

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 304**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6834 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2019 PCT/US2019/017521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2019 WO19160820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2019 E 19707960 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2022 EP 3752634**

54 Título: **Secuenciación de ADN usando perlas de hidrogel**

30 Prioridad:

13.02.2018 US 201862630175 P

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

04.11.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WU, YIR-SHYUAN;
GORPE- YASAR, FILIZ;
KHURANA, TARUN KUMAR;
POPUC, VICTORIA;
JAEGER, ERICH B. y
RONAGHI, MOSTAFA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 927 304 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

Secuenciación de ADN usando perlas de hidrogel

Campo

- 5 Los sistemas, métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento se refieren a perlas de hidrogel y métodos de encapsulación de ADN largo dentro de perlas de hidrogel, para usar en la determinación de la secuencia de polinucleótidos y la preparación de bibliotecas relacionadas.

Antecedentes

- 10 Los secuenciadores de nueva generación son herramientas potentes que generan grandes cantidades de datos genómicos por análisis de secuenciación. Interpretar y analizar esta gran cantidad de datos puede ser un desafío. La tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) proporciona datos de secuenciación de alta calidad. Sin embargo, las lecturas cortas (la longitud máxima de lectura es 2×300 pb) son una limitación de la química de SBS actual. Recientemente, hay un mayor énfasis en la secuenciación de moléculas de ADN más largas con el fin de capturar mejor las variantes de un solo nucleótido (SNP), inserción/delección y variantes estructurales, y mejorar la identificación genómica.
- 15 Algunas técnicas anteriores que pueden ser útiles para comprender la invención incluyen Lan Freeman et al., "Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. (includes Online Methods)", *Nature Biotechnology*, (20170701), vol. 35, núm. 7, páginas 640 - 646 que describe la secuenciación del genoma de célula única con un rendimiento ultraalto con código de barras de gotas microfluídicas para aislar, fragmentar y marcar con código de barras los genomas de células únicas, seguido de la secuenciación del ADN agrupado. Los genomas secuenciados se pueden clasificar *in silico* basado en secuencias características. La publicación internacional WO2016/004234 describe un método para cargar perlas en un sustrato sensor e incluye aplicar una suspensión que incluye perlas a una celda de flujo definida sobre un sustrato sensor. El sustrato sensor incluye una pluralidad de pocillos. Las perlas se depositan al menos parcialmente en la pluralidad de pocillos. El método también incluye eliminar líquido de la celda de flujo, evaporar líquido de la celda de flujo, por ejemplo, extrayendo aire a través de la celda de flujo; y aplicar una solución hidratante a la celda de flujo. La publicación internacional WO2017/075265 se refiere a métodos para el análisis de proteínas o constituyentes celulares de alta multiplexación en células individuales o agregados aislados individuales de constituyentes celulares. Los métodos proporcionan la inserción de células o agregados aislados de constituyentes celulares en una malla de hidrogel y el marcaje de constituyentes celulares con ligandos de marcaje unidos a un marcador de ácido nucleico. Los constituyentes celulares se pueden determinar utilizando métodos de secuenciación.

30 **Resumen**

La presente invención se refiere a un dispositivo de celda de flujo para realizar la secuenciación de ADN, que comprende:

un soporte sólido que comprende una superficie que tiene un hidrogel degradable que encapsula ADN depositado sobre ella, en donde el hidrogel degradable comprende poros que son de un tamaño para permitir la difusión de un reactivo a través del hidrogel, pero que son demasiado pequeños para permitir que el ADN atraviese los poros.

- 35 La invención también incluye un sistema para la secuenciación de ADN en donde el sistema incluye una platina configurada para contener un dispositivo de celda de flujo, un dispositivo de celda de flujo y un detector para obtener datos de secuenciación como se reivindica a continuación. También se proporciona un método de secuenciación de ADN que comprende obtener una perla que encapsula ADN dentro de un hidrogel; llevar a cabo una reacción de tagmentación en el ADN encapsulado dentro del hidrogel, generando así una biblioteca de ADN encapsulada dentro del hidrogel; sembrar la biblioteca de ADN en un dispositivo de celda de flujo de la invención; y secuenciar el ADN.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1A es un esquema que ilustra una realización para la indexación espacial de ADN largo mediante la preparación y siembra de bibliotecas en celda de flujo.

- 45 La fig. 1B es un esquema que ilustra la indexación espacial utilizando perlas de hidrogel que encapsulan moléculas de ADN largas. Los reactivos se pueden usar sobre las perlas de hidrogel para generar espacialmente una biblioteca en la superficie de una celda de flujo.

La fig. 2 es un diagrama de flujo que representa un método para encapsular ADN largo dentro de una perla de hidrogel y preparar una biblioteca dentro de la perla de hidrogel, que se puede agrupar y secuenciar en un dispositivo de celda de flujo.

- 50 La fig. 3 es un esquema que ilustra el flujo de trabajo de la secuenciación de ADN del ADN largo encapsulado dentro de perlas de hidrogel, que incluye fragmentos de ADN de aproximadamente 100 kb (sin una etapa de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) (panel (a)) o con una etapa de MDA (panel (b)) antes de la tagmentación) y fragmentos de ADN de aproximadamente 10-20 kb (panel (c)).

La fig. 4 es un gráfico que representa lecturas estroboscópicas de datos de secuenciación de indexación espacial de hidrogel de ADN largo de un fragmento de ADN de 100 kb sin MDA.

La fig. 5 muestra un gráfico de líneas de lecturas unidas de indexación espacial de hidrogel de ADN largo en fragmentos de ADN de 100 kb con MDA.

5 La fig. 6 muestra un gráfico de líneas de lecturas unidas de indexación espacial de hidrogel de ADN largo en fragmentos de ADN de 10 kb con MDA.

10 Las figs. 7A y 7B representan gráficos de líneas de lecturas espaciales para ADN largo encapsulado dentro de una perla de hidrogel. La FIG. 7A muestra las lecturas espaciales para células encapsuladas dentro de una perla de hidrogel, y el recuadro representa una micrografía que muestra una célula dentro de la perla de hidrogel. La FIG. 7B muestra las lecturas espaciales para fragmentos de ADN largos encapsulados dentro de una perla de hidrogel, y el recuadro representa una micrografía que muestra los fragmentos encapsulados dentro de las perlas.

La fig. 8 representa una micrografía que muestra la identificación de especies microbianas encapsuladas dentro de una perla de hidrogel. La perla de hidrogel encapsulaba varias especies microbianas y se realizaron lecturas de secuenciación espacial para identificar los microbios.

15 La fig. 9 ilustra un gráfico que muestra la distribución de lecturas de códigos de barras para ADN largo encapsulado dentro de perlas de hidrogel.

20 La fig. 10A ilustra un gráfico que muestra lecturas cortas y lecturas enlazadas de una sola ejecución para una célula de *E. coli* encapsulada dentro de una perla de hidrogel. Como se muestra en la figura, las lecturas enlazadas se extienden a lo largo de regiones repetidas y pueden mejorar el ensamblaje de secuencias de novo. La FIG. 10B muestra una micrografía que representa lecturas enlazadas espaciales y lecturas cortas intersticiales.

Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos

25 Las realizaciones se refieren a dispositivos, sistemas y métodos para encapsular fragmentos de ADN largos en perlas para determinar la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN. Esto permite la creación de métodos fiables y de alto rendimiento de secuenciación de fragmentos de ADN relativamente largos, como se describe a continuación. Los métodos y sistemas descritos en el presente documento se refieren a la secuenciación de fragmentos largos de ADN encapsulados en una sola perla, lo que permite una mejor secuenciación e identificación del ADN genómico. El método incluye obtener una perla que encapsula una muestra de fragmentos de ADN dentro de una perla de hidrogel, cargar las perlas de hidrogel que encapsulan la muestra de fragmentos de ADN en un dispositivo de celda de flujo, preparar una biblioteca, liberar la biblioteca preparada en una superficie del dispositivo de celda de flujo, y agrupar y secuenciar la biblioteca liberada.

35 La preparación de una biblioteca incluye la tagmentación del ADN encapsulado. La tagmentación del ADN encapsulado escinde las secuencias de ADN más largas en fragmentos de tagmentación más cortos que luego se utilizan para generar agrupamientos de ADN en una superficie de la celda de flujo. Un agrupamiento es un producto de un fragmento de tagmentación del ADN largo, cada uno de los cuales se puede secuenciar mediante secuenciación SBS, por ejemplo. Un grupo de agrupamientos a partir de una única molécula de ADN larga se denomina en el presente documento una isla de ADN largo. Una sola perla de hidrogel puede encapsular una sola molécula de ADN larga o múltiples moléculas de ADN largas. Cada molécula de ADN larga genera una sola isla de ADN larga. Los agrupamientos de todas las islas de ADN largos dentro de una sola perla de hidrogel se denominan en el presente documento nube de agrupamientos. Por lo tanto, una nube de agrupamientos representa todos los agrupamientos dentro de una sola perla de hidrogel y puede incluir muchas islas de ADN largos (cada isla de ADN largo representa una sola molécula de ADN largo), y cada isla de ADN largo incluye múltiples agrupamientos.

45 Las perlas pueden incluir polímeros de hidrogel y reticuladores que se mezclan en presencia de una molécula de ADN larga, o una fuente que contiene una molécula de ADN larga, que luego forman perlas de hidrogel que encapsulan la molécula de ADN. En algunas realizaciones, la fuente de ADN largo es una célula. Las perlas de hidrogel pueden incluir poros que permiten la difusión de reactivos a través de la perla de hidrogel mientras retienen el ADN largo dentro de la perla, permitiendo así que se produzcan reacciones dentro de cada una de las perlas.

50 La invención incluye un método de uso de perlas que encapsulan ADN largo para realizar reacciones de ácidos nucleicos, que incluyen, por ejemplo, indexación espacial de alto rendimiento de moléculas de ADN largas. Como se muestra en la fig. 1A, la preparación de la biblioteca a partir de una molécula de ADN larga se puede preparar fácilmente agrupando y sembrando los agrupamientos de una sola molécula de ADN larga como un "parque de agrupamientos" en la superficie, que luego se puede leer y hacer el mapa espacial. Como se usa en el presente documento, la expresión "ADN largo" puede incluir fragmentos de ADN que tienen más de 300 pares de bases. Fragmentos de ADN largos, como se usa en el presente documento, se refiere a ADN de una longitud superior a 1 kb, 2.5 kb, 5 kb o más, tal como 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 kb, o más, incluida una cantidad dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados.

El dispositivo, el método y el sistema proporcionados en el presente documento incluyen varias ventajas sobre las técnicas actuales de preparación de bibliotecas. Por ejemplo, el método permite la preparación de muestras en una sola perla para usar para fragmentar una muestra genómica en una serie de fragmentos de ADN largos. A continuación, esa perla individual se puede fijar en una ubicación especial en una celda de flujo donde se depositan los fragmentos de ADN largos de manera que cada uno de los fragmentos de ADN largos se coloca uno al lado del otro en la superficie de la celda de flujo. Luego, el sistema determina la secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN largo. Dado que son adyacentes entre sí en la superficie de la celda de flujo, el sistema puede usar estos datos de situación espacial para reconstruir de manera más eficiente la secuencia final del ADN genómico original. El sistema puede depositar lecturas cosituadas espacialmente directamente de células individuales, fragmentos de ADN largo o cromosomas. El método permite un flujo de trabajo sin PCR, con poca entrada para la preparación de bibliotecas, y se puede realizar sin necesidad de códigos de barras moleculares. El método permite la automatización simplificada del flujo de trabajo y es compatible con una variedad de ensayos y flujos de trabajo de ácidos nucleicos.

La perla de hidrogel que encapsula el ADN largo se puede utilizar para procesar el genoma celular y llevar a cabo la preparación de la biblioteca de ADN dentro de la perla. En algunas realizaciones, la perla de hidrogel que encapsula un fragmento de ADN largo encapsula una sola célula, que se puede usar para procesar el ADN genómico celular y para llevar a cabo la preparación de la biblioteca de ADN completo dentro de la perla.

El tamaño de poros de la perla de hidrogel se puede diseñar para permitir la difusión de enzimas, productos químicos y cebadores de tamaño más pequeño (< 50 pb), a la vez que retiene ácidos nucleicos más grandes (> 300 pb), de modo que los fragmentos de ADN largos y la biblioteca de ADN producida pueden ser retenidos dentro de las perlas de hidrogel durante el procesamiento. En algunas realizaciones, los cebadores específicos pueden unirse químicamente dentro de la matriz de las perlas de hidrogel para hibridar y procesar ADN genómico específico. La biblioteca de ADN de una sola célula después se puede liberar en una zona específica, por ejemplo, en la superficie de la celda de flujo para la siembra de la biblioteca. Posteriormente, esto da como resultado una distribución espacial de "agrupamientos de ADN" en la celda de flujo que se originan a partir de los fragmentos de ADN largos encapsulados, lo que simplifica el alineamiento de lecturas durante el procesamiento posterior.

Como se usa en el presente documento, el término "reactivo" describe un agente o una mezcla de dos o más agentes útiles para reaccionar con, interaccionar con, diluir o añadir a una muestra, y puede incluir agentes usados en reacciones de ácidos nucleicos, incluidos, por ejemplo, tampones, productos químicos, enzimas, polimerasa, cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases, ácidos nucleicos molde, nucleótidos, marcadores, colorantes o nucleasas. En algunas realizaciones, el reactivo incluye lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Φ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias de adaptadores P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, trifosfatos de desoxinucleótidos, tampones o cationes divalentes.

Perlas de hidrogel que encapsulan material genético

El método de la invención incluye obtener una perla que incluye un polímero de hidrogel y material genético. Como se usa 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 moléculas de agua para formar un gel. En algunas realizaciones, el hidrogel puede ser un hidrogel biocompatible. Como se usa 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. El polímero de hidrogel incluye 60-90% de fluido, tal como agua, y 10-30% de polímero. En ciertos casos, el contenido de agua del hidrogel es de aproximadamente 70-80%.

