.2025**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WU, YIR-SHYUAN;**  
**CHEN, XI-JUN;**  
**GORPE-YASAR, FILIZ;**  
**NOÉ, FALKO;**  
**LIN, CHARLES;**  
**KHURANA, TARUN KUMAR;**  
**MASHAYEKHI, FOAD;**  
**DAGGUMATI, PALLAVI;**  
**STEEMERS, FRANK J.;**  
**GUNDERSON, KEVIN L. y**  
**FISHER, JEFFREY S.**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 3 006 009 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

Perlas de hidrogel para secuenciación de nucleótidos

5 **Campo**

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

10

**Antecedentes**

Los secuenciadores de próxima generación son herramientas potentes que generan grandes cantidades de datos genómicos por ciclo de secuenciación. Interpretar y analizar esta gran cantidad de datos puede ser un desafío. La secuenciación de ADN de células individuales se perfila como una herramienta para estudiar la heterogeneidad genómica. Específicamente, el microbioma, que transporta múltiples regiones genómicas repetidas, puede secuenciarse obteniendo secuencias de ADN de células individuales. Esto simplificará en gran medida el proceso de alineación de datos de secuenciación posterior.

15

20 **Resumen**

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria se refieren a un método para encapsular material genético dentro de una perla de hidrogel que comprende:

25 mezclar una célula con un polímero de hidrogel en solución, en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato u PEG/óxido de polipropileno (PPO);

mezclar la solución con un fluido inmiscible para formar una perla de hidrogel que encapsula la célula; y poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla para liberar material genético de la célula; en donde la perla de hidrogel comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, y en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases.

30

Algunas realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un método para encapsular material genético dentro de una perla de hidrogel que comprende: mezclar una solución acuosa que comprende un polímero de hidrogel y una célula con un fluido inmiscible, en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato u PEG/óxido de polipropileno (PPO); introducir la solución acuosa en un generador de gotículas;

35

generar una perla de hidrogel que encapsula la célula; y

40

poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla para liberar el material genético de la célula; en donde la perla de hidrogel comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, y en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases.

45

Algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria se refieren a un método para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos a partir de material genético encapsulado dentro de una perla de hidrogel, que comprende: obtener una perla de hidrogel para realizar reacciones de ácidos nucleicos, en donde la perla de hidrogel comprende: un polímero de hidrogel; y una célula que incluye material genético dispuesto dentro de la perla de hidrogel; en donde la perla comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases; y en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato u PEG/óxido de polipropileno (PPO); poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla para liberar el material genético de la célula; amplificar el material genético encapsulado dentro de la perla; realizar una reacción de tagmentación en el material genético encapsulado dentro de la perla; y secuenciar el material genético, generando de este modo una biblioteca de ácidos nucleicos encapsulada dentro de la perla.

50

55

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1A es un esquema que ilustra una realización de preparación de perlas de hidrogel mediante agitación por vórtice manual. La figura 1B es una imagen micrográfica que muestra las perlas formadas mediante este proceso, en donde se encontró que las perlas varían de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  en diámetro.

60

La figura 2A es un esquema que ilustra una realización para preparar perlas de hidrogel utilizando un generador de gotículas microfluídicas. La figura 2B es una imagen micrográfica que muestra las perlas formadas mediante este

65

proceso, en donde las perlas tienen un tamaño uniforme basándose en las dimensiones del generador de gotículas microfluídicas.

La figura 3 incluye un gráfico de líneas que ilustra el efecto de añadir diversas concentraciones de alcohol isopropílico a los polímeros de hidrogel utilizando la misma generación de gotículas microfluídicas que se describe en la figura 2. La figura 3 también muestra varias micrografías de polímeros de hidrogel de diferentes tamaños.

Las figuras 4A y 4B son micrografías de células bacterianas teñidas con colorante fluorescente atrapadas en hidrogeles de diferentes tamaños. La figura 4A representa perlas de hidrogel de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro que encapsulan numerosas células bacterianas. La figura 4B representa perlas de hidrogel de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro que encapsulan una o dos células bacterianas.

La figura 5A ilustra una realización para funcionalizar perlas de hidrogel con oligonucleótidos. La figura 5B muestra micrografías de perlas de hidrogel funcionalizadas con oligonucleótidos con y sin acidificación. La figura 5C muestra micrografías de perlas de hidrogel funcionalizadas con poliT que capturan una secuencia SeqB. La figura 5D muestra un electrocromatograma de ADN después de la síntesis de la segunda cadena (curva derecha) y después de la tagmentación (curva izquierda).

Las figuras 6A y 6B son micrografías que muestran células de fibroblastos de ratón (NIH-3T3) encapsuladas dentro de perlas de hidrogel. La figura 6A muestra que una célula individual se encapsula en condiciones de gelificación rápida. La figura 6B muestra que múltiples células son encapsuladas por el hidrogel en condiciones de gelificación lenta.

La figura 7A ilustra una realización del proceso de fabricación de un polímero de hidrogel que tiene enlaces disulfuro, que se pueden escindir en presencia de un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), o tris(3-hidroxipropil)fosfina (THP). La figura 7B ilustra micrografías de perlas de hidrogel que se han escindido químicamente, lo que permite la liberación del material genético encapsulado. La figura 7C son micrografías que ilustran la liberación de material genético encapsulado a partir de perlas de hidrogel.

Las figuras 8A-8C ilustran los pasos para una realización del uso de material genético encapsulado para la codificación de barras en gel utilizando indexación combinatoria (figura 8A), secuenciación de células bacterianas individuales encapsuladas dentro de perlas de hidrogel (figura 8B) y codificación de barras en gel utilizando perlas que contienen un complejo de transposomas codificado con código de barras ensamblado en ellas u oligonucleótidos con código de barras insertados en el ADN tagmentado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (figura 8C).

La figura 9 ilustra los pasos para la amplificación del ADN dentro de las perlas de hidrogel. Las células bacterianas se encapsulan dentro de una perla de hidrogel. Las células capturadas se lisan con lisozima y las proteínas se desnaturalizan utilizando el ADNg de la proteinasa K. En el panel a), el ADNg dentro de las perlas encapsuladas se amplifica mediante amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). En el panel b), el ADN se tagmenta y amplifica mediante PCR. En el panel c), el ADN tagmentado se eluye fuera de las perlas de hidrogel calentando las perlas de hidrogel hasta 90  $^{\circ}\text{C}$ . Las imágenes muestran la intensidad fluorescente del ADN teñido con colorante intercalador SYTOX.

La figura 10 representa micrografías que ilustran la liberación de una biblioteca de ADN sobre una superficie sólida para la siembra y la agrupación. El panel a) representa una sola perla de hidrogel con un genoma bacteriano segmentado, que se carga sobre una superficie sólida que tiene los cebadores P5 y P7 inmovilizados en la misma. El panel b) muestra el ADN monocatenario que se eluyó, se sembró y se amplificó mediante puente isotérmico. En el panel c), se muestra gradientes de densidad de grupos de ADN amplificado sembrado. El ADN se tiñe con colorante intercalador SYTOX.

La figura 11A es un gráfico lineal que representa la traza del bioanalizador de una biblioteca de ADN obtenida de 12 ciclos de PCR de sobrenadante que contiene material genético liberado de perlas de hidrogel calentando hasta 90  $^{\circ}\text{C}$ . En la figura 11B, las perlas de hidrogel no se calentaron y, por lo tanto, la biblioteca de ADN no se libera de las perlas de hidrogel, y no se observa ninguna biblioteca.

La figura 12 representa el confinamiento espacial de los grupos de secuenciación del ADN. El panel (a) muestra una lectura de secuenciación de primera base de dos bibliotecas de ADN indexadas de forma única que se originan a partir de dos perlas de hidrogel distintas. El panel (b) ilustra la separación espacial de las dos bibliotecas. Como se muestra en la imagen micrográfica del panel (c), las bibliotecas separadas son espacialmente distintas y se originan a partir de diferentes perlas de hidrogel.

La figura 13 representa una micrografía de los datos de secuenciación de primera base de la biblioteca de perlas de hidrogel con código de barras de tres células bacterianas diferentes (*B. subtilis*, *E. coli* y *A. hydrophila*) con separación espacial.

Las figuras 14A-14B representan las métricas de secuenciación para bibliotecas de *B. subtilis*, *E. coli* y *A. hydrophila* indexadas espacialmente liberadas a partir de perlas de hidrogel sobre la superficie de la celda de flujo.

Las figuras 15A-15C representan los resultados de la secuenciación MiSeq de la siembra de celdas de flujo con perlas de hidrogel que contienen bacterias *E. coli*, *B. subtilis* o *A. hydrophila*. La figura 15A es una imagen que representa datos sin procesar de microscopía MiSeq. La figura 15B es una imagen que muestra diferentes grupos microbianos que se alinean con un genoma específico. Por ejemplo, los puntos son los grupos que se alinearon con el genoma de *E. coli* y muestran el patrón de distribución del grupo. La figura 15C es una tabla resumida del filtro de paso de tres especies bacterianas diferentes.

## Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. En los dibujos, símbolos similares identifican normalmente componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones no pretenden ser limitativas.

Algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria se refieren a perlas que encapsulan materiales genéticos. Las perlas pueden incluir polímeros de hidrogel y reticulantes que se mezclan en presencia de un material genético, y que forman perlas de hidrogel que encapsulan el material genético. En algunas realizaciones, el material genético incluye ácidos nucleicos, células, microbiomas, o genomas. Las perlas de hidrogel pueden incluir poros que permiten la difusión de los reactivos a través de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético dentro de la perla, lo que permite que las reacciones tengan lugar dentro de las perlas. También se proporcionan métodos para utilizar las perlas que encapsulan materiales genéticos para realizar reacciones de ácidos nucleicos.

Algunas realizaciones se refieren a métodos para preparar una perla de hidrogel que encapsula una célula individual completa. En algunas realizaciones, la perla de hidrogel que encapsula una célula individual puede utilizarse para procesar el genoma celular y realizar la preparación de la biblioteca de ADN completa dentro de la perla. En algunas realizaciones, la perla de hidrogel que encapsula una célula individual puede utilizarse para procesar el ADN genómico celular y el ARNm simultáneamente, y realizar la preparación de la biblioteca de ADN completa dentro de la perla. El tamaño de poro del hidrogel puede diseñarse para permitir la difusión de enzimas, productos químicos y cebadores de menor tamaño (<50 bps), mientras retiene ácidos nucleicos de mayor tamaño (>300 bps) de modo que el ADN genómico completo intacto, el ARNm y la biblioteca de ADN producida puedan retenerse dentro de las perlas de hidrogel durante todo el proceso. En algunas realizaciones, se pueden unir químicamente cebadores específicos dentro de la matriz de perlas de hidrogel para hibridar y procesar ADN o ARNm genómico específico. La biblioteca de ADN de una célula individual puede entonces liberarse en un área específica, por ejemplo, en la superficie de la celda de flujo para la siembra de la biblioteca. Posteriormente, esto da lugar a una distribución espacial de “grupos de ADN” en la celda de flujo que se originan en células individuales, simplificando, por lo tanto, la alineación de la lectura durante el procesamiento posterior.

El enfoque de encapsulación en hidrogel se puede utilizar para otras operaciones complejas de preparación de bibliotecas, tales como, por ejemplo, aplicaciones de genómica/transcriptómica de células individuales, porque el enfoque permite la retención de las moléculas de ácido nucleico dentro del hidrogel mientras permite el intercambio de reactivos para realizar diversas operaciones enzimáticas/químicas en las moléculas de ADN. Se descubrió que este enfoque mejora la utilidad de la genómica de células individuales para especies microbianas en comparación con la tecnología actual de clasificación FACS de microbios en micropocillos para realizar diversos flujos de trabajo de lisis y preparación de bibliotecas, y es de bajo rendimiento (96 o 384 células por placa). El enfoque descrito en la presente memoria permite convertir cientos de miles de microbios en una biblioteca de códigos de barras en un proceso eficiente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “reactivo” describe un agente o una mezcla de dos o más agentes útiles para reaccionar con, interactuar con, diluir, o añadir a una muestra, y puede incluir agentes utilizados en reacciones de amplificación, que incluyen, por ejemplo, tampones, productos químicos, enzimas, polimerasas, cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases, ácidos nucleicos molde, nucleótidos, marcadores, colorantes, o nucleasas. En algunas realizaciones, el reactivo incluye lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa  $\Phi$ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótidos trifosfato, tampones o cationes divalentes.

## Perlas de hidrogel que encapsulan material genético

Una realización incluye una perla que incluye un polímero de hidrogel y material genético. Como se utiliza en el presente documento, el término “hidrogel” se refiere a una sustancia formada cuando un polímero orgánico (natural o sintético) se reticula mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de red abierta tridimensional que atrapa las moléculas de agua para formar un gel. En algunas realizaciones, el hidrogel puede ser un hidrogel biocompatible. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “hidrogel biocompatible” se refiere

a un polímero que forma un gel que no es tóxico para las células vivas y permite una difusión suficiente de oxígeno y nutrientes a las células atrapadas para mantener la viabilidad. En algunas realizaciones, el polímero de hidrogel incluye 60-90 % de líquido, tal como agua y 10-30 % de polímero. En determinadas realizaciones, el contenido acuoso de hidrogel es de aproximadamente 70-80 %.

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

Un reticulante forma un enlace disulfuro en el polímero de hidrogel. Como se muestra en la figura 7A, un reticulante puede formar un enlace disulfuro, uniendo de este modo los polímeros de hidrogel. En algunas realizaciones, los polímeros de hidrogel forman una matriz de hidrogel que tiene poros (por ejemplo, una matriz de hidrogel porosa). Estos poros son capaces de retener material genético suficientemente grande dentro de la perla de hidrogel, pero permiten que materiales pequeños, tales como reactivos, pasen a través de los poros, entrando y saliendo así de las perlas de hidrogel. En algunas realizaciones, el tamaño de poro se afina meticulosamente modificando la relación de la concentración entre el polímero y la concentración de reticulante. En algunas realizaciones, la relación entre el polímero y el reticulante es de 30:1, 25:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20 o 1:30, o una relación dentro de un intervalo definido por dos relaciones cualquiera de las mencionadas anteriormente. En algunas realizaciones, en la matriz polimérica pueden injertarse funciones adicionales, tales como cebadores de ADN, o grupos químicos con carga, para satisfacer las necesidades de las diferentes aplicaciones.