Los hidrogeles pueden prepararse por reticulación de biopolímeros hidrófilos o polímeros sintéticos. Por lo tanto, el hidrogel puede incluir un agente de reticulación. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de reticulación" se refiere a una molécula que puede formar una red tridimensional cuando reacciona con los monómeros base apropiados. Los ejemplos de polímeros de hidrogel, que pueden incluir uno o más agente de reticulación, incluyen hialuronanos, quitosanos, agar, heparina, sulfato, celulosa, alginatos (incluyendo alginato-sulfato), colágeno, dextranos (incluyendo sulfato de dextrano), pectina, carragenina, polilisina, gelatinas (incluyendo gelatina tipo A), agarosa, (met)acrilatooligolactida-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(acriloil)cistamina, PEG, poli(óxido de propileno) (PPO), poli(ácido acrílico), poli(metacrilato de hidroxietilo) (PHEMA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, triálilamina, divinilsulfona, éter dialílico de dietilenglicol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetacrilato de trimetilpropoano, triacrilato de trimetilol etoxilado o tetracrilato de pentaeritritol etoxilado, o combinaciones de los mismos. Así, por ejemplo, una combinación puede incluir un polímero y un agente de reticulación, por ejemplo, polietilenglicol (PEG)-tiol/PEG-acrilato, acrilamida/N,N'-bis(acriloil)cistamina (BACy) o PEG/poli(óxido de propileno) (OPP).

Un agente de reticulación forma un enlace disulfuro en el polímero de hidrogel, uniendo así los polímeros de hidrogel.

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, por ejemplo, fragmentos de ADN largos, pero permiten que materiales pequeños, tales como reactivos, pasen a través de los poros, entrando y saliendo así de las perlas de hidrogel. El tamaño de poros se ajusta con precisión variando la relación de la concentración de polímero a la concentración de agente de reticulación. La relación de polímero a agente de reticulación es 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 cualesquiera de las relaciones antes mencionadas. Las funciones adicionales, tales como cebador de ADN o los grupos químicos cargados, se pueden injertar en la matriz polimérica para cumplir con los requisitos de diferentes aplicaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "porosidad" significa el volumen fraccionario (sin dimensiones) de un hidrogel que se compone de espacio abierto, por ejemplo, poros u otras aberturas. Por tanto, la porosidad mide los espacios vacíos en un material y es una fracción del volumen de vacíos frente al volumen total, en porcentaje entre 0 y 100% (o entre 0 y 1). La porosidad del hidrogel puede estar en el intervalo 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 poros. Como se usa en el presente documento, la expresión "tamaño de poros" se refiere a un diámetro o un diámetro efectivo de una sección transversal de los poros. La expresión "tamaño de poros" también puede referirse a un diámetro medio o un diámetro efectivo medio de una sección transversal de los poros, basado en las medidas de una pluralidad de poros. El diámetro efectivo de una sección transversal que no es circular es igual al diámetro de una sección transversal circular que tiene la misma área de sección transversal que la sección transversal no circular. El hidrogel se puede hinchar cuando se hidrata el hidrogel. El tamaño de poros puede entonces cambiar dependiendo del contenido de agua en el hidrogel. Los poros del hidrogel pueden tener un poro de tamaño suficiente para retener el material genético dentro del hidrogel pero permitir el paso de los reactivos.

El agente de reticulación es un agente de reticulación reversible capaz de reticular reversiblemente el polímero de hidrogel y es capaz de ser desreticulado en presencia de un agente de escisión. El agente de reticulación puede escindirse por la presencia de un agente reductor, por temperatura elevada o por un campo eléctrico. El agente de reticulación reversible puede ser la N,N'-bis(acrilil)ocistamina, un agente de reticulación reversible para geles de poli(acrilamida), en donde se puede romper un enlace disulfuro en presencia de un agente reductor adecuado. Poner en contacto el agente de reticulación con un agente reductor escinde los enlaces disulfuro del agente de reticulación, rompiendo las perlas de hidrogel. Las perlas de hidrogel se degradan y liberan el contenido, tal como los ácidos nucleicos que estaban retenidos en ellas. Alternativamente, el agente de reticulación se escinde aumentando la temperatura a más de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100°C. Además, el agente de reticulación 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 los mismos, ditiotritol (DTE), ditiotretol (DTT) (isómeros cis y trans, respectivamente, de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano), 2-mercaptoetanol o β-mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetanol o aminoetanol, glutatión, tioglicolato o ácido tioglicólico, 2,3-dimercaptopropanol, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris(hidroximetil)fosfina (THP) o ácido p-[tris(hidroximetil)fosfina] propiónico (THPP).

Elevar la temperatura para aumentar la difusión o ponerlo en contacto con un agente reductor degrada el agente de reticulación, liberando así el material genético encapsulado de la perla de hidrogel.

La reticulación del agente de reticulación establece poros dentro de la perla de hidrogel. El tamaño de los poros en las perlas de hidrogel es regulable y está formulado para encapsular material genético, tal como fragmentos de ADN de más de aproximadamente 5000 pares de bases, pero para permitir que pasen partículas más pequeñas, tales como reactivos, o ácidos nucleicos de menor tamaño de menos de aproximadamente 50 pares de bases, tales como cebadores, a través de los poros, como se muestra en la Fig. 1B. Los reactivos incluyen reactivos para procesar material genético, tales como reactivos para aislar ácidos nucleicos de una célula, para amplificar, marcar con códigos de barras o secuenciar ácidos nucleicos, o para preparar bibliotecas de ácidos nucleicos e incluyen, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Φ29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias de adaptadores P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, trifosfatos de desoxinucleótidos, tampones o cationes divalentes.

El ADN largo incluye ADN genómico, ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos bacterianos o ácidos nucleicos de mamíferos. En algunas realizaciones, las perlas de hidrogel incluyen una fuente de ADN largo que incluye, por ejemplo, una célula. En algunas realizaciones, la célula es una sola célula, 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 bacteriana. Así, como se muestra en las Figs. 7A y 7B, el método se puede llevar a cabo en fragmentos de ADN largos o en células, cualquiera de los cuales o ambos son encapsulados con una perla de hidrogel.