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

Los hidrogeles pueden tener cualquier tamaño de poro. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “tamaño de poro” se refiere a un diámetro o a un diámetro eficaz de una sección transversal de los poros. La expresión “tamaño de poro” también puede referirse a un diámetro promedio o a un diámetro eficaz promedio de una sección transversal de los poros, basándose en las mediciones de una pluralidad de poros. El diámetro eficaz de una sección transversal que no es circular es igual al diámetro de una sección transversal circular que tiene la misma área transversal que la de la sección transversal no circular. En algunas realizaciones, el hidrogel puede hincharse cuando éste se hidrata. Los tamaños del tamaño de los poros pueden cambiar dependiendo del contenido acuoso en el hidrogel. En algunas realizaciones, los poros del hidrogel pueden tener un poro de tamaño suficiente para retener material genético dentro del hidrogel pero permitir el paso de reactivos.

El reticulante es un reticulante reversible. Un reticulante reversible es capaz de reticular reversiblemente el polímero de hidrogel y es capaz de desreticularse en presencia de una escisión. Un reticulante se puede escindir por la presencia de un agente reductor, por temperatura elevada, o por un campo eléctrico. En algunas realizaciones, el reticulante reversible puede ser N,N'-bis(acrilóil)cistamina, un reticulante reversible para geles de poliacrilamida, en donde un enlace disulfuro puede romperse en presencia de un agente reductor adecuado. Como se muestra en las figuras 6A y 6B, la puesta en contacto del reticulante con un agente reductor escinde los enlaces disulfuro del reticulante, rompiendo las perlas de hidrogel. Las perlas de hidrogel se degradan y liberan el contenido, tal como los ácidos nucleicos que quedaron retenidos en las mismas, como se muestra en la figura 7C. En algunas realizaciones, el reticulante se escinde aumentando la temperatura a más de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 °C. El reticulante se escinde poniendo en contacto las perlas de hidrogel con un agente reductor. Los agentes reductores incluyen compuestos de fosfina, fosfinas solubles en agua, fosfinas que contienen nitrógeno y sales y derivados de las mismas, ditióeritritol (DTE), ditiótretol (DTT) (isómeros cis y trans, respectivamente, de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano), 2-mercaptoetanol o β-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetanol o aminoetanetiolo, glutatión, tioglicolato o

ácido tioglicólico, 2,3-dimercaptopropanol, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris(hidroximetil)fosfina (THP) o ácido P[tris(hidroximetil)fosfina]propiónico (THPP).

La elevación de la temperatura para aumentar la difusión o el contacto con un agente reductor degrada el reticulante, liberando de este modo el material genético encapsulado de la perla de hidrogel.

La reticulación del reticulante establece poros dentro de la perla de hidrogel. El tamaño de los poros en las perlas de hidrogel es regulable y se formula para encapsular material genético, tal como células o ácidos nucleicos de más de aproximadamente 300 pares de bases, pero para permitir que partículas más pequeñas, tales como reactivos, o ácidos nucleicos de menor tamaño de menos que aproximadamente 50 pares de bases, tales como cebadores, pasen a través de los poros. Los reactivos incluyen reactivos para procesar material genético, tales como reactivos para aislar ácidos nucleicos de una célula, para amplificar o secuenciar ácidos nucleicos, o para la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos. Los reactivos incluyen, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa de  $\Phi$ 29, polimerasa de Taq, polimerasa de Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótido trifosfatos, tampones, o cationes divalentes.

Las perlas de hidrogel incluyen material genético. El material genético, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a células, microbiomas o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la célula es una célula individual, que incluye una célula procariota o eucariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula bacteriana. En algunas realizaciones, el material genético es una partícula viral. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADN larga, ADN genómico, ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos bacterianos, o ácidos nucleicos de mamíferos. Cualquier material genético puede encapsularse dentro de las perlas de hidrogel.

#### Métodos de fabricación de perlas

En la presente memoria se describen métodos para fabricar perlas que encapsulan material genético. Se prepara una perla de hidrogel mediante emulsión asistida por vórtice. Como se utiliza en la presente memoria, la emulsión asistida por vórtice se refiere a la agitación por vórtice de un polímero de hidrogel con material genético en un recipiente, tal como en un tubo, vial, o recipiente de reacción, como se muestra en las figuras 1A y 1B. Los componentes pueden mezclarse, por ejemplo, mediante agitación por vórtice o agitación manual o mecánica. El mezclado manual da lugar a perlas de hidrogel que encapsulan material genético que tiene un tamaño de 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, o 150  $\mu$ m en diámetro, o un tamaño dentro de un rango definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. El tamaño de las perlas no es uniforme y, por lo tanto, el tamaño de las perlas incluye perlas de varios diámetros.

Las perlas se preparan mediante técnicas de flujo microfluídico. El flujo microfluídico incluye el uso de un dispositivo microfluídico 200 para la generación asistida de emulsiones de gel, como se muestra en la figura 2A. El dispositivo microfluídico 200 incluye microcanales configurados para producir una perla 210 de hidrogel de un tamaño deseado y configurados para encapsular una cantidad seleccionada de material genético por perla. El dispositivo microfluídico 200 tiene una altura de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200  $\mu$ m, o una altura dentro de un rango definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. El dispositivo microfluídico 200 incluye uno o más canales. El dispositivo microfluídico 200 incluye un canal 215 para una corriente acuosa y un canal 220 para un fluido inmiscible. El ancho del uno o más canales es idéntico. El ancho del uno o más canales es diferente. El ancho del uno o más canales es 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150  $\mu$ m, o un ancho dentro de un rango definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. El ancho del canal acuoso es de 75  $\mu$ m. El ancho del canal de fluido inmiscible es de 78  $\mu$ m. Un experto en la técnica reconocerá que el ancho puede variar para ajustar con precisión el tamaño de la perla 210. Además del tamaño del dispositivo microfluídico 200 y el ancho de los canales, el caudal del canal acuoso y el canal de fluido inmiscible también pueden afectar al tamaño de las perlas de hidrogel.

El caudal de la solución en el canal de fase acuosa es de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, o 150  $\mu$ l/min, o un caudal dentro de un rango definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. El caudal del fluido inmiscible en el canal de fluido inmiscible es de 20, 30, 50, 80, 100, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, o 400  $\mu$ l/min, o un caudal dentro de un rango definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente. La solución en la fase acuosa incluye un polímero de hidrogel, un reticulante, y material genético, que fluye a través del canal acuoso 215 hacia un fluido inmiscible, tal como un aceite portador, a un caudal inferior al caudal del fluido inmiscible, formando de este modo gotículas. El fluido inmiscible es aceite, tal como aceite mineral, un aceite de hidrocarburo, un aceite de silicio o un aceite de polidimetilsiloxano, o mezclas de los mismos. Las gotículas de hidrogel que contienen material genético se formulan en una distribución de tamaño uniforme. El tamaño de las perlas de hidrogel se afina meticulosamente ajustando el tamaño del dispositivo microfluídico, el tamaño de uno o más canales, o el caudal de uno o ambos de la solución acuosa o líquido inmiscible. La perla de hidrogel resultante tiene un diámetro que varía de 20 a 150  $\mu$ m, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, o 150  $\mu$ m, o un diámetro dentro de un intervalo definido por dos valores cualesquiera de los mencionados anteriormente.

El tamaño y la uniformidad del material genético que encapsula la perla de hidrogel pueden controlarse además poniendo en contacto el polímero de hidrogel antes de la formación de las perlas con un modificador fluido, tal como con un alcohol, que incluye el alcohol isopropílico. Como se muestra en la figura 3, en ausencia de alcohol isopropílico, las perlas se forman con un diámetro mayor que las perlas formadas en presencia de alcohol isopropílico. El alcohol isopropílico influye en la propiedad fluida del polímero de hidrogel, lo que permite la modulación de las perlas de hidrogel.

Una perla de hidrogel, ya sea preparada mediante emulsión asistida por vórtice o emulsión asistida por flujo inercial microfluídico, encapsula un material genético único o distinto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la perla de hidrogel encapsula una célula individual. La cantidad de material genético dentro de una perla se puede controlar diluyendo o concentrando el material genético dentro de la muestra introducida. La muestra que incluye el material genético se mezcla con el polímero de hidrogel, y el polímero de hidrogel que contiene el material genético se somete a una emulsión asistida por vórtice o a una emulsión asistida por flujo microfluídico como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, las perlas de hidrogel se funcionalizan con un nucleótido. El nucleótido es un oligonucleótido o nucleótido poliT. El nucleótido se une a la perla de hidrogel, y la perla funcionalizada puede utilizarse para la captura dirigida de un nucleótido de interés.

#### Métodos para procesar material genético dentro de perlas de hidrogel

En la presente memoria se describen métodos para procesar material genético dentro de una perla. El material genético encapsulado dentro de una perla de hidrogel se pone en contacto con uno o más reactivos para el procesamiento de ácidos nucleicos. El material genético se retiene dentro de las perlas de hidrogel y los reactivos pueden pasar a través de los poros de las perlas de hidrogel. Los reactivos pueden incluir agentes de lisis, agentes de purificación de ácidos nucleicos, agentes de amplificación de ADN, agentes de tagmentación, agentes de PCR, u otros agentes utilizados en el procesamiento de materiales genéticos. Por lo tanto, las perlas de hidrogel proporcionan un microambiente para reacciones controladas de materiales genéticos dentro de las perlas de hidrogel, lo que permite una barrera para que los reactivos entren y salgan de las perlas de hidrogel, mientras que retienen el mismo material genético dentro de las perlas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “tagmentación” se refiere a la modificación del ADN mediante un complejo transposómico que comprende la enzima transposasa formando un complejo con adaptadores que comprenden la secuencia terminal transposónica. La tagmentación da como resultado la fragmentación simultánea del ADN y el ligamiento de los adaptadores en los extremos 5' de ambas cadenas de los fragmentos dúplex. Después de un paso de purificación para retirar la enzima transposasa, pueden añadirse secuencias adicionales a los extremos de los fragmentos adaptadores, por ejemplo, mediante PCR, ligamiento o cualquier otra metodología adecuada conocida por los expertos en la materia. [0045] La preparación completa de la biblioteca de ADN se puede lograr sin problemas dentro de las perlas de hidrogel con múltiples intercambios de reactivos que atraviesan el hidrogel poroso mientras se retiene el ADN y sus productos de biblioteca dentro de la matriz de hidrogel. El hidrogel puede ser resistente a altas temperaturas de hasta 95 °C durante varias horas para soportar diferentes reacciones bioquímicas.

La perla de hidrogel que encapsula una célula o partícula viral se trata para purificar y aislar los ácidos nucleicos de la célula o partícula. Por lo tanto, por ejemplo, la perla de hidrogel se pone en contacto con un tampón de lisis. Como se utiliza en la presente memoria, “lisis” significa la perturbación o alteración de una pared celular o partícula viral que facilita el acceso o la liberación del ARN o ADN celular. Ni la alteración completa ni la rotura de la pared celular son un requisito esencial para la lisis. Por el término “tampón de lisis” se entiende un tampón que contiene al menos un agente de lisis. Los agentes de lisis enzimáticos típicos incluyen, pero no se limitan a, lisozima, glucolasa, zimolosa, liticase, proteinasa K, proteinasa E, y endolisinas y exolisinas virales. Por lo tanto, por ejemplo, la lisis de las células en las perlas puede realizarse introduciendo agentes de lisis, tales como la lisozima y la proteinasa K, en las perlas de hidrogel. El ADN de las células ahora está contenido dentro de las perlas. En algunas realizaciones, después del tratamiento de lisis, el ácido nucleico aislado se retiene dentro de la perla de hidrogel, y se puede utilizar para un procesamiento posterior.

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

Después de la lisis y el aislamiento de los ácidos nucleicos, se puede realizar amplificación, tal como la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, *multiple displacement amplification*), que es una técnica muy utilizada para amplificar bajas cantidades de ADN, especialmente de células individuales. Los ácidos nucleicos se amplifican, se secuencian o se utilizan para la preparación de bibliotecas de ácido nucleico. Como se utiliza en la presente memoria,

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

Los ácidos nucleicos encapsulados que se aíslan dentro de las perlas de hidrogel pueden amplificarse según cualquier metodología de amplificación adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos encapsulados se amplifican dentro de la perla. La perla se captura en un soporte sólido y se degrada, en donde los ácidos nucleicos encapsulados se liberan sobre el soporte sólido y los ácidos nucleicos se amplifican sobre el soporte sólido.

Los ácidos nucleicos encapsulados se amplifican dentro de las perlas de hidrogel. Por ejemplo, los cebadores y enzimas de amplificación atraviesan los poros de las perlas de hidrogel y se hibridan con los ácidos nucleicos encapsulados.

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

Otros métodos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir tecnologías de extensión y ligamiento de oligonucleótidos, amplificación por círculo rodante (RCA) [Lizardi y col., Nat. Genet. 19:225-232 (1998)], y ensayo de ligamiento de oligonucleótido (OLA) (Ver generalmente la patente US-7.582.420, US-5.185.243, US-5.679.524 y US-5.573.907; EP 0 320 308 B1; EP 0 336 731 B1; EP 0 439 182 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; y WO 89/09835). Se apreciará que estas metodologías de amplificación pueden diseñarse para amplificar ácidos nucleicos encapsulados. Por ejemplo, el método de amplificación puede incluir amplificación de sonda de ligamiento o reacciones de ensayo de ligadura de oligonucleótido (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. El método de amplificación puede incluir una reacción de extensión-ligamiento de cebador que contenga cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés, y que son capaces de atravesar los poros de hidrogel. Como ejemplo no limitativo de extensión de cebadores y cebadores de ligamiento que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores utilizados para el ensayo GoldenGate (Illumina, Inc., San Diego, Calif.) como se ilustra en las patentes US-7.582.420 y US-7.611.869. En cada uno de los métodos descritos, los reactivos y componentes implicados en la reacción del ácido nucleico son capaces de atravesar los poros de la perla de hidrogel mientras retienen el propio ácido nucleico dentro de la perla.

Los ácidos nucleicos encapsulados se amplifican utilizando metodologías de amplificación en grupo como se ejemplifica en las descripciones de la patente US-7.985.565 y US-7.115.400, patente US-7.985.565 y US-7.115.400 describen métodos de amplificación de ácido nucleico, que permiten que los productos de amplificación se inmovilicen sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas por grupos o “colonias” de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Cada grupo o colonia en dicha matriz se forma a partir de una pluralidad de cadenas de polinucleótidos idénticas inmovilizadas y una pluralidad de cadenas de polinucleótidos complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas se denominan generalmente en la presente memoria “matrices agrupadas”. Los productos de reacciones de amplificación en fase sólida, tales como los descritos en las patentes US-7.985.565 y US-7.115.400 son las denominadas estructuras “puente” formadas por el emparejamiento de pares de cadenas de polinucleótidos inmovilizadas y cadenas complementarias inmovilizadas, inmovilizándose ambas cadenas sobre el soporte sólido en



el extremo 5', preferiblemente mediante una unión covalente. Las metodologías de amplificación de grupos son ejemplos de métodos en donde para producir amplicones inmovilizados se utiliza un molde de ácido nucleico inmovilizado. También pueden utilizarse otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de fragmentos de ADN inmovilizados producidos según los métodos proporcionados en la presente memoria.