Métodos para hacer perlas (no forma parte de la invención)

El método de la invención incluye obtener una perla que encapsule el ADN dentro de un hidrogel, tal como fragmentos de ADN largo. El método para hacer las perlas no forma parte de la invención. Una perla de hidrogel se prepara por emulsión asistida por vórtice. Como se usa en el presente documento, emulsión asistida por vórtice se refiere a la

agitación vorticial de un polímero de hidrogel con fragmentos de ADN largos o una fuente de fragmentos de ADN largos en un recipiente, tal como en un tubo, vial o recipiente de reacción. Los componentes se pueden mezclar, por ejemplo, mediante agitación o agitación vorticial manual o mecánica. El mezclamiento manual da como resultado 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 μm de diámetro, o un tamaño dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. En algunos casos, 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 la generación de gotitas microfluídicas. Como se muestra en la fig. 1B, la generación de gotitas microfluídicas incluye el uso de un dispositivo de microfluidos para la generación de emulsión de gel asistida. El dispositivo de microfluidos incluye microcanales configurados para producir una perla de hidrogel de un tamaño deseado y configurados para encapsular una cantidad seleccionada de material genético por perla. El dispositivo de microfluidos tiene una altura de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 μm , o una altura dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. El dispositivo de microfluidos incluye uno o más canales. A veces, el dispositivo de microfluidos incluye un canal para una corriente acuosa y un canal para un fluido inmiscible. El ancho del uno o más canales es idéntico. Sin embargo, a veces 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 μm , o un ancho dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. El ancho del canal acuoso es de 75 μm . El ancho del canal de fluido inmiscible es de 78 μm . Un experto en la técnica reconocerá que el ancho puede variar para ajustar con precisión el tamaño de la perla. Además del tamaño del dispositivo de microfluidos 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 la fase acuosa es 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, o una velocidad dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. El caudal del fluido inmiscible en el canal de fluido inmiscible es 20, 30, 50, 80, 100, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 o 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, o una velocidad dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. La solución en la fase acuosa incluye un polímero del hidrogel, un agente de reticulación y material genético, que fluyen a través de un canal acuoso hacia un fluido inmiscible, tal como un aceite vehículo, con un caudal menor que el caudal del fluido inmiscible, formando así gotitas. El fluido inmiscible es aceite, tal como un aceite mineral, un aceite de hidrocarburo, un aceite de silicona o un aceite de polidimetilsiloxano, o mezclas de los mismos. Las gotitas de hidrogel que contienen material genético se formulan con una distribución de tamaños uniforme. El tamaño de las perlas de hidrogel se ajusta con precisión ajustando el tamaño del dispositivo de microfluidos, el tamaño del uno o más canales, o el caudal de cualquiera de la solución acuosa o del fluido inmiscible, o de ambos. La perla de hidrogel resultante tiene un diámetro en el intervalo de 2 a 150 μm , 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 μm , o un diámetro dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados.

El tamaño y la uniformidad de la perla de hidrogel que encapsula el material genético se pueden controlar adicionalmente poniendo en contacto el polímero del hidrogel antes de la formación de la perla con un modificador de fluido, tal como un alcohol, incluido alcohol isopropílico.

La cantidad de fragmentos de ADN largos encapsulados dentro de una perla se puede controlar diluyendo o concentrando los fragmentos de ADN largos dentro de la muestra introducida. La muestra que incluye los fragmentos de ADN largos se mezcla con el polímero del hidrogel, y el polímero del hidrogel que contiene los fragmentos de ADN largos se somete a emulsión asistida por vórtice o generación de gotitas microfluídicas, como se describe en el presente documento.

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

Métodos de procesamiento de fragmentos de ADN largos dentro de perlas de hidrogel

La fig. 2 representa un diagrama de flujo para preparar y procesar moléculas largas de ADN en una perla de hidrogel. En una primera etapa, una muestra de ADN, por ejemplo, de datos genómicos o de una célula, se encapsula dentro de una perla de hidrogel. En algunas realizaciones, el fragmento de ADN largo es retenido dentro de las perlas de hidrogel y los reactivos pueden pasar a través de los poros de las perlas de hidrogel. En algunas realizaciones, los reactivos pueden incluir agentes de lisis, agentes de purificación de ácidos nucleicos, 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 fragmentos de ADN largos dentro de las perlas de hidrogel al permitir una barrera para que los reactivos entren y salgan de las perlas de hidrogel, a la vez que retienen los fragmentos de ADN largos dentro de las perlas. Una vez que el ADN es encapsulado en las perlas, el procedimiento pasa a la siguiente etapa, donde la muestra se puede cargar en una celda de flujo para crear los fragmentos de ADN largos mediante el procedimiento de preparación de la biblioteca.

Como se usa en el presente documento, el término "tagmentación" se refiere a la modificación del ADN por un complejo

de transposoma que comprende la enzima transposasa complejada con adaptadores que comprenden la secuencia del extremo del transposón. La tagmentación da como resultado simultáneamente la fragmentación del ADN y la unión de los adaptadores a los extremos 5' de ambas cadenas de fragmentos dúplex. Después de una etapa de purificación para eliminar la enzima transposasa, se pueden añadir secuencias adicionales a los extremos de los fragmentos adaptados, por ejemplo por PCR, ligado o cualquier otra metodología adecuada conocida por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la preparación de la biblioteca de ADN completa se puede lograr sin problemas dentro de las perlas de hidrogel unidas a la celda de flujo con múltiples intercambios de reactivos pasando a través del hidrogel poroso mientras se retiene el ADN y sus productos de la 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.

En la siguiente etapa del procedimiento, la perla de hidrogel que encapsula los fragmentos de ADN largos de la preparación de la biblioteca anterior se trata para liberar, purificar y aislar los fragmentos de ADN largos de la perla. Así, por ejemplo, la perla de hidrogel se pone en contacto con un tampón de lisis. Como se usa en el presente documento, "lisis" significa perturbación o alteración de una pared celular o partícula viral que facilita el acceso al o la liberación del ARN o ADN celular. Ni la alteración completa ni la rotura de la pared celular son requisitos esenciales para la lisis. Por la expresión "tampón de lisis" se entiende un tampón que contiene al menos un agente de lisis. Los agentes de lisis enzimáticos típicos incluyen lisozima, glucolasa, zimolosa, litica, proteinasa K, proteinasa E y endolisinas y exolisinas virales. Así, por ejemplo, la lisis de células en las perlas se puede realizar introduciendo agentes de lisis, tales como lisozima y proteinasa K en las perlas de hidrogel. El ADN de las células ahora está contenido dentro de las perlas. Alternativamente, después del tratamiento de lisis, el ácido nucleico aislado es retenido dentro de la perla de hidrogel y se puede usar para procesamiento adicional.

Como se usa en el presente documento, los términos "aislado", "aislar", "aislamiento", "purificado", "purificar", "purificación" y sus equivalentes gramaticales como se usan en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, se refieren a la reducción en la cantidad de al menos un contaminante (tal como proteína y/o 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 como resultado un "enriquecimiento", por ejemplo, un aumento en la cantidad de una proteína y/o secuencia de ácido nucleico deseable en la muestra.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos encapsulados se secuencian total o parcialmente dentro de las perlas de hidrogel. Los ácidos nucleicos encapsulados se pueden secuenciar de acuerdo con cualquier metodología de secuenciación adecuada, tal como la secuenciación directa, incluida la secuenciación por síntesis, secuenciación por ligación, secuenciación por hibridación o secuenciación por nanoporos.

Algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento se refieren a la secuenciación por síntesis (SBS) posible para fragmentos de ADN largos. En la SBS, se controla la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico (p. ej., un ácido nucleico diana o un amplicón del mismo) para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde. 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 marcados con fluorescencia a un cebador (extendiendo así el cebador) en una forma dependiente del molde, de modo que la detección del orden y el tipo de nucleótidos añadidos al cebador se pueden usar para determinar la secuencia del molde.