5 Por ejemplo, pueden formarse uno o más grupos o colonias mediante PCR en fase sólida si uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación se inmovilizan. Los ácidos nucleicos encapsulados se amplifican dentro de las perlas y, a continuación, se depositan en una matriz o en un soporte sólido en un grupo. Por ejemplo, como se muestra en la figura 12, se procesaron perlas de hidrogel que encapsulaban ácidos nucleicos y los ácidos nucleicos contenidos en las mismas se utilizaron para establecer dos bibliotecas de ADN indexadas diferentes. Se prepararon

10 dos tipos de perlas de hidrogel que contenían la biblioteca PhiX, una con índice 2 (CGATGT) y otra con índice 4 (TGACCA). Las perlas de hidrogel con índice 2 e índice 4 se mezclan y se cargan en la celda de flujo. Las perlas se pusieron en contacto con una superficie y se degradaron, y la biblioteca se depositó sobre la superficie. Las micrografías muestran imágenes de ácidos nucleicos, que muestran grupos que se formaron basándose en los entornos separados dentro de perlas separadas. La imagen muestra la separación espacial entre las bibliotecas de

15 índice 2 e índice 4, lo que indica que las bibliotecas se originaron a partir de diferentes perlas de hidrogel. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

Otros métodos de amplificación incluyen amplificación isotérmica. Métodos de amplificación isotérmica ilustrativos que pueden utilizarse incluyen, aunque no de forma limitativa, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) como se ilustra, por ejemplo, en Dean y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002) o la amplificación de ácido nucleico de desplazamiento de cadena isotérmica ilustrada, por ejemplo, por la patente US-6.214.587. Otros métodos no basados en PCR que pueden utilizarse en la presente memoria incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) que se describe, por ejemplo, en Walker y col., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; la patente US-5.455.166 y US-5.130.238, y en Walker y col., Nucl. Acids Res.

20 20:1691-96 (1992) o la amplificación por desplazamiento de cadena hiperramificada que se describe, por ejemplo, en Lage y col., Genome Research 13:294-307 (2003). Los métodos de amplificación isotérmica se pueden utilizar con el fragmento grande de la polimerasa Phi 29 o de la polimerasa de ADN polimerasa Bst que desplaza la cadena, exo 5'->3' para la amplificación por cebadores aleatorios del ADN genómico. El uso de estas polimerasas aprovecha su alta procesividad y actividad de desplazamiento de cadenas. La alta procesividad permite que las polimerasas produzcan fragmentos que tienen una longitud de 10-20 kb. Como se ha expuesto anteriormente, pueden producirse fragmentos más pequeños en condiciones isotérmicas utilizando polimerasas que tienen baja procesividad y actividad de desplazamiento de cadena tal como la polimerasa Klenow. Una descripción adicional de reacciones, condiciones y componentes de amplificación, se expone en detalle en la descripción de la patente US-7.670.810. Las polimerasas, los reactivos y los componentes requeridos para realizar estas reacciones de amplificación son capaces de atravesar

25 los poros de las perlas de hidrogel para interactuar con los ácidos nucleicos encapsulados, amplificando de este modo los ácidos nucleicos dentro de las perlas de hidrogel. Los hexámeros aleatorios se emparejan con el ADN desnaturizado seguido de la síntesis de desplazamiento de cadena a una temperatura constante en presencia de una enzima catalizadora, Phi 29. Esto da lugar a la amplificación de ADN dentro de las perlas como se confirma por un aumento en la intensidad de fluorescencia (el ADN se tiñó con SYTOX) después de MDA (figura 9, panel a). Independientemente, también puede realizarse tagmentación basada en Nextera después de la lisis y limpieza y posterior amplificación de ADNg mediante PCR, como lo indica un aumento sustancial de la intensidad de fluorescencia dentro de las perlas después de la tagmentación Nextera y la PCR (figura 9, panel b). Después de esta preparación de la biblioteca Nextera, las perlas de gel pueden calentarse hasta 80 °C durante 3 minutos para liberar el contenido de las perlas, es decir, los productos de la biblioteca listos para secuenciar de células individuales, como se muestra en la figura 9, panel c.

30

35

40

45

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

50

Los ácidos nucleicos encapsulados se secuencian en total o en parte dentro de las perlas de hidrogel. Los ácidos nucleicos encapsulados pueden secuenciarse según cualquier metodología de secuenciación adecuada, tal como secuenciación directa, que incluye secuenciación por síntesis, secuenciación por ligamiento, secuenciación por hibridación, secuenciación de nanoporos y similares. Como se muestra esquemáticamente en la figura 8B, las células individuales encapsuladas dentro de una perla de hidrogel pueden procesarse para la secuenciación de células individuales.

55

60

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

65

cebador) de una manera dependiente del molde, de modo que, para determinar la secuencia del molde, pueda utilizarse la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador.

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

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

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

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

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

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

En los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación, como se describe en la presente memoria, se utilizan diversos reactivos para el aislamiento y la preparación de ácido nucleico. Dichos reactivos pueden incluir, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa de  $\Phi$ 29, polimerasa de Taq, polimerasa de Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótido trifosfatos, tampones o cationes divalentes. Estos reactivos atraviesan los poros de las perlas de hidrogel, mientras que el material genético queda retenido dentro de las perlas de hidrogel. Una ventaja de los métodos expuestos en la presente memoria es que proporcionan un microambiente encapsulado para el procesamiento de ácidos nucleicos dentro de una perla de hidrogel. Esto permite el procesamiento de células individuales para un procesamiento rápido y eficiente de un ácido nucleico diana.

Los adaptadores pueden incluir sitios de cebadores de secuenciación, sitios de cebadores de amplificación e índices. Como se utiliza en el presente documento, un “índice” puede incluir una secuencia de nucleótidos que puede utilizarse como un identificador molecular y/o código de barras para etiquetar un ácido nucleico y/o para identificar la fuente de un ácido nucleico. En algunas modalidades, puede utilizarse un índice para identificar un ácido nucleico individual, o una subpoblación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las bibliotecas de ácidos nucleicos se pueden preparar dentro de una perla de hidrogel. Como se muestra esquemáticamente en la figura 8A, una célula individual encapsulada dentro de una perla de hidrogel puede utilizarse para la indexación combinatoria de las células individuales, por ejemplo, utilizando un enfoque de transposición que preserva la contigüidad (CPTSeq). En algunas realizaciones, como se muestra esquemáticamente en la figura 8C, un ADN de una célula individual puede codificarse mediante la encapsulación de células individuales después de la amplificación por WGA con otra perla que transporta transposones codificados con códigos de barras y que disuelven la matriz de gel poniéndolo en contacto con un agente reductor, por ejemplo, para liberar el ADN genómico para la codificación de barras.

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

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

#### Preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos con perlas de hidrogel

Algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen métodos en los que los adaptadores se ligan a los ácidos nucleicos diana. Los adaptadores pueden incluir sitios de unión de cebadores de secuenciación, sitios de unión de cebadores de amplificación e índices. Por ejemplo, un adaptador puede incluir una secuencia P5, una secuencia P7 o un complemento de las mismas. Como se utiliza en la presente memoria, una secuencia P5 comprende una secuencia definida por la sec. con núm. de ident.: 1 (AATGATACGGCGACCA) y una secuencia P7 comprende una secuencia definida por la sec. con núm. de ident.: 2 (CAAGCAGAAGACGGCATACGA). La secuencia P5 o P7 puede incluir además un polinucleótido espaciador, que puede tener de 1 a 20, tal como de 1 a 15, o de 1 a 10, nucleótidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el espaciador incluye 10 nucleótidos. El espaciador es un espaciador poliT, tal como un espaciador 10T. Los nucleótidos espaciadores pueden incluirse en los extremos 5' de los polinucleótidos, que pueden unirse a un soporte adecuado mediante un enlace con el extremo 5' del polinucleótido. Una unión puede lograrse a través de un nucleófilo que contiene azufre, tal como fosforotioato, presente en el extremo 5' del polinucleótido. El polinucleótido incluirá un espaciador poliT y un grupo fosforotioato 5'. Por lo tanto, la secuencia P5 es 5'fosforotioato-TTTTTTTTAATGATGCGACCA-3', sec. con núm. de ident.: 3 y la secuencia P7 es 5'fosforotioato-TTTTTTTTAATGATACGGCGACCA-3, sec. con núm. de ident.: 4.

Los índices pueden ser útiles para identificar la fuente de una molécula de ácido nucleico. Un adaptador puede modificarse para impedir la formación de concatámeros, por ejemplo, mediante la adición de grupos de bloqueo que impidan la extensión del adaptador en uno o ambos extremos. Como ejemplos de grupos de bloqueo en 3' se incluyen

un C3 espaciador en 3', un didesoxinucleótido y una unión a un sustrato. Como ejemplos de grupos de bloqueo en 5' se incluyen un nucleótido desfosforilado en 5' y la unión a un sustrato.

Los adaptadores incluyen ácidos nucleicos, tal como ácidos nucleicos monocatenarios. Los adaptadores pueden incluir ácidos nucleicos cortos que tengan una longitud menor que, mayor que o igual a aproximadamente 5 nucleótidos, 10 nucleótidos, 20 nucleótidos, 30 nucleótidos, 40 nucleótidos, 50 nucleótidos, 60 nucleótidos, 70 nucleótidos, 80 nucleótidos, 90 nucleótidos, 100 nucleótidos o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunas realizaciones, los adaptadores son de tamaño suficiente para atravesar los poros de las perlas de hidrogel. Los ácidos nucleicos diana incluyen ADN, tal como ADN genómico o ADNc; ARN, tal como ARMm, ARNp o ARNr; o un híbrido de ADN y ARN. El ácido nucleico se puede aislar de una célula individual encapsulada dentro de una perla de hidrogel. Un ácido nucleico puede contener enlaces fosfodiéster, y puede incluir otros tipos de cadenas principales, que comprendan, por ejemplo, fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita y cadenas principales y enlaces peptídicos de ácido nucleico. Un ácido nucleico puede contener cualquier combinación de desoxirribosa y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina y análogos de bases tales como nitropirrol (incluyendo 3-nitropirrol) y nitroindol (incluyendo 5-nitroindol). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede incluir al menos una base promiscua. Una base promiscua puede emparejarse con más de un tipo diferente de base y puede ser útil, por ejemplo, cuando se incluye en cebadores de oligonucleótidos o insertos que se utilizan para la hibridación aleatoria en muestras complejas de ácido nucleico tales como muestras de ADN genómico. Un ejemplo de una base promiscua incluye inosina que puede emparejarse con adenina, timina o citosina. Otros ejemplos incluyen hipoxantina, 5-nitroindol, 5-nitroindol acíclico, 4-nitropirazol, 4-nitroimidazol y 3-nitropirrol. Pueden utilizarse bases promiscuas que puedan emparejarse con al menos dos, tres, cuatro o más tipos de bases.

Los ácidos nucleicos diana pueden incluir una muestra en la que el tamaño promedio de un ácido nucleico en la muestra sea menor que, mayor que o igual a aproximadamente 2 kb, 1 kb, 500 pb, 400 pb, 200 pb, 100 pb, 50 pb, o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunas realizaciones, el tamaño promedio de un ácido nucleico en la muestra es menor que, mayor que o igual a aproximadamente 2000 nucleótidos, 1000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 400 nucleótidos, 200 nucleótidos, 100 nucleótidos, 50 nucleótidos o un intervalo entre dos de los tamaños anteriores. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es de un tamaño suficiente para que el ácido nucleico quede atrapado dentro de la perla de hidrogel de modo que no pueda pasar a través de los poros de la perla de hidrogel.

Un método de ejemplo incluye desfosforilar los extremos 5' de los ácidos nucleicos diana para impedir la formación de concatámeros en pasos de ligamiento posteriores; ligar los primeros adaptadores a los extremos 3' de las dianas desfosforiladas utilizando una ligasa, en la que se bloquean los extremos 3' de los primeros adaptadores volver a fosforilar los extremos 5' de las dianas ligadas; ligar un segundo adaptador a los extremos 5' de las dianas desfosforiladas utilizando la ligasa monocatenaria, en la que los extremos 5' de los segundos adaptadores no están fosforilados.

Otro ejemplo incluye la digestión parcial del ácido nucleico con una exonucleasa 5' para formar un ácido nucleico bicatenario con salientes 3' monocatenarios. Un adaptador que contiene un grupo bloqueante 3' puede ligarse a los extremos 3' del ácido nucleico bicatenario con salientes 3'. El ácido nucleico bicatenario con salientes 3' con adaptadores ligados puede deshibridarse para formar ácidos nucleicos monocatenarios. Un adaptador que contiene un extremo 5' no fosforilado puede ligarse al extremo 5' del ácido nucleico monocatenario.

Como un método para desfosforilar ácidos nucleicos, tales como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, se incluye poner en contacto un ácido nucleico con una fosfatasa. Como ejemplos de fosfatasas se incluyen fosfatasa intestinal de ternera, fosfatasa alcalina de camarón, fosfatasa antártica, y fosfatasa alcalina APEX (Epicentre).

Como un método para ligar ácidos nucleicos se incluye poner en contacto los ácidos nucleicos con una ligasa. Como ejemplos de ligasas se incluyen ARN ligasa 1 de T4, ARN ligasa 2 de T4, ligasa de RtcB, ARN ligasa de *Methanobacterium* y ARN ligasa de TS2126 (CIRCLIGASA).

Como un método para fosforilar ácidos nucleicos, tal como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, se incluye poner en contacto un ácido nucleico con una cinasa. Como ejemplo de cinasa se incluye la polinucleótido cinasa T4.

Las realizaciones proporcionadas en la presente memoria se refieren a la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos en una perla de hidrogel, de modo que la biblioteca de ácidos nucleicos se prepare en un único volumen de reacción.

Las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen kits, que contienen uno o más de los polímeros de hidrogel, reticulantes, o dispositivos microfluídicos para preparar perlas de hidrogel que encapsulan material genético, e incluyen además componentes útiles para el procesamiento del material genético, que incluye los reactivos para la lisis celular, y la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, o para la preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos, que incluyen lisozima, proteína K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa de  $\Phi$ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótidos trifosfatos, tampones, o cationes

divalentes tal como se describe en la presente memoria y tal como se utiliza para el procesamiento respectivo del material genético.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Preparación de perlas de hidrogel

El siguiente ejemplo demuestra una realización de preparación de perlas de hidrogel que encapsulan células microbianas utilizando agitación por vórtice manual y generadores de gotículas microfluídicas.

Las muestras que contenían una o más de *E. coli*, *B. subtilis* y *A. hydrophila* almacenadas a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente. Se transfirieron 100 µl de cada solución bacteriana a un tubo estéril de 1,7 ml y la muestra se lavó una vez con 1 ml de NaCl al 0,85 %. La muestra se granuló y la solución de lavado se retiró. El sedimento de bacterias se guardó para mezclarlo con la solución de hidrogel que se describe a continuación.

Se preparó una solución de hidrogel al 12 % a partir de acrilamida al 40 %/bis 19:1 (BioRad 4161-0144) diluida con agua desionizada. Se preparó una solución madre de monómero de acrilamida/N, N'-bis(acrilóil)cistamina (BaCy) (19:1) al 40 % (p/v) (3,8 g de acrilamida, 0,2 g de BaCy y 6 ml de (dd) H<sub>2</sub>O doblemente destilada). La mezcla se llevó a un volumen final de 10 ml. Para preparar la solución, la acrilamida se disolvió en 6 ml de ddH<sub>2</sub>O y la solución resultante se utilizó para disolver el BACy. La disolución de los monómeros es endotérmica, por lo que calentar ligeramente la mezcla ayudará a disolver completamente los monómeros. La solución de hidrogel se mantuvo a 4 °C hasta su uso. 35 µl de solución saturada de persulfato de potasio (KPS; Sigma) se añadió a 200 µl de la solución de hidrogel al 12 % y se mezcló bien. La solución de 235 µl de hidrogel-KPS se añadió a cada tubo que contenía gránulos de célula bacteriana para resuspender las células. La solución de hidrogel-bacteria se cargó después en 600 µl de aceite mineral con surfactante (4,5 % de Span 80, 0,4 % de Tween 20 y 0,05 % de Triton X-100). La solución se agitó por vórtice durante 30 segundos para generar una emulsión en gotículas y se añadió 25 µl de tetrametilendiamina (TEMED; Sigma) inmediatamente, seguido de otros 30 segundos de agitación por vórtice.

Para hacer un gel al 10 % con una relación acrilamida/BACy de 19:1 (2 ml), se mezclaron 0,96 ml de ddH<sub>2</sub>O, 0,5 ml de acrilamida al 40 %/acrilamidaBACy (19:1), 0,5 ml de tampón Tris/borato/EDTA (TBE) 10 veces, 20 µl de TEMED y 20 µl de KPS (saturado).

Para hacer un gel al 5 % con una relación acrilamidaBACy de 19:1 (2 ml), se mezclaron 1,21 ml de ddH<sub>2</sub>O, 0,25 ml de acrilamida/BACy al 40 % (19:1), 0,5 ml de regulador de TBE 10 veces, y 20 µl de TEMED y 20 µl de KPS (saturado). La reacción se dejó polimerizar hasta la gelificación (~3-6 min).

Después, se generaron perlas de hidrogel que encapsulaban las células bacterianas. Tras la incubación durante 15 minutos para permitir que las perlas de hidrogel se reticularan por completo, se añadieron aproximadamente 900 µl de éter de petróleo a cada tubo. Los tubos se agitaron con vórtice para lavar el aceite y se retiró el sobrenadante. Las perlas de hidrogel se lavaron añadiendo 1 ml de PR2 a cada tubo, después se agitaron por vórtice y se hicieron girar las perlas. Se retiró el sobrenadante y las perlas se lavaron tres veces con 1 ml de PR2. Las perlas se resuspendieron en 1 ml de PR2. Las perlas de hidrogel en PR2 se pueden almacenar a 4 °C durante al menos 3 semanas.

El método descrito anteriormente utilizando una emulsión manual se puede utilizar para generar perlas de hidrogel que tenían una distribución de tamaños de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 100 µm de diámetro.

Para generar perlas de hidrogel de una distribución de tamaño uniforme, se pueden utilizar generadores de gotículas microfluídicas, tales como los generadores ilustrados en la figura 2. Para formar perlas de hidrogel con una distribución de tamaño uniforme, se introdujo una solución acuosa que contenía un polímero de hidrogel y una célula bacteriana en el aceite mineral en un generador de gotículas microfluídicas. El dispositivo microfluídico tenía una altura de 120 µm con un ancho de canal acuoso de 75 µm y un ancho de canal de aceite portador de 78 µm. Con este chip, se utilizaron caudales de 60 µl/min para el canal acuoso y 300 µl/min para el canal de aceite portador. Utilizando este dispositivo, se generaron perlas de hidrogel de aproximadamente 90 µm de diámetro. El tamaño de las perlas se puede ajustar con precisión ajustando los anchos de los canales, el tamaño del dispositivo microfluídico, y los caudales.

Además, el diámetro de la perla se puede ajustar meticulosamente con la adición de alcohol isopropílico. Como se muestra en la figura 3, se puede añadir alcohol isopropílico a la solución de hidrogel en una cantidad específica (que varía del 0 % a aproximadamente el 30 % v/v), para formar perlas de hidrogel de un diámetro particular. Como se muestra en la figura 3, al aumentar la cantidad de alcohol isopropílico se reduce el diámetro de la perla de hidrogel, de 130 µm (con alcohol isopropílico al 0 %) a aproximadamente 75 µm de diámetro (con alcohol isopropílico al 28 %).

Las perlas de hidrogel también se pueden ajustar meticulosamente para encapsular una cantidad deseada de células. Como se muestra en las figuras 4A y 4B, se encontró que había numerosas células bacterianas teñidas en cada perla de hidrogel de aproximadamente 100 µm (figura 4A), mientras que solo se cargó una célula individual, o unas pocas células, en cada perla de hidrogel de aproximadamente 10 µm (figura 4B).

Además, la velocidad de gelificación de las perlas de hidrogel también puede determinar la cantidad de células en cada perla de hidrogel. Las perlas de hidrogel se prepararon en presencia de fibroblastos de ratón NIH-3T3. Como se muestra en las figuras 6A y 6B, la gelificación rápida de las perlas de hidrogel dio lugar a una célula individual por perla (figura 6A), mientras que la gelificación lenta da lugar a unas pocas células por perla (figura 6B).

#### Ejemplo 2 - Perlas de hidrogel funcionalizadas con nucleótidos

El siguiente ejemplo demuestra el método para funcionalizar las perlas de hidrogel del ejemplo 1 con nucleótidos.

Las perlas de hidrogel funcionalizadas con ADN se obtuvieron utilizando química de cicloadición de azida-alquino (CuAAC) catalizada por cobre, haciendo reaccionar perlas de hidrogel funcionalizadas con azida con ADN funcionalizado con alquino (figura 5A). Para la síntesis de perlas de hidrogel funcionalizadas con azida, se mezcló una mezcla de precursores de hidrogel que incluía monómeros, reticulantes, y generadores de radicales y se generaron perlas de hidrogel monodispersas con microfluidos. Las perlas de hidrogel se doparon con BrAPA en una concentración que variaba del 0 % al 8 %. Los bromuros se acidificaron posteriormente para convertir los grupos Br en grupos azida (N3). Los hidrogeles acidificados se hicieron reaccionar después con oligonucleótidos modificados con alquino utilizando la química de CuAAC. Las perlas de hidrogel sin acidificación no tenían ningún oligonucleótido injertado en las perlas (figura 5B, "Original"). Por otro lado, las perlas de hidrogel que se acidificaron tenían oligonucleótidos injertados en las perlas de hidrogel (figura 5B, "Acidificada (N3)"). La densidad de los oligonucleótidos injertados se correlacionó directamente con el porcentaje de BrAPA añadido en la mezcla precursora de hidrogel.

Estas perlas funcionalizadas con oligonucleótidos se utilizaron para capturar el ARNm de las células. Las perlas de hidrogel se funcionalizaron con un oligonucleótido poliT (figura 5C). Las perlas de hidrogel funcionalizadas con PoliT se mezclaron con células. Las células se lisaron posteriormente y las perlas se recogieron y se lavaron. La síntesis de la segunda cadena se realizó para producir ADNc a partir del ARNm capturado. Como se muestra en la figura 5D, los electrocromatogramas muestran la traza del ADNc con su complemento (curva derecha), y el dúplex de ADNc se tagmentó entonces con Nextera. El ADN tagmentado (curva izquierda) se desplazó a un peso molecular más bajo como se esperaba debido a la tagmentación.

#### Ejemplo 3 - Liberación de material genético a partir de perlas de hidrogel

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad de las perlas de hidrogel que tienen material genético encapsulado en las mismas para liberar el contenido tras la escisión reversible del agente de reticulación.

Se prepararon perlas de hidrogel que encapsulaban células bacterianas según el ejemplo 1. Las perlas de hidrogel incluyen reticulantes de bisacrilamida que contienen enlaces disulfuro. Las perlas se tiñeron con colorante para la visualización de las células bacterianas. Como se muestra en la figura 6C, las perlas de hidrogel en ausencia de un agente reductor eran capaces de retener las células bacterianas. Sin embargo, al entrar en contacto con un agente reductor, en este caso el THP, las bacterias se liberaron de las perlas de hidrogel.

#### Ejemplo 4 - Preparación de la biblioteca de ácidos nucleicos en perlas de hidrogel

El siguiente ejemplo demuestra el proceso para secuenciar ácidos nucleicos a partir de material genético encapsulado dentro de perlas de hidrogel.

Se obtuvieron perlas de hidrogel tal como se prepararon en el ejemplo 1 y los ácidos nucleicos se aislaron de la siguiente manera. Se transfirieron 50 µl de solución de la perla de hidrogel que encapsulaba E. coli a un tubo de 200 µl (con aproximadamente 50 perlas/µl). Las perlas se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 100 µl de reactivo de lisis bacteriana (Thermo Fisher Scientific, 0,5 mg de lisozima en 100 µl de tampón de resuspensión del kit Charge Switch) al tubo, y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Después, se añadieron 500 ml de reactivo de proteinasa K y se incubaron a 55 °C durante 20 minutos para digerir completamente las proteínas. En este paso, el ADNg de E. coli quedó expuesto pero se fijó dentro de la matriz de hidrogel. Las perlas que retenían el ADNg bacteriano se lavaron con PR2 y se recogieron las perlas de hidrogel. Después, se añadió el reactivo de transposoma Tn5 (Nextera, Illumina, Inc.) al tubo y se incubó a 55 °C durante 5 minutos. Los adaptadores que contenían los extremos p5 y p7 se insertaron en el ADN después de este paso. Después, se cargan 50 µl de tampón de parada para eliminar las enzimas Tn5. Se añadió una mezcla de extensión con polimerasa Bsu y nucleótidos para rellenar huecos. Después de este paso, la biblioteca de ácidos nucleicos estaba lista y fijada dentro de la matriz de perlas de hidrogel. Estos mismos pasos se repitieron para cada una de las perlas de hidrogel de B. subtilis y A. hydrophila para lisar las células bacterianas y terminar la preparación de la biblioteca para las perlas de hidrogel respectivas. Como se muestra en la figura 10, las perlas de hidrogel que tenían la biblioteca de ADN producida en las mismas se sembraron en una superficie y las bibliotecas de ADN se liberaron. La figura 10, panel a) muestra hidrogeles con genoma tagmentado cargados sobre una superficie injertada con P5/P7. La figura 10, panel b) muestra un ADN monocatenario que se eluye, se siembra y se amplifica mediante puente isotérmico, y se tiñe. La figura 10, panel c) representa gradientes de densidad de grupos, desde alta densidad a menor densidad (de izquierda a derecha), indicando una mayor densidad la ubicación en la superficie donde inicialmente aterrizó el hidrogel.

Este ejemplo demuestra la preparación de perlas de hidrogel que encapsulan una célula bacteriana individual dentro de una perla de hidrogel, que se puede utilizar para procesar el genoma bacteriano y realizar la preparación de una biblioteca de ADN completa dentro de la perla. El tamaño de poro del hidrogel se diseñó para permitir la difusión de enzimas, productos químicos y cebadores de menor tamaño (<50 bps), pero retuvo el ADN de mayor tamaño (>300 bps) de modo que el ADN genómico completo intacto y la biblioteca de ADN producida se retuvieron dentro de las perlas de gel durante todo el proceso. La biblioteca de ADN de una bacteria individual puede entonces liberarse en un área específica, por ejemplo, en la superficie de la celda de flujo para la siembra de la biblioteca. Posteriormente, esto da lugar a una distribución espacial de "grupos de ADN" en la celda de flujo que se originan en células bacterianas individuales, lo que simplifica la alineación de la lectura durante el procesamiento posterior.

#### Ejemplo 5 - Secuenciación de ácidos nucleicos a partir de perlas de hidrogel

El siguiente ejemplo demuestra la secuenciación de la biblioteca de ADN a partir de perlas de hidrogel que encapsulan material genético.

La biblioteca de ADN preparada a partir del ejemplo 4 se liberó del hidrogel y se depositó sobre una superficie. El ADN fragmentado se eluyó de los hidrogeles. La muestra de control se guardó sin tratamiento térmico. Ambas muestras se enriquecieron mediante una reacción de PCR de 12 ciclos y se analizaron en un bioanalizador para determinar la distribución de los fragmentos. Tras una doble limpieza con Ampure, los fragmentos de *E. coli* se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA). Como se muestra en la figura 11A, los fragmentos de ADN que se eluyeron del hidrogel tenían una distribución de tamaños de fragmentos con un tamaño promedio de aproximadamente 350 pb. Por el contrario, la muestra mostrada en la figura 11B que no se trató térmicamente no mostró ningún fragmento incluso después de la reacción de PCR de 12 ciclos, lo que indica que los fragmentos no se liberaron de las perlas de hidrogel. Los fragmentos se secuenciaron y el 98 % de las secuencias se alinearon con enterobacterias y el 39 % de las secuencias se alinearon con *A. coli*.

#### Ejemplo 6 - Indexación espacial

El siguiente ejemplo demuestra la indexación espacial de bibliotecas de ADN preparadas dentro de perlas de hidrogel.

Para demostrar la separación espacial entre los diferentes tipos de bacterias, se eligieron *E. coli*, *B. subtilis* y *A. hydrophila* como organismo modelo. Cada microorganismo estaba incrustado en su propio grupo de perlas de hidrogel. Cada tipo de perla que contenía un solo tipo de microorganismo se procesó por separado mediante un tratamiento de lisis, y a cada especie se le añadió su propio índice único durante el protocolo de preparación de la biblioteca. Las tres perlas de hidrogel diferentes que portaban la biblioteca de ADN de *E. coli*, *B. subtilis* y *A. hydrophila* se mezclaron después en el mismo tubo. Las perlas de hidrogel se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 100 ml de aceite mineral con surfactante (4,5 % de Span 80, 0,4 % de Tween 20 y 0,05 % de Triton X-100) a las perlas y se agitaron por vórtice durante 30 segundos para resuspender las perlas en el aceite. Después se cargaron 25 µl de la solución de perlas de reemulsión de aceite en una celda de flujo MiSeq. La temperatura de la celda de flujo MiSeq se elevó hasta 90 °C durante 3 minutos para desnaturalizar la biblioteca de ADN y la biblioteca desnaturalizada se difundió fuera de las perlas de hidrogel, seguida de 60 °C durante 6 minutos, 40 °C durante 2 minutos y 20 °C durante 2 minutos para permitir que la biblioteca de ADN monocatenario se hibridara con los cebadores P5/P7 de la superficie para la amplificación por grupos. La biblioteca sembrada se agrupó, se linealizó y se secuenció en la primera base, y los resultados se muestran en la figura 13. Como se muestra en la figura 13, la biblioteca de ADN dentro de las perlas de hidrogel pudo difundirse fuera de las perlas y unirse a la celda de flujo MiSeq, donde la amplificación se produjo en la celda de flujo en distintos grupos para cada organismo.