Uno o más ácidos nucleicos encapsulados amplificados pueden someterse a una SBS u otra técnica de detección que implique la administración repetida de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, se pueden hacer fluir uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., hacia/a través de una perla de hidrogel que alberga una o más moléculas de ácido nucleico amplificadas. Pueden detectarse aquellos sitios en los que la extensión del cebador hace que se incorpore un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que finaliza la extensión adicional del cebador una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, se puede añadir un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible a un cebador de modo que no se produzca una extensión posterior hasta que se suministre un agente de desbloqueo para eliminar el resto. Por lo tanto, para realizaciones que usan terminación reversible, se puede suministrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que ocurra la detección). Se pueden realizar lavados entre las distintas etapas de suministro. Luego, el ciclo se puede repetir n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los procedimientos de SBS, sistemas fluidicos y plataformas de detección de ejemplo que se pueden adaptar fácilmente para usar con amplicones producidos por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008), WO 04/018497; Pat. de EE.UU. N.º 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; Pat. de EE.UU. N.º 7,329,492; Pat. de EE.UU. N.º 7,211,414; Pat. de EE.UU. N.º 7,315,019; Pat. de EE.UU. N.º 7,405,281 y US 2008/0108082.

Se pueden utilizar otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tales como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en una hebra de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281 (5375), 363 (1998); Pat. de EE.UU. N.º 6,210,891; Pat. de EE.UU. N.º 6,258,568 y Pat. de EE.UU. N.º 6,274,320. En la pirosecuenciación, el PPi liberado se puede detectar convirtiéndose inmediatamente en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfúrilasa, y el nivel de ATP generado se puede detectar por los fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de

secuenciación se puede controlar mediante un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Se describen sistemas fluidicos, detectores y procedimientos útiles que se pueden adaptar para la aplicación de pirosecuenciación a amplicones producidos de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, en la solicitud de patente WIPO N.º de serie PCT/US11/57111, US 2005/0191698 A1, Pat. de EE.UU. N.º 7,595,883 y Pat. de EE.UU. N.º 7,244,559.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican el seguimiento en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa portadora de fluoróforo y nucleótidos marcados con fosfato en γ , o con guías de ondas de modo cero (ZMW). Las técnicas y los reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Koriach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente. Ejemplos de dichos sistemas de secuenciación son la pirosecuenciación (p. ej., plataforma comercialmente disponible de 454 Life Sciences, una subsidiaria de Roche), secuenciación usando nucleótidos marcados en el fosfato γ (p. ej., plataforma comercialmente disponible de Pacific Biosciences) y secuenciación usando detección de protones (p. ej., plataforma comercialmente disponible de Ion Torrent, subsidiaria de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en los documentos US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; o US 2010/0282617 A1. Los métodos establecidos en el presente documento para amplificar ácidos nucleicos diana usando exclusión cinética se pueden aplicar fácilmente a sustratos usados para detectar protones. Más específicamente, los métodos establecidos en el presente documento se pueden usar para producir poblaciones clonales de amplicones que se usan para detectar protones.

Otra técnica de secuenciación es la secuenciación por nanoporos (véase, por ejemplo, Deamer et al. *Trends Biotechnol.* 18, 147-151 (2000); Deamer et al. *Acc. Chem. Res.* 35:817-825 (2002); Li et al. *Nat. Mater.* 2:611-615 (2003). En algunas realizaciones de nanoporos, el ácido nucleico diana o los nucleótidos individuales extraídos de un ácido nucleico diana pasan a través de un nanoporo. A medida que el ácido nucleico o nucleótido pasa a través del nanoporo, se puede identificar cada tipo de nucleótido midiendo las fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro. (Pat. de EE.UU. N.º 7,001,792; Soni et al. *Clin. Chem.* 53, 1996-2001 (2007); Healy, *Nanomed.* 2, 459-481 (2007); Cockroft et al. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 818-820 (2008).

Los métodos de ejemplo para el análisis de genotipado y expresión basado en matriz que se pueden aplicar a la detección de acuerdo con la presente descripción se describen en la Pat. de EE.UU. N.º 7,582,420; 6,890,741; 6,913,884 o 6,355,431 o Pub. Pat. de EE.UU. N.º 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1.

En los métodos de aislamiento, amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos que se describen en el presente documento, se utilizan diversos reactivos para el aislamiento y la preparación de ácidos nucleicos. Dichos reactivos pueden incluir, por ejemplo, lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa Φ 29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (por ejemplo, Tn5), cebadores (por ejemplo, secuencias de adaptadores P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, trifosfatos de desoxinucleótidos, tampones o cationes divalentes. Estos reactivos pasan a través de los poros de las perlas de hidrogel, mientras que el material genético es retenido dentro de las perlas de hidrogel. Una ventaja de los métodos expuestos en el presente documento 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 objetivo.

Los adaptadores pueden incluir sitios de cebadores de secuenciación, sitios de cebadores de amplificación e índices. Como se usa en el presente documento, un "índice" puede incluir una secuencia de nucleótidos que se puede usar como identificador molecular y/o código de barras para marcar un ácido nucleico y/o para identificar la fuente de un ácido nucleico. En algunas realizaciones, se puede usar un índice para identificar un solo ácido nucleico o una subpoblación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se pueden preparar bibliotecas de ácidos nucleicos dentro de una perla de hidrogel. En algunas realizaciones, una sola célula encapsulada dentro de una perla de hidrogel puede usarse para la indexación combinatoria de las células individuales, por ejemplo, usando un enfoque de transposición que preserva la contigüidad (CPTSeq). En algunas realizaciones, el ADN de una sola célula se puede marcar con código de barras mediante la encapsulación de células individuales después de la amplificación WGA con otra perla que lleva transposones con código de barras y disolviendo la matriz del gel poniéndola en contacto con un agente reductor, por ejemplo, para liberar ADN genómico para el marcado con código de barras.

Los métodos y técnicas de "indexación espacial" descritos en el presente documento acortan el análisis de datos y simplifican el procedimiento de preparación de bibliotecas a partir de células individuales y moléculas de ADN largas. Los protocolos existentes para la secuenciación de células individuales requieren la separación física eficiente de las células y marcar con código de barras único cada célula aislada y volver a agrupar todo para realizar la secuenciación. Los protocolos actuales para lecturas largas sintéticas también requieren engorrosas etapas de marcado con códigos de barras y juntar cada fragmento con código de barras para secuenciar y permitir que el análisis de datos distinga la

información genética que proviene de cada célula con código de barras. Durante estos largos procedimientos también se produce pérdida de material genético que produce interrupciones en las secuencias. Las realizaciones descritas en el presente documento no solo acortan el procedimiento sino que también aumentan la resolución de datos para células individuales. Además, las realizaciones proporcionadas en el presente documento simplifican el ensamblaje de genomas de nuevos organismos. Las realizaciones descritas en el presente documento pueden usarse para poner de manifiesto variaciones genéticas raras y la coexistencia de mutaciones. En algunas realizaciones, una biblioteca de ADN confinada en las perlas de hidrogel hasta la liberación brinda la oportunidad de controlar el tamaño de los fragmentos que se liberan en la superficie controlando el procedimiento de liberación y la formulación del hidrogel.