La celda de flujo MiSeq sembrada con una biblioteca generada en perlas de hidrogel con estos tres microorganismos diferentes se secuenció más adelante en MiSeq (ejecución de 2 × 150 ciclos). El análisis de secuenciación, tal como se muestra en las figuras 14A-14B, muestra que la ejecución se completó con una calidad razonable. Se detectó cada una de las tres especies diferentes. La longitud de lectura generada a partir de bibliotecas liberadas en hidrogel tenía un rango de tamaño muy similar, lo que demuestra que el tamaño de los fragmentos de la biblioteca que se liberaron del hidrogel puede controlarse mediante la composición del hidrogel y el protocolo de liberación de ADN. También se añadió una biblioteca de control PhiX para comprobar la calidad de la ejecución. Las figuras 15A-15C muestran el resultado de la secuenciación MiSeq de la siembra de celdas de flujo con perlas de hidrogel que contienen bacterias *E. coli*, *B. subtilis* o *A. Hydrophila*, que incluye los datos sin procesar de la imagen MiSeq (figura 15A), los grupos que se alinearon con el genoma específico (figura 15C) y una tabla resumida del filtro de paso de tres especies bacterianas diferentes (figura 15C).

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

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



# REIVINDICACIONES

1. Un método para encapsular material genético dentro de una perla de hidrogel que comprende:

mezclar una célula con un polímero de hidrogel en solución, en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato u PEG/óxido de polipropileno (PPO);  
mezclar la solución con un fluido inmiscible para formar una perla de hidrogel que encapsula la célula; y

poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla para liberar material genético de la célula;

en donde la perla de hidrogel comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, y en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases.

2. Un método para encapsular material genético dentro de una perla de hidrogel que comprende:

mezclar una solución acuosa que comprende un polímero de hidrogel y una célula con un fluido inmiscible, en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato o PEG/óxido de polipropileno (PPO);

introducir la solución acuosa en un generador de gotículas;

generar una perla de hidrogel que encapsula la célula; y

poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla para liberar el material genético de la célula;

en donde la perla de hidrogel comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, y en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases.

3. Un método para preparar una biblioteca de ácidos nucleicos a partir de material genético encapsulado dentro de una perla de hidrogel, que comprende:

obtener una perla de hidrogel para realizar reacciones de ácido nucleico, en donde la perla de hidrogel comprende:

un polímero de hidrogel; y

una célula que incluye material genético dispuesto dentro de la perla de hidrogel;

en donde la perla comprende poros que permiten la difusión de los reactivos dentro y fuera de la perla de hidrogel mientras retienen el material genético, en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases; y

en donde el polímero de hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato u PEG/óxido de polipropileno (PPO);

poner en contacto la perla de hidrogel con un tampón de lisis para lisar la célula dentro de la perla y liberar el material genético de la célula y extraer los ácidos nucleicos;

amplificar el material genético encapsulado dentro de la perla;

realizar una reacción de tagmentación en el material genético encapsulado dentro de la perla; y

secuenciar el material genético, generando de este modo una biblioteca de ácidos nucleicos encapsulada dentro de la perla.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la célula se lisa con lisozima y se trata con proteinasa K para extraer ácidos nucleicos.

5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto material genético con una mezcla de transposasas que comprende secuencias adaptadoras y transposomas.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende además sembrar la biblioteca de ácidos nucleicos sobre un soporte sólido, opcionalmente;

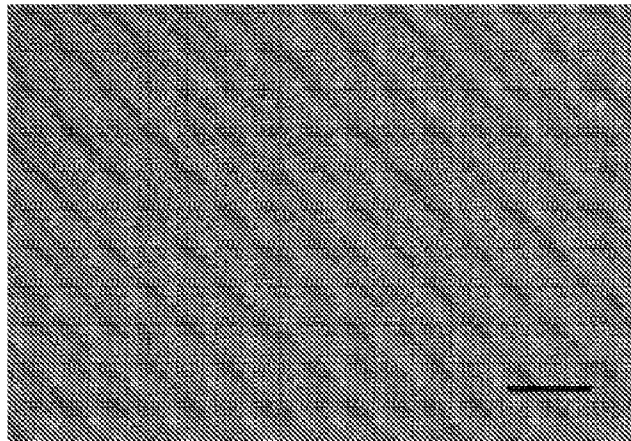
en donde la siembra comprende degradar la perla para liberar la biblioteca de ácidos nucleicos de la perla, opcionalmente;

en donde la perla se degrada al poner en contacto la perla con una mezcla de escisión o al calentar la perla hasta aproximadamente 90 °C para liberar la biblioteca de ácidos nucleicos, opcionalmente; en donde la mezcla de escisión comprende ditiotreitól (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), o tris(3-hidroxipropil)fosfina (THP).

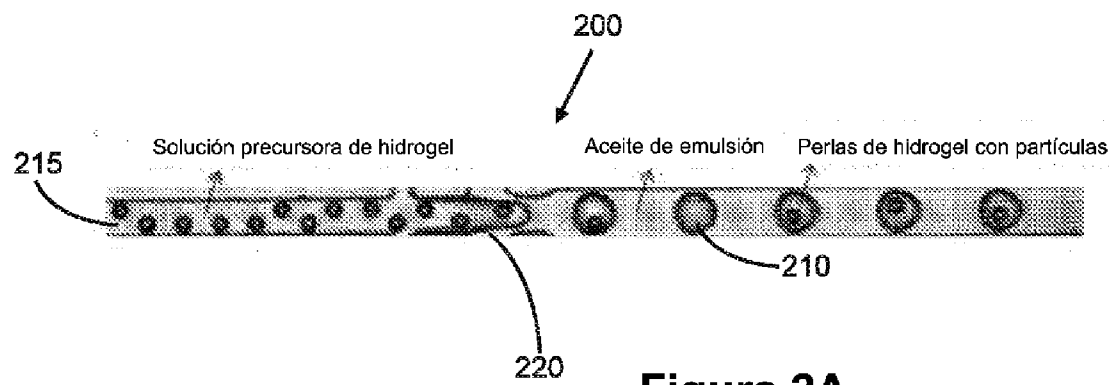
7. El método de la reivindicación 6, en donde el soporte sólido es un dispositivo de celda de flujo.
- 5 8. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la célula es una célula de mamífero o una célula bacteriana.
9. Los métodos de la reivindicación 8, en donde la célula es una célula de *Escherichia coli*, una célula de *Bacillus subtilis*, una célula de *Aeromonas hydrophila*, o una célula de fibroblastos.
- 10 10. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el reactivo comprende lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (ADN polimerasa de  $\Phi 29$ , polimerasa Tag, polimerasa Bsu), transposasa (Tn5), cebadores (secuencias adaptadoras P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, desoxinucleótidos trifosfatos, tampones, o cationes divalentes.
- 15 11. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la relación entre polímero y agente de reticulación es de 19:1.
12. Los métodos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la perla tiene un diámetro de 10  $\mu\text{m}$ .



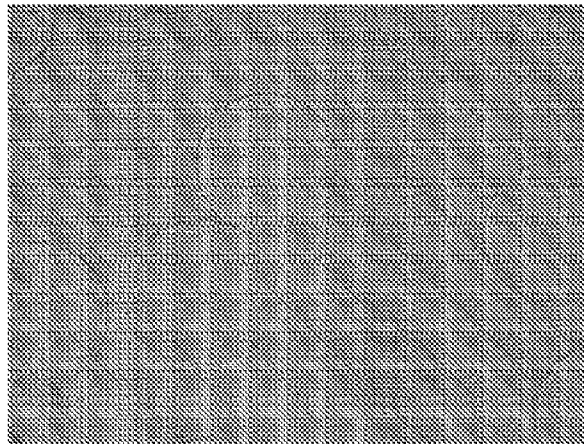
**Figura 1A**



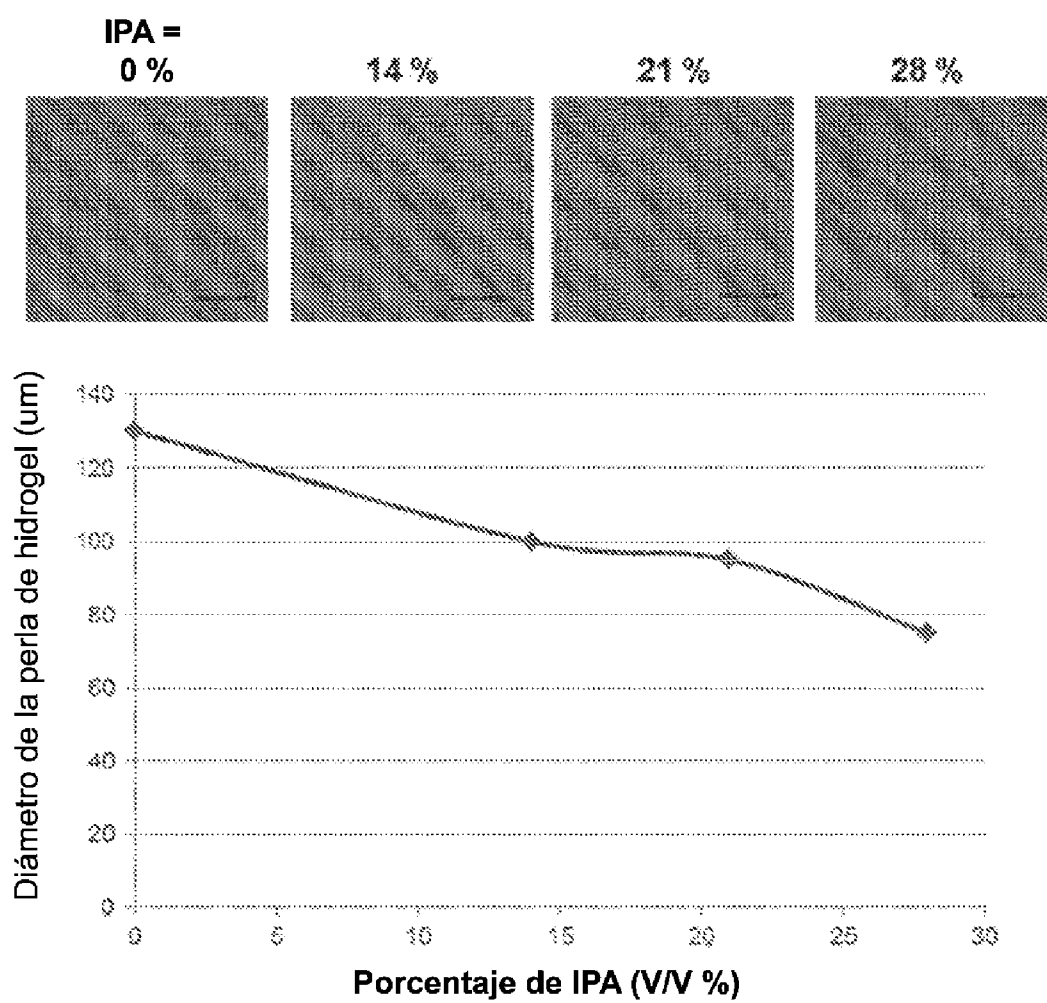
**Figura 1B**



**Figura 2A**

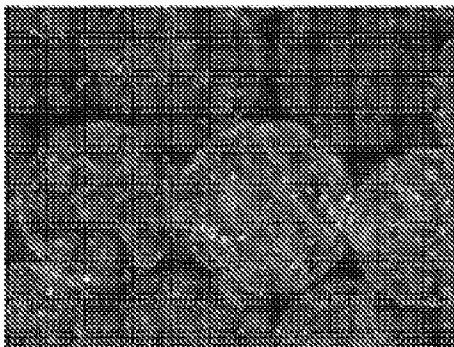


**Figura 2B**



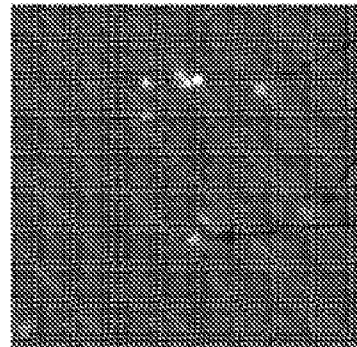
**Figura 3**

**Perlas 100 $\mu$ M**



**Figura 4A**

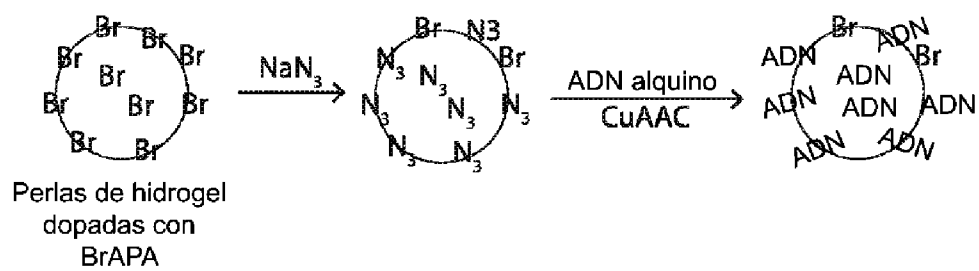
**Perlas 10 $\mu$ M**



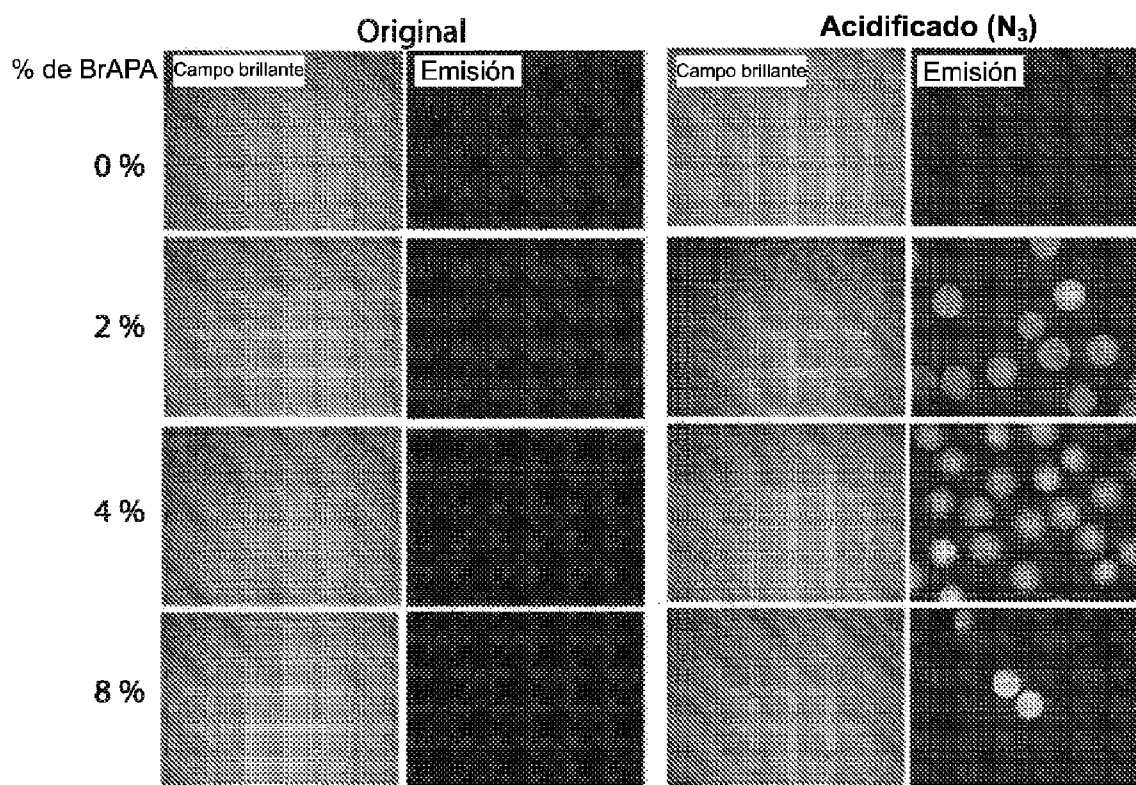
Célula individual

2 células

**Figura 4B**



**Figura 5A**



**Figura 5B**

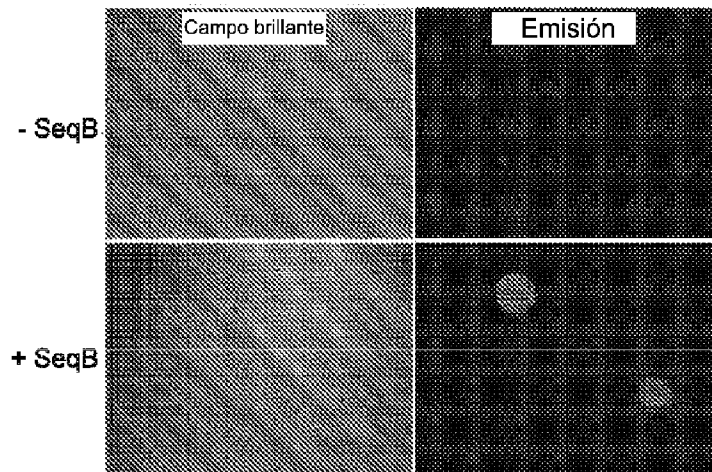
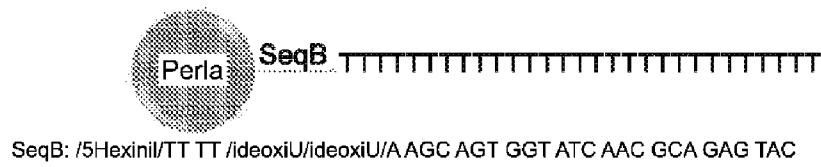


Figura 5C

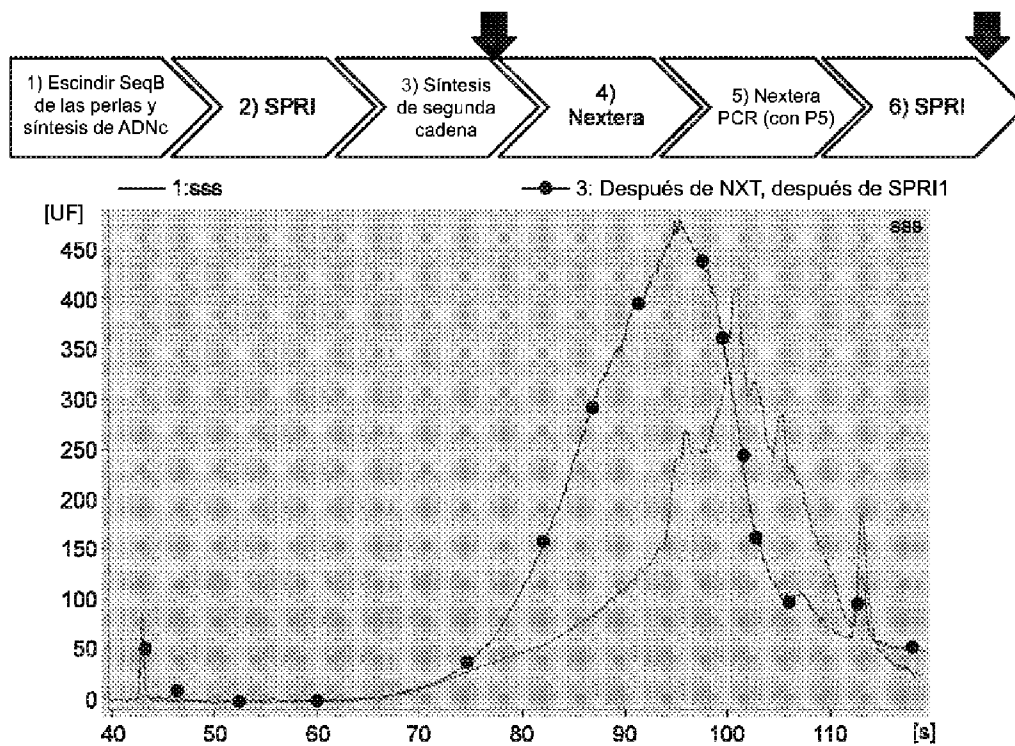
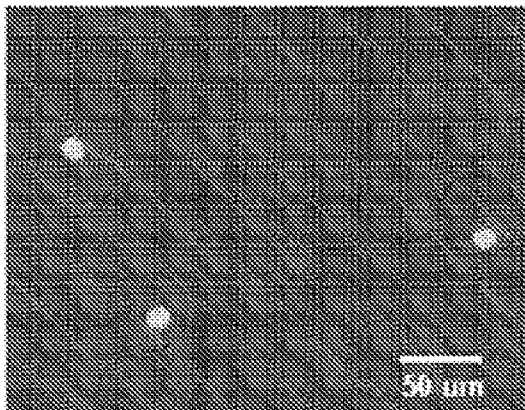