En algunas realizaciones, la superficie es un dispositivo de celda de flujo. En algunas realizaciones, la celda de flujo es un dispositivo de celda de flujo personalizado que tiene pocillos, canales o patrones. En algunas realizaciones, la celda de flujo comprende una superficie con un patrón. En algunas realizaciones, la superficie con patrón comprende pocillos. En algunas realizaciones, los pocillos tienen un diámetro de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 50 µm, tal como 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm o 50 µm de diámetro, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados, y en donde los pocillos tienen una profundidad de aproximadamente 0.5 µm a aproximadamente 1 µm, tal como 0.5 µm, 0.6 µm, 0.7 µm, 0.8 µm, 0.9 µm o 1 µm de profundidad, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados. En algunas realizaciones, los pocillos se componen de material hidrófobo. En algunas realizaciones, el material hidrófobo comprende un fluoropolímero amorfo, tal como CYTOP, Fluoropel® o Teflon®.

En algunas realizaciones, la biblioteca se puede amplificar usando sitios de cebadores en las secuencias de adaptadores y secuenciar usando sitios de cebadores de secuenciación en las secuencias de adaptadores. En algunas realizaciones, las secuencias de adaptadores pueden incluir índices para identificar la fuente de los ácidos nucleicos. La eficacia de las etapas de amplificación posteriores se puede reducir por la formación de dímeros de cebadores. Para aumentar la eficacia de las etapas de amplificación posteriores, los adaptadores monocatenarios no ligados se pueden eliminar de los productos de ligadura.

Preparación de bibliotecas de ácidos nucleicos con perlas de hidrogel

Algunas realizaciones de los sistemas, métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento incluyen métodos en los que se ligan adaptadores 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 usa en el presente documento, una secuencia P5 comprende una secuencia definida por la SEQ ID NO: 1 (AATGATACGGCGACCAACCGA) y una secuencia P7 comprende una secuencia definida por la SEQ ID NO: 2 (CAAGCAGAAGAGCGGCATACGA). La secuencia P5 o P7 puede incluir además un polinucleótido espaciador, que puede tener de 1 a 20, tal como 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. En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador polyT, tal como un espaciador 10T. Los nucleótidos espaciadores se pueden incluir en los extremos 5' de los polinucleótidos, que pueden estar unidos a un soporte adecuado mediante un enlace con el extremo 5' del polinucleótido. La unión se puede lograr mediante un nucleófilo que contiene azufre, tal como fosforotioato, presente en el extremo 5' del polinucleótido. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluirá un espaciador poliT y un grupo fosforotioato 5'. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia de P5 es 5'fosforotioato-TTTTTTTTTTAATGATACGGCGACCAACCGA-3', y en algunas realizaciones, la secuencia de P7 es 5'fosforotioato-TTTTTTTTTTCAAGCAGAAGAGCGGCATACGA-3'.

Los índices pueden ser útiles para identificar la fuente de una molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un adaptador se puede modificar para evitar la formación de concatémeros, por ejemplo, mediante la adición de grupos de bloqueo que evitan la extensión del adaptador en uno o ambos extremos. Los ejemplos de grupos de bloqueo en 3' incluyen un espaciador C3 en 3', un didesoxinucleótido y la unión a un sustrato. Los ejemplos de grupos de bloqueo 5' incluyen un nucleótido 5' desfosforilado y la unión a un sustrato.

Los adaptadores incluyen ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos monocatenarios. Los adaptadores pueden incluir ácidos nucleicos cortos que tienen una longitud inferior, superior 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 cualesquiera de los tamaños anteriores. En algunas realizaciones, los adaptadores tienen un tamaño suficiente para pasar a través de los poros de las perlas de hidrogel. Los ácidos nucleicos diana incluyen ADN, tal como genómico o ADNc; ARN, tal como ARNm, ARNs 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 comprenden, por ejemplo, cadenas principales y enlaces de fosforamida, fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforamidita y ácido nucleico peptídico. Un ácido nucleico puede contener cualquier combinación de desoxirribo y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, que incluyen 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 aparearse con más de un tipo diferente de base y puede ser útil, por ejemplo, cuando se incluye en cebadores o insertos de oligonucleótidos que se usan para la hibridación.

aleatoria en muestras de ácidos nucleicos complejos, tales como muestras de ADN genómico. Un ejemplo de una base promiscua incluye la inosina que puede aparearse con adenina, timina o citosina. Otros ejemplos incluyen hipoxantina, 5-nitroindol, 5-nitroindol acílico, 4-nitropirazol, 4-nitroimidazol y 3-nitropirrol. Se pueden usar bases promiscuas que pueden aparearse con al menos dos, tres, cuatro o más tipos de bases.

- 5 Un método de ejemplo incluye la desfosforilación de los extremos 5' de los ácidos nucleicos diana para evitar la formación de concatémicos en las etapas de ligación posteriores; ligado de los primeros adaptadores a los extremos 3' de las dianas desfosforiladas utilizando una ligasa, en el que se bloquean los extremos 3' de los primeros adaptadores; refosforilación de los extremos 5' de las dianas ligadas; ligado de un segundo adaptador a los extremos 5' de las dianas desfosforiladas utilizando la ligasa monocatenaria, en el que los extremos 5' de los segundos adaptadores no están fosforilados.

- 10 Otro ejemplo incluye la digestión parcial del ácido nucleico con una exonucleasa 5' para formar un ácido nucleico bicatenario con salientes 3' monocatenarios. Se puede ligar un adaptador que contiene un grupo de bloqueo en 3' a los extremos 3' de un ácido nucleico bicatenario con salientes en 3'. El ácido nucleico bicatenario con salientes en 3' con adaptadores ligados se puede deshibridar para formar ácidos nucleicos monocatenarios. Un adaptador que contiene un extremo 5' no fosforilado se puede ligar al extremo 5' del ácido nucleico monocatenario.

- 15 Los métodos para desfosforilar ácidos nucleicos, tales como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, incluyen poner en contacto un ácido nucleico con una fosfatasa. Los ejemplos de fosfatasas incluyen fosfatasa intestinal de ternero, fosfatasa alcalina de camarón, fosfatasa antártica y fosfatasa alcalina APEX (Epicentre).

- 20 Los métodos para ligar ácidos nucleicos incluyen poner en contacto ácidos nucleicos con una ligasa. Los ejemplos de ligasas incluyen ARN ligasa 1 de T4, ARN ligasa 2 de T4, ligasa RtcB, ARN ligasa de Methanobacterium y ARN ligasa TS2126 (CIRCLIGASE).

Los métodos para fosforilar ácidos nucleicos, tales como el nucleótido 5' de un ácido nucleico, incluyen poner en contacto un ácido nucleico con una quinasa. Los ejemplos de quinasas incluyen polinucleótido quinasa T4.

Ejemplos

- 25 Ejemplo de referencia 1 - Preparación de perlas de hidrogel

El siguiente ejemplo no forma parte de la invención, pero demuestra la preparación de perlas de hidrogel que encapsulan fragmentos de ADN largos utilizando generadores de gotitas de microfluidos.

- 30 Se usó un generador de gotitas para generar las perlas de hidrogel. Las muestras que contenían fragmentos de ADN largos se mezclaron con un precursor de polímero y la mezcla se cargó en un depósito de muestra en un cartucho. En el espacio de 2 minutos, se generaron aproximadamente 50 000 perlas de hidrogel que contenían ADN largo de cada canal (8 canales para el procesamiento de 8 muestras independientes en cada cartucho). Las perlas de hidrogel de ADN largo se cargaron en una celda de flujo, donde las perlas de hidrogel se fijan dentro (alto del canal 100 µm y diámetro de 120 µm de las perlas de hidrogel) para la preparación de bibliotecas de manos libres. Las enzimas y los reactivos de Nextera entran en contacto con la celda de flujo, poniéndose en contacto con el ADN largo insertado dentro de la perla de hidrogel, formando una biblioteca. Luego, la biblioteca se sembró en la celda de flujo. Durante la siembra de la biblioteca, se cargó aceite para llenar el hueco entre las perlas y la celda de flujo se calentó para acelerar la difusión de la biblioteca. En presencia del aceite, la siembra se produjo muy cerca de la huella de cada perla de hidrogel (a partir de perlas de hidrogel de 120 µm de diámetro, la siembra de bibliotecas está limitada a un área de aproximadamente 120 µm de diámetro).

- 40 Las moléculas de ADN largas se cargaron y atraparon en perlas de hidrogel (aproximadamente 120 µm de diámetro) y la preparación de la biblioteca se realizó directamente en estas moléculas de ADN largas insertadas dentro de las perlas de hidrogel. Como resultado, todas las bibliotecas de ADN de una molécula de ADN larga específica se almacenaron dentro de las mismas perlas de hidrogel. A continuación, la biblioteca se liberó de las perlas de hidrogel a la superficie de la celda de flujo para sembrarlas como un grupo en la superficie de la celda de flujo. Los agrupamientos liberados de una molécula de ADN larga se agruparon como un "parche de agrupamientos" en la celda de flujo. Los agrupamientos dentro de un solo parche de una sola molécula de ADN larga simplifican la reconstrucción del genoma con mayor precisión y menos huecos en el andamio.

Ejemplo 2 - Indexación espacial de ADN largo

- 50 El siguiente ejemplo demuestra lecturas estroboscópicas de fragmentos de ADN largos de 100 kb encapsulados dentro de una perla de hidrogel con o sin MDA.

- Se prepararon perlas de hidrogel mezclando un polímero en presencia de ADN genómico de Corriell de aproximadamente 100 kb y formando perlas de hidrogel utilizando un generador de microgotas. El ADN se sometió a secuenciación de indexación espacial colocando las perlas de hidrogel formadas que encapsulaban los fragmentos de ADN en un dispositivo de celda de flujo y poniendo en contacto la celda de flujo con reactivos. No se realizó MDA. Las perlas se degradaron y se formaron agrupamientos en el dispositivo de celda de flujo. Como se muestra en la fig.

5, el promedio de agrupamientos por isla de ADN largo era de aproximadamente 33, el tamaño promedio de la isla de ADN largo era de 64 000 pares de bases y había aproximadamente 405 islas de ADN largo por perla.

Se preparó un segundo conjunto de perlas de hidrogel mezclando un polímero en presencia de ADN genómico de Coriell de aproximadamente 100 kb y formando perlas de hidrogel usando un generador de microgotas. El ADN se sometió a secuenciación de indexación espacial colocando las perlas de hidrogel formadas que encapsulaban los fragmentos de ADN en un dispositivo de celda de flujo y poniendo en contacto la celda de flujo con reactivos. Se realizó MDA antes de la tagmentación. Las perlas se degradaron y se formaron agrupamientos en el dispositivo de celda de flujo. Como se muestra en la fig. 6, el promedio de agrupamientos por isla de ADN largo aumentó a aproximadamente 85, el tamaño promedio de la isla de ADN largo era de 58 000 pares de bases, y había aproximadamente 166 islas de ADN largo por perla.

Se preparó un tercer conjunto de perlas de hidrogel mezclando un polímero en presencia de ADN genómico de Coriell de aproximadamente 10 kb y formando perlas de hidrogel usando un generador de microgotas. El ADN se sometió a secuenciación de indexación espacial colocando las perlas de hidrogel formadas que encapsulaban los fragmentos de ADN en un dispositivo de celda de flujo y poniendo en contacto la celda de flujo con reactivos. Se realizó MDA antes de la tagmentación. Las perlas se degradaron y se formaron agrupamientos en el dispositivo de celda de flujo. Como se muestra en la fig. 7, el promedio de agrupamientos por isla de ADN largo era de aproximadamente 57, el tamaño promedio de la isla de ADN largo era de 10 461 pares de bases y había aproximadamente 85 islas de ADN largo por perla.

Ejemplo 3 - Metagenómica en mezclas complejas de especies microbianas

El siguiente ejemplo demuestra la identificación de microbios unicelulares encapsulados dentro de un hidrogel.

Las perlas de hidrogel se prepararon como se describe en el presente documento utilizando un generador de microgotas de microfluidos. El material polimérico se mezcló con una muestra que contenía varios microbios, incluyendo *L. gasseri*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. vulgatus*, *A. baumannii*, *S. agalactiae* y *P. acnes*. A continuación, las células encapsuladas se lisaron y se sometieron a preparación de bibliotecas, después de lo cual se degradaron las perlas de hidrogel y se depositaron las bibliotecas sobre una superficie. Como se muestra en la fig. 9, se pudo identificar cada microbio debido a su compartimentación espacial en el dispositivo de celda de flujo. Por lo tanto, la encapsulación y las posteriores reacciones de ácidos nucleicos permiten la identificación a nivel de cepa de especies microbianas en mezclas complejas usando la compartimentación de lecturas en un ensayo de mini-metagenómica.

Ejemplo 4 - Indexación espacial en celda de flujo

El siguiente ejemplo demuestra la indexación espacial en celda de flujo.

Se obtuvo un dispositivo de celda de flujo y se lavó con 200 µl de PR2. Las perlas para el procesamiento también se lavaron con PR2. Se preparó un hidrogel diluido en PR2. El aumento de la dilución da como resultado un mayor espacio entre los hidrogeles. El hidrogel se insertó en la celda de flujo y se evitó la introducción de burbujas de aire en la celda de flujo. Se hicieron fluir 200 µl de PR2 a través de la celda de flujo para garantizar que las perlas permanecieran fijas durante el procedimiento. Se hicieron fluir 100 µl de RSB a través de la celda de flujo.

Se preparó una mezcla de tagmentación mezclando 25 µl de reactivo de tagmentación, 23 µl de RSB y 2 µl de enzima. La mezcla de tagmentación se introdujo en el canal estrecho para eliminar cualquier posible burbuja de aire en la entrada. A continuación, la mezcla de tagmentación se hizo fluir lentamente hacia la entrada. La celda de flujo se selló y se incubó durante 10 min a 55°C.