Figura 5D

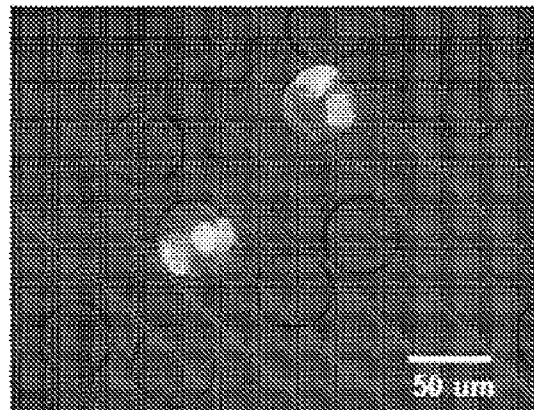


Gelificación rápida

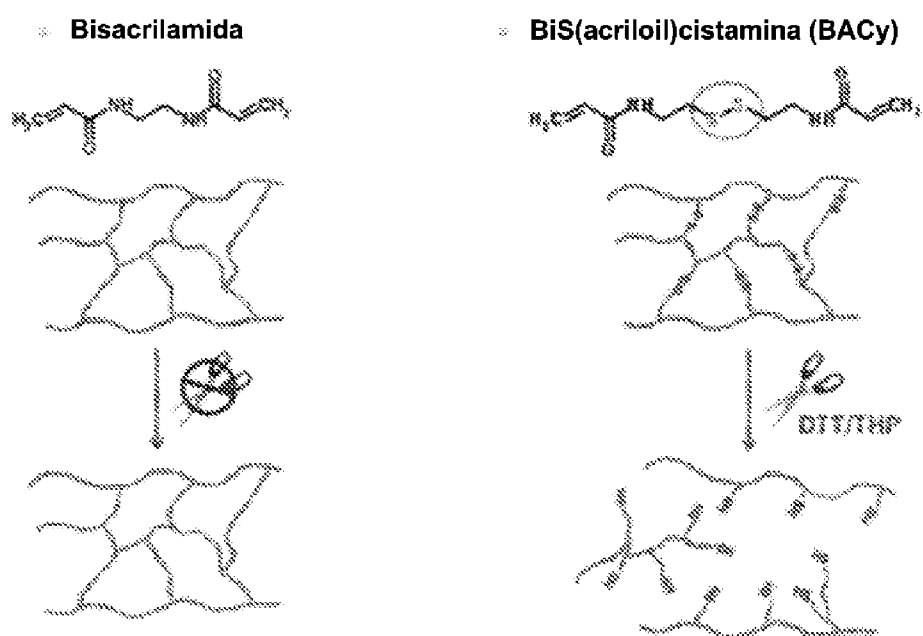


**Figura 6A**

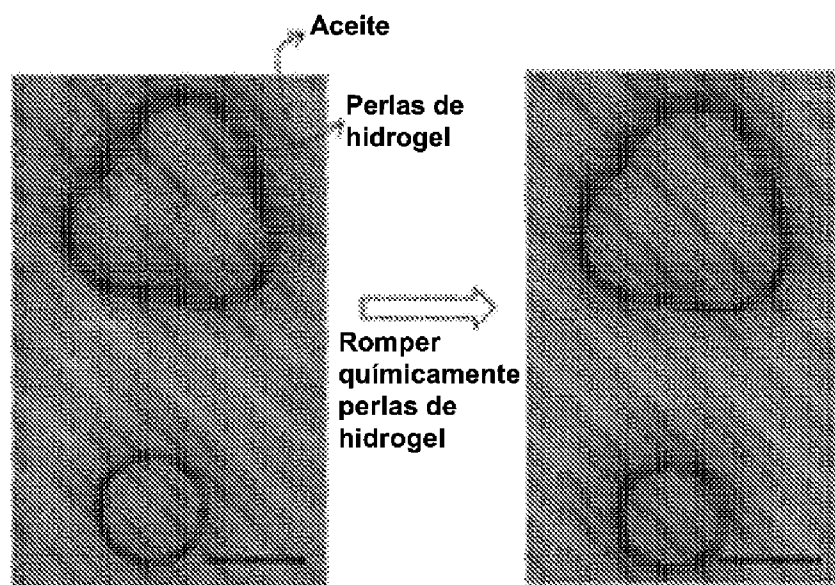
Gelificación lenta



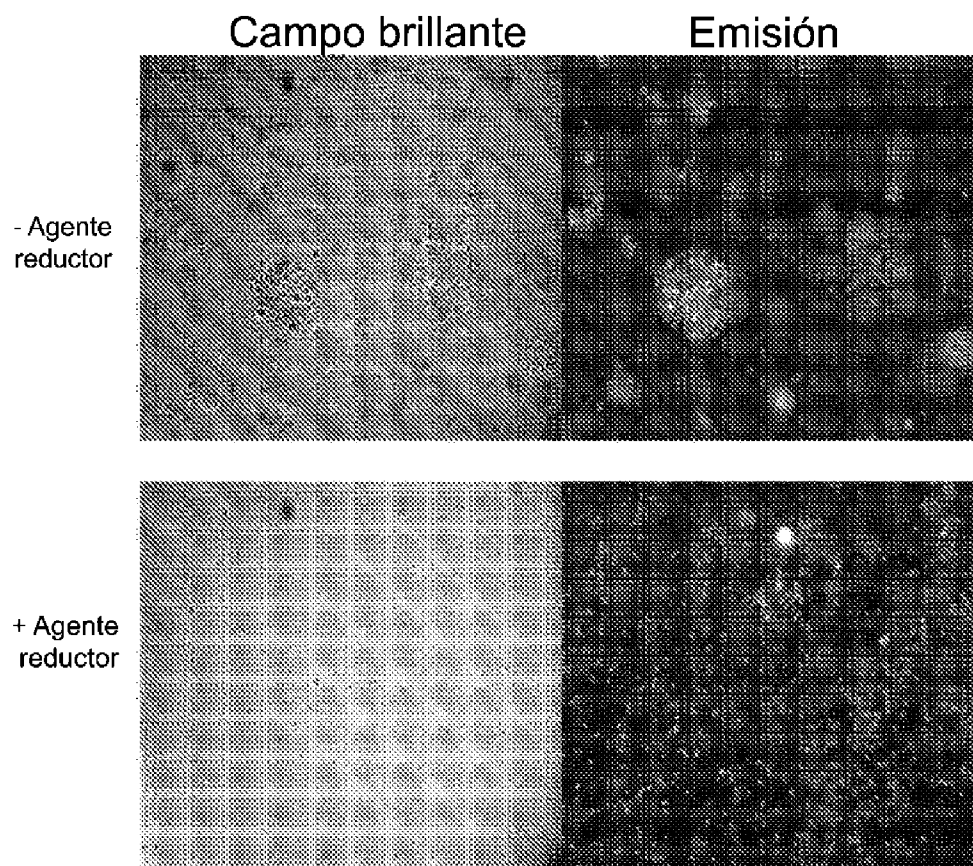
**Figura 6B**



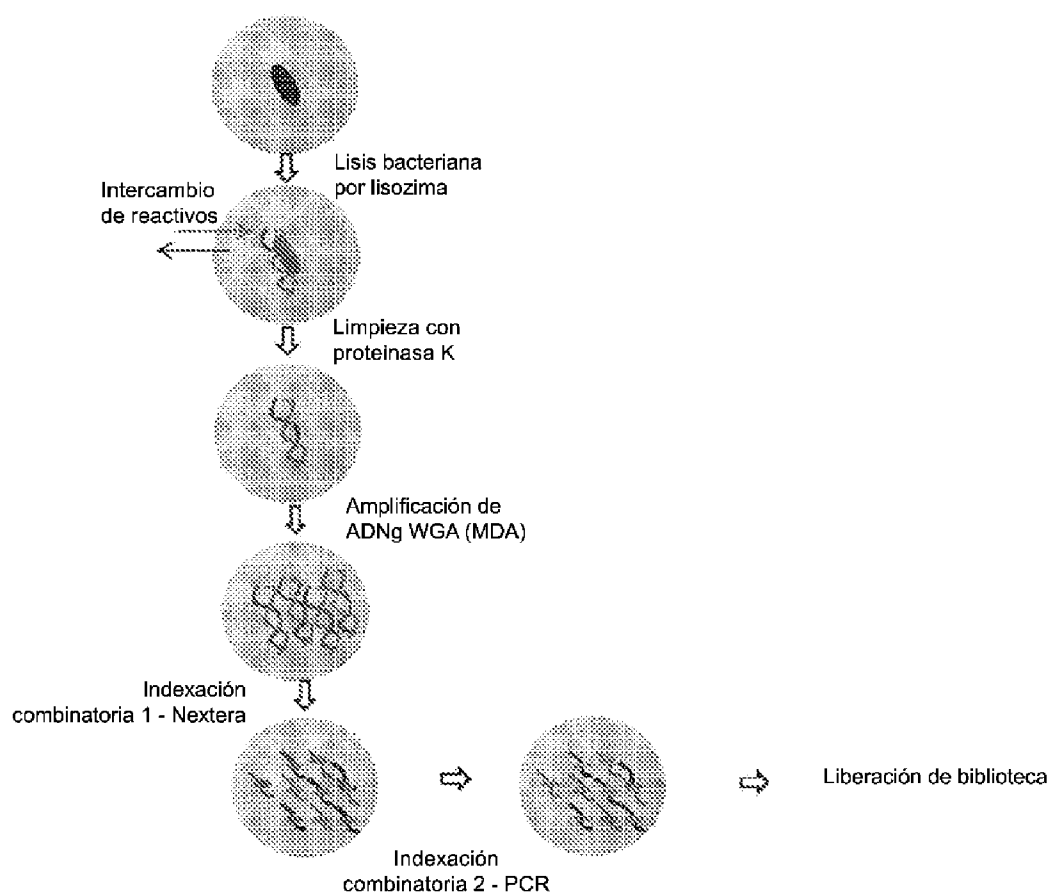
**Figura 7A**



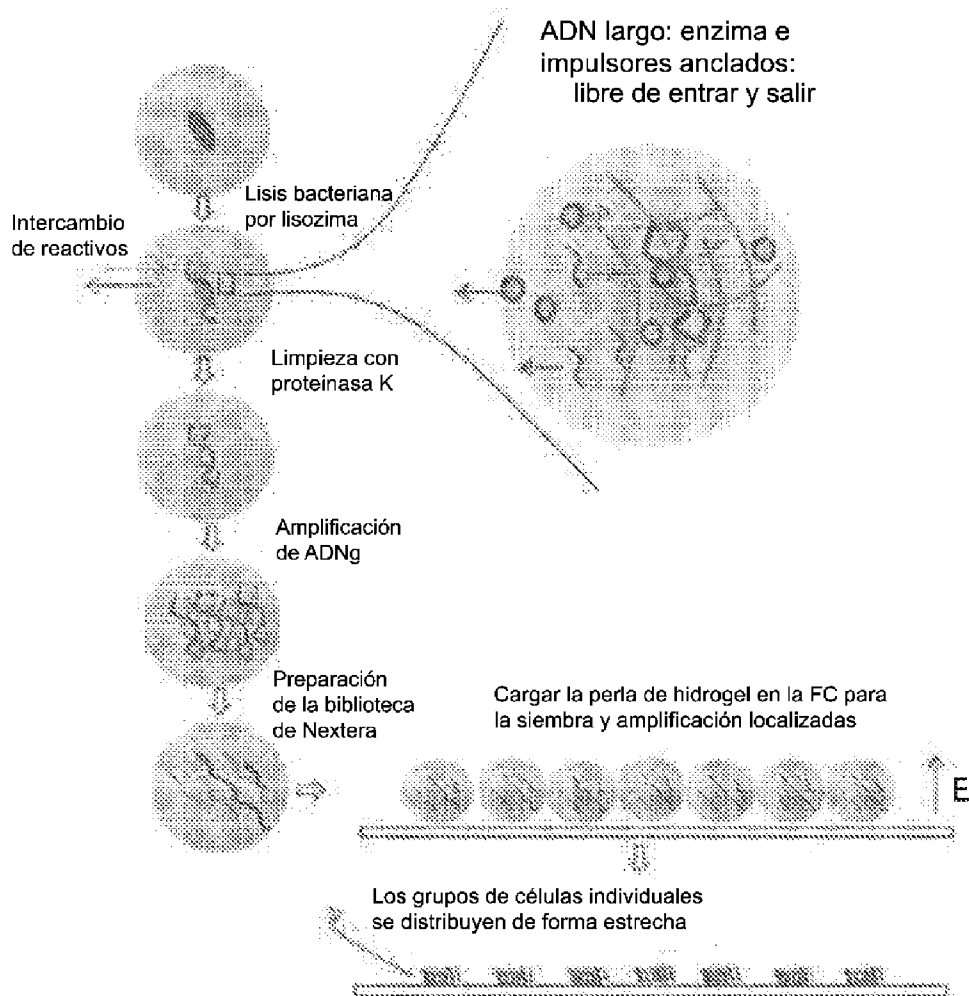
**Figura 7B**



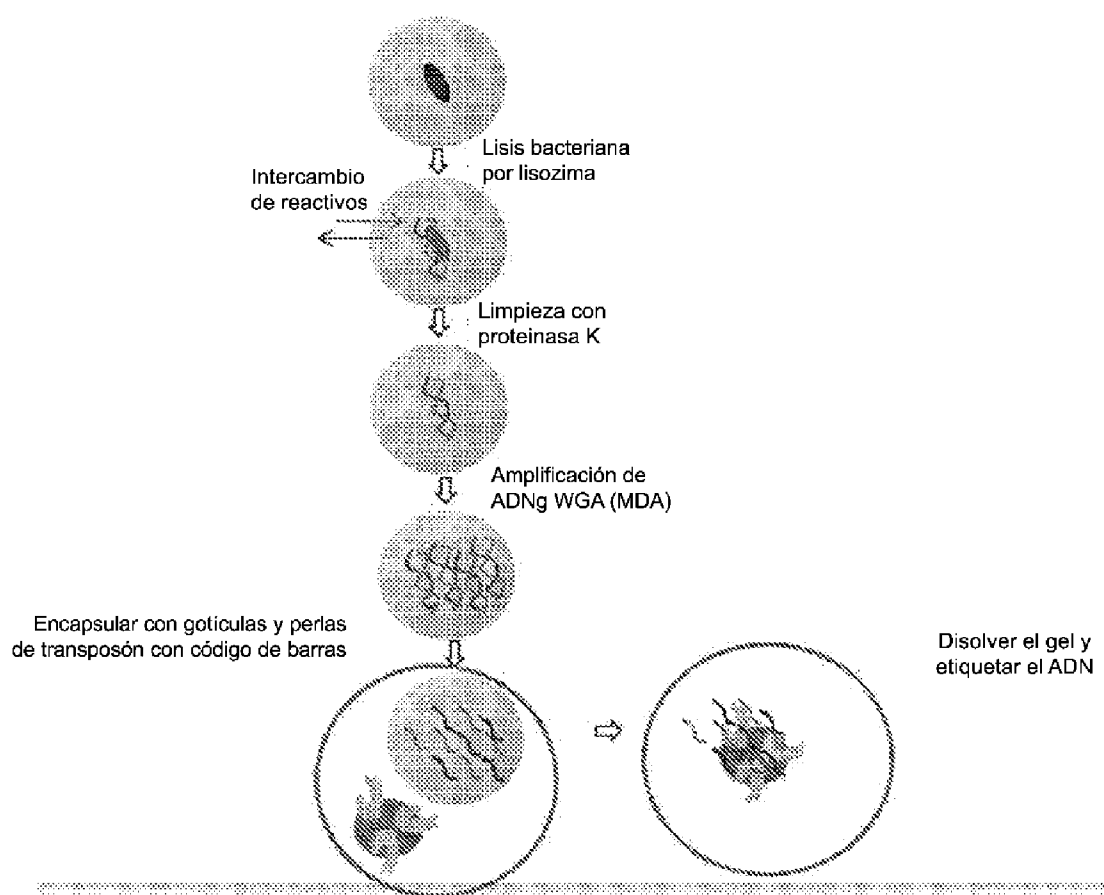
**Figura 7C**



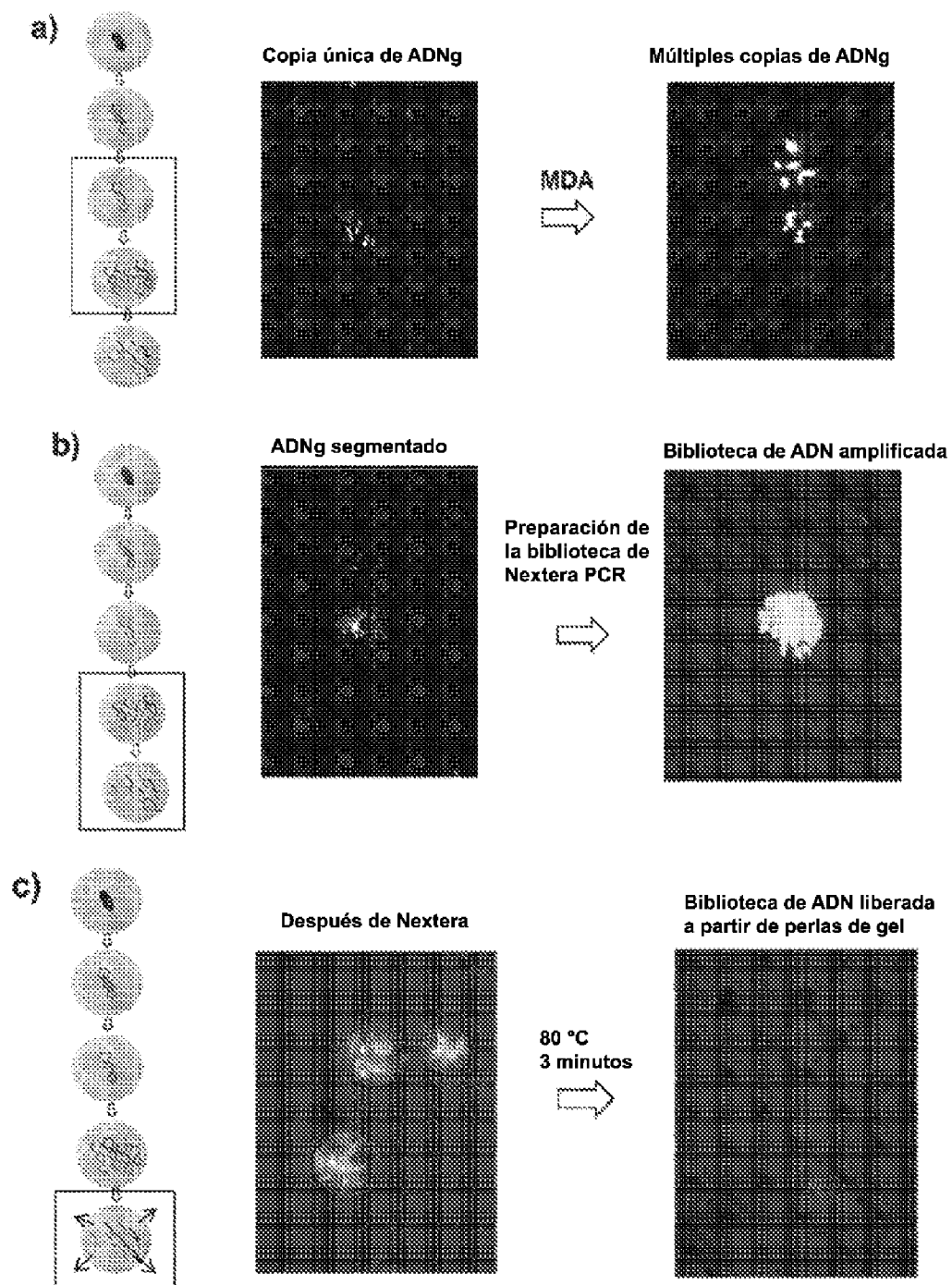
**Figura 8A**



**Figura 8B**

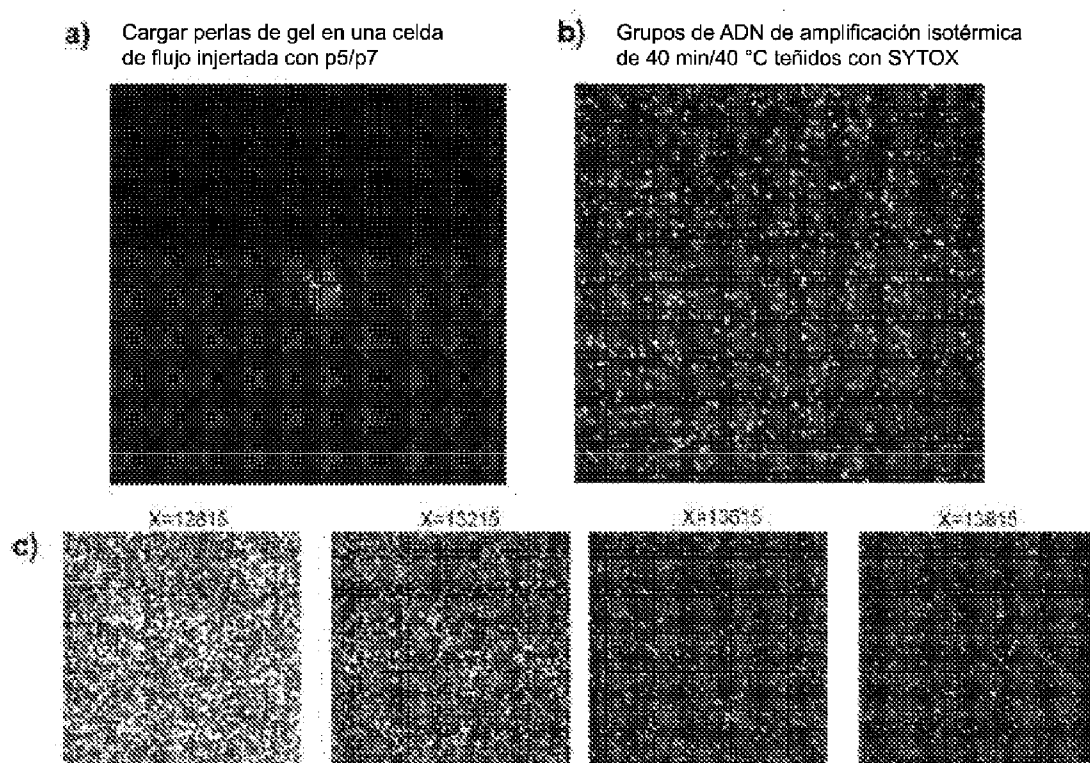


**Figura 8C**

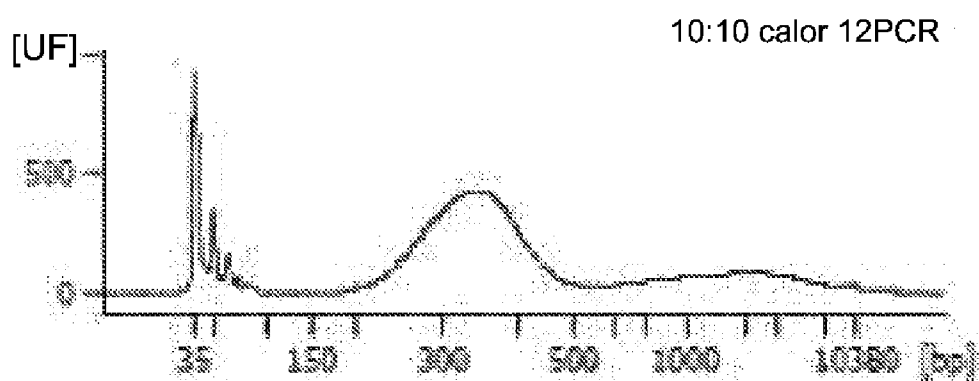


**Figura 9**

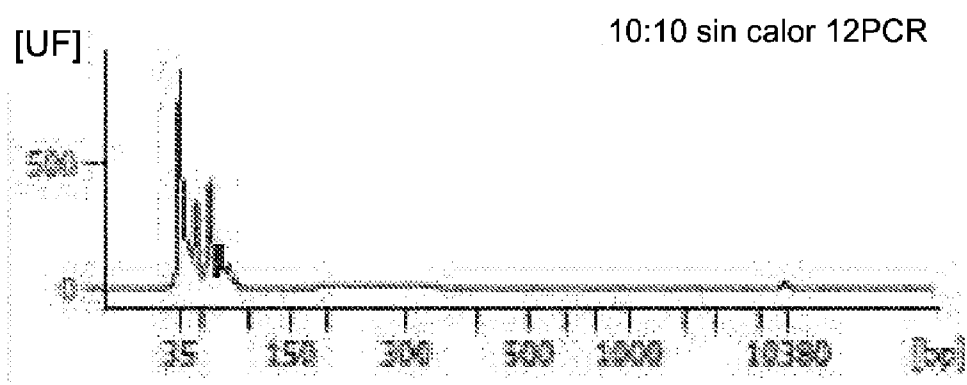




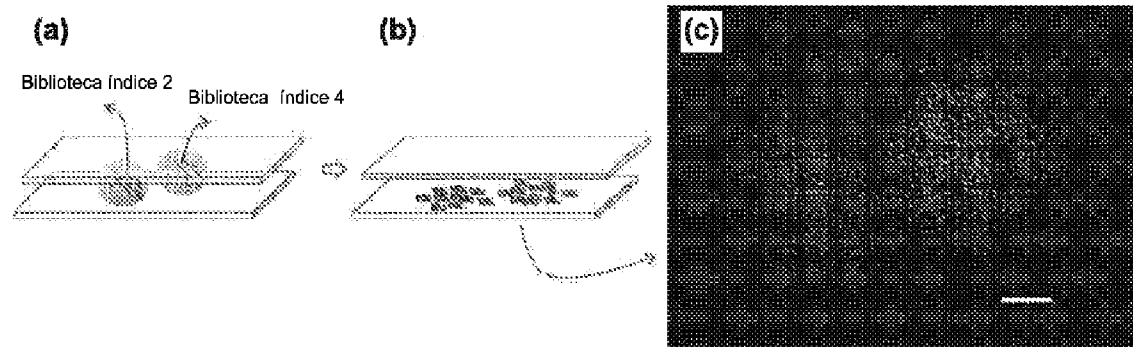
**Figura 10**



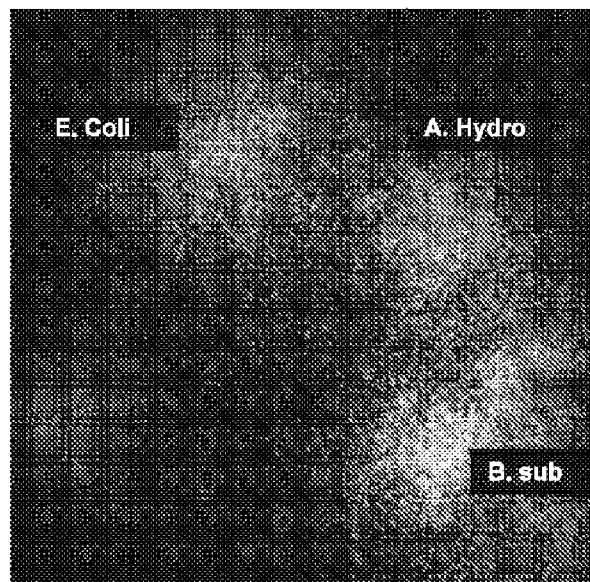
**Figura 11A**



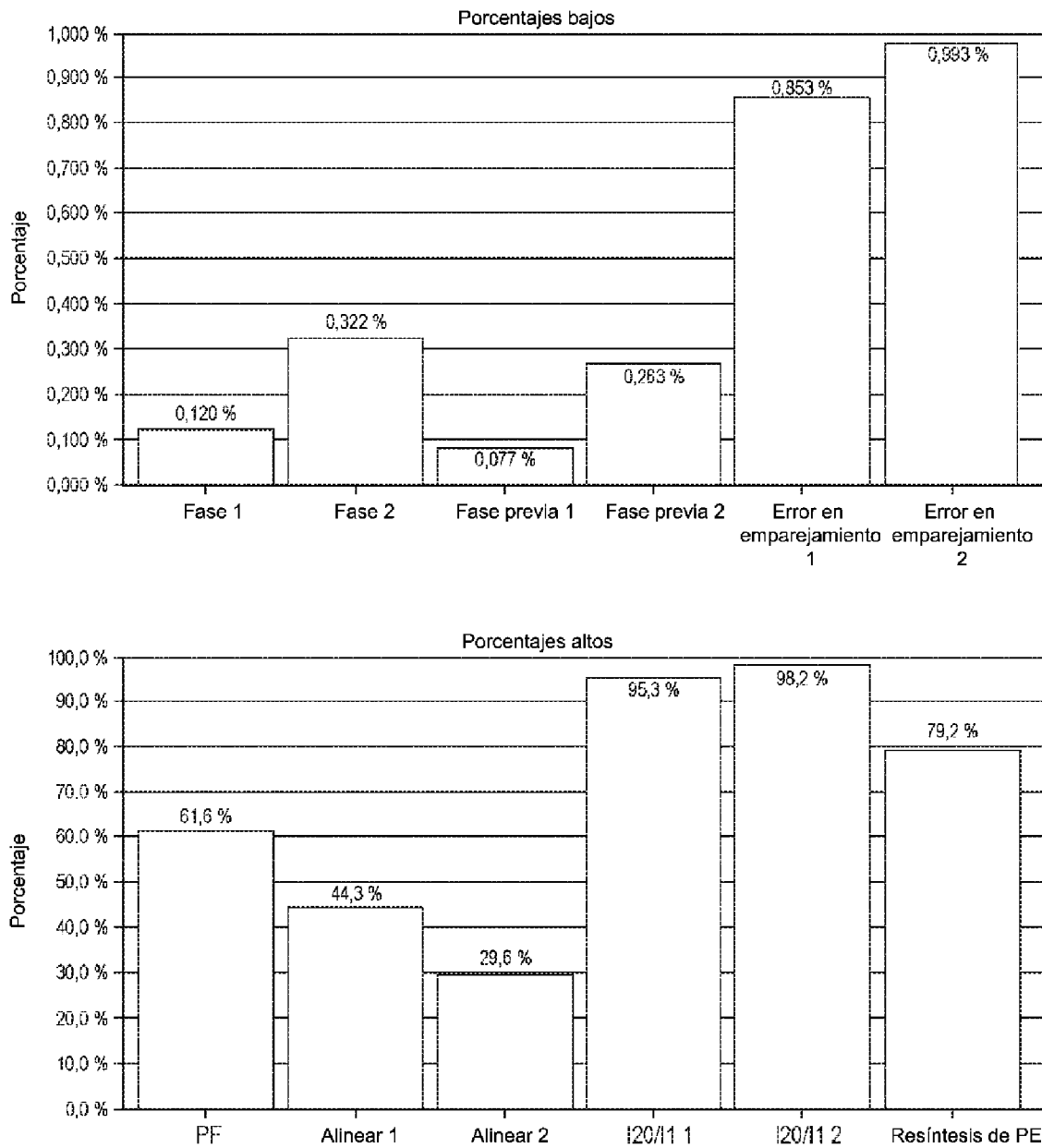
**Figura 11B**



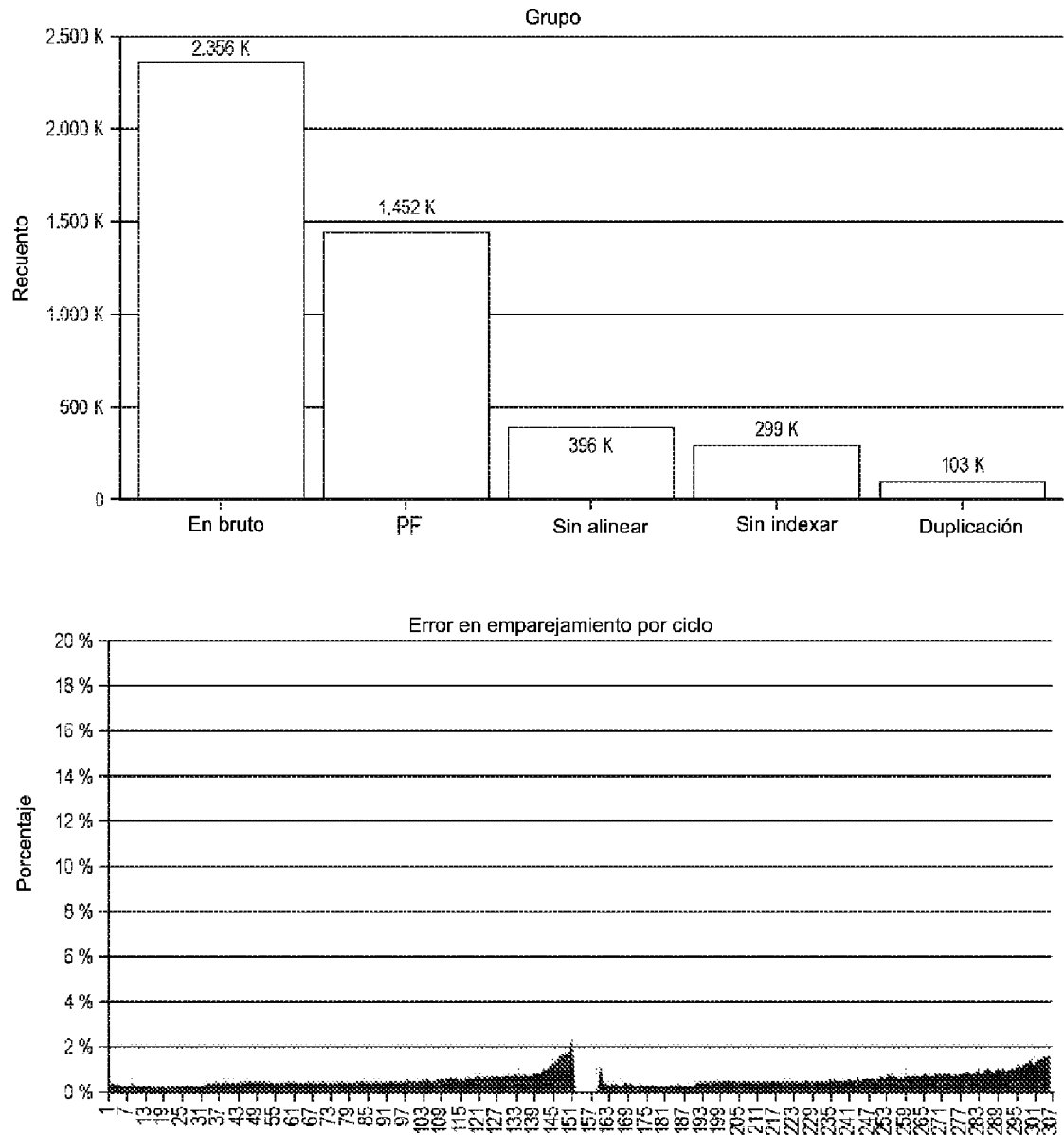
**Figura 12**



**Figura 13**



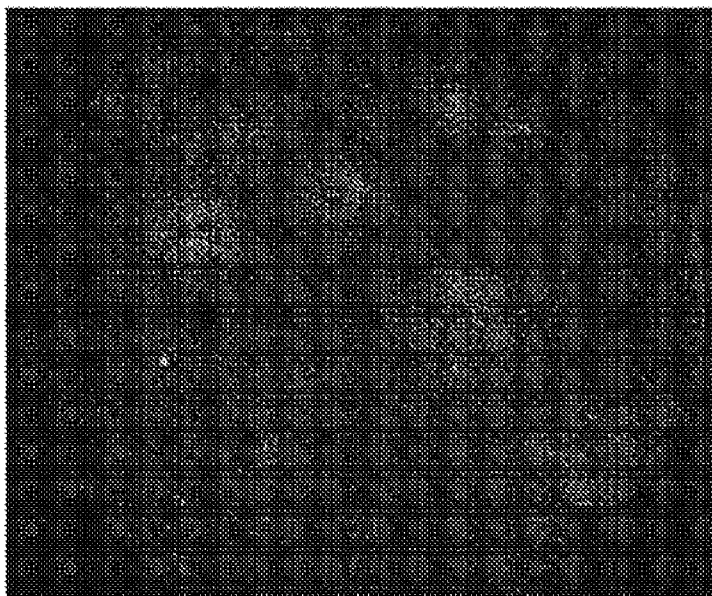
**Figura 14A**



**Figura 14B**



**Figura 15A**



- phiX
- B. subtilis
- E. coli
- A. hydrophila

**Figura 15B**

| Nombre de la muestra | Grupos sin procesar | % de grupos | % de PF | % de R1 alineada | Mediana de longitud | Error en emparejamiento R1 |
|----------------------|---------------------|-------------|---------|------------------|---------------------|----------------------------|
| Ecoli                | 455756              | 30,1        | 87,8    | 81,2             | 373                 | 0,56                       |
| Bsub                 | 151616              | 10          | 89,5    | 90,6             | 486                 | 0,12                       |
| Anhidro              | 230868              | 15,3        | 90,3    | 6                | 429                 | 2,15                       |
| PhiX                 | 675204              | 44,6        | 60,5    | 50,9             | 244                 | 0,58                       |

**Figura 15C**