Se preparó una mezcla de tampón de parada mezclando 25 µl de tampón de tagmentación, 25 µl de RSB y 10 µl de tampón de parada. La mezcla de tampón de parada se hizo fluir lentamente en la celda de flujo sin introducir burbujas y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, se hicieron fluir 200 µl de PR2 a través del dispositivo.

La NPM se preparó mezclando 175 µl de RSB y 75 µl de NPM. La mezcla NPM se hizo fluir lentamente en el dispositivo de celda de flujo sin introducir ninguna burbuja de aire y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron fluir 200 µl de aceite con tensioactivo en el dispositivo de celda de flujo. Las micrografías pusieron de manifiesto que los hidrogeles estaban rodeados de mezcla NPM y aceite. La celda de flujo se selló y se incubó durante 3 minutos a 72°C para la reacción de llenado de huecos.

Se hicieron fluir 20-30 µl de aceite con tensioactivo y aceite con DTT (proporción 29/2) sobre el dispositivo de celda de flujo y se selló el dispositivo. En el procedimiento de liberación la temperatura inicial fue de 90°C durante 3 minutos, 60°C durante 5 minutos, 40°C durante 2 minutos y 20°C durante 2 minutos. La celda de flujo se lavó con 400 µl de PR2 y 200 µl de CLM. A continuación, la celda de flujo se lavó con 400 µl de PR2. Cuando se desea la siembra de Phix, se preparó un Phix con una concentración de 2-3 pM, y la biblioteca de phix se hizo fluir en el dispositivo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La celda de flujo se lavó con 200 µl de PR2. Se hicieron fluir 100-200 µl de AMX para la 1ª extensión y se incubó durante 5 min a 50°C. La celda de flujo se lavó con PR2 y se realizó una amplificación de 24 o 30 ciclos.

Las realizaciones de la invención proporcionan dispositivos, métodos y sistemas para retener material genético en un espacio físicamente confinado durante el procedimiento desde la lisis hasta la generación de la biblioteca. Proporcionan bibliotecas originadas a partir de una sola molécula de ADN larga o una sola célula para ser liberadas en la superficie de una celda de flujo en un espacio confinado. Una vez que la biblioteca a partir de una sola molécula de ADN o una sola célula en los compartimentos individuales se libera a la superficie de la celda de flujo, la biblioteca de cada compartimento queda sembrada muy cerca una de la otra.

Lista de secuencias

<110> Illumina, Inc.

10 <120> SECUENCIACIÓN DEL ADN MEDIANTE PERLAS DE HIDROGEL

<130> ILLINC.420A

<150> 62/630,175 <151> 2018-02-13

15

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga 20

30

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

40 caagcagaag acggcatacg a 21

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

50

<400> 3

tttttttttt aatgatacgg cgaccaccga

30

<210> 4

<211> 31

55 <212> **ADN**

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

60

<400> 4

tttttttt caagcagaag acggcatacg a 31

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de celda de flujo para realizar la secuenciación de ADN, que comprende:

un soporte sólido que comprende una superficie que tiene un hidrogel degradable que encapsula ADN depositado sobre ella, en donde el hidrogel degradable comprende poros que tienen un tamaño para permitir la difusión de un reactivo a través del hidrogel, pero que son demasiado pequeños para permitir que el ADN atraviese los poros.

2. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 1, en donde el soporte sólido se funcionaliza con un polímero de superficie, opcionalmente, en donde el polímero de superficie es la poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM) o acrilamida exenta de silano (SFA).

3. El dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la celda de flujo comprende una superficie con un patrón, opcionalmente, en donde la superficie con un patrón comprende pocillos, opcionalmente, en donde los pocillos tienen un diámetro de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 50 µm, tal como 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm o 50 µm de diámetro, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados, o en donde los pocillos son de aproximadamente 0.5 µm a aproximadamente 1 µm de profundidad, tal como 0.5 µm, 0.6 µm, 0.7 µm, 0.8 µm, 0.9 µm o 1 µm de profundidad, o dentro de un intervalo definido por dos cualesquiera de los valores antes mencionados.

4. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 3, en donde los pocillos están compuestos de material hidrófobo, opcionalmente, en donde el material hidrófobo comprende un fluoropolímero amorfo, tal como CYTOP, Fluoropel® o Teflon®.

5. El dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el hidrogel degradable es una perla de hidrogel o una capa de hidrogel.

6. El dispositivo de celda de flujo de la reivindicación 5, en donde la perla de hidrogel tiene un diámetro de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 150 µm.

7. El dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el hidrogel comprende polietilenglicol (PEG)-tiol, PEG-acrilato, acrilamida, N,N'-bis(acriloil)cistamina (BACy), PEG, poli(óxido de propileno) (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), polilisina, agar, agarosa, alginato, heparina, sulfato-alginato, sulfato de dextrano, hialuronano, pectina, carragenano, gelatina, quitosano, celulosa, colágeno, bisacrilamida, diacrilato, dialilamina, triálilamina, divinilsulfona, éter dialílico de dietilenglicol, diacrilato de etilenglicol, diacrilato de polimetilenglicol, diacrilato de polietilenglicol, trimetacrilato de trimetilopropoano, triacrilato de trimetilol etoxilado o tetracrilato de pentaeritritol etoxilado, o combinaciones o mezclas de los mismos, preferiblemente en donde el hidrogel comprende PEG-tiol/PEG-acrilato, acrilamida/N,N'-bis(acriloil)cistamina (BACy), o PEG/PPO.

8. El dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el ADN es una molécula de ADN larga de 50 000 pares de bases o más.

9. El dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el reactivo comprende enzimas, productos químicos y cebadores que tienen un tamaño de menos de 50 pares de bases, o en donde el reactivo comprende lisozima, proteinasa K, hexámeros aleatorios, polimerasa (ADN polimerasa Φ29, polimerasa Taq, polimerasa Bsu), transposasa (Tn5), cebadores (secuencias de adaptadores P5 y P7), ligasa, enzima catalizadora, trifosfatos de desoxinucleótidos, tampones o cationes divalentes.

10. Un sistema para la secuenciación de ADN, que comprende:

una platina configurada para contener un dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9;

un dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y

un detector para obtener datos de secuenciación.

11. Un método de secuenciación de ADN que comprende:

obtener una perla que encapsula ADN dentro de un hidrogel;

realizar una reacción de tagmentación en el ADN encapsulado dentro del hidrogel, generando así una biblioteca de ADN encapsulada dentro del hidrogel;

sembrar la biblioteca de ADN en un dispositivo de celda de flujo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y

secuenciar el ADN.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el ADN es una molécula de ADN larga de 50 000 pares de bases o más.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, que comprende además realizar una reacción de amplificación de ADN en el ADN encapsulado dentro del hidrogel.
- 5 14. El método de la reivindicación 13, en donde la reacción de amplificación de ADN en el ADN encapsulado dentro del hidrogel se realiza antes de realizar la reacción de tagmentación, opcionalmente, en donde la reacción de amplificación de ADN comprende la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA).
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto material genético con una mezcla de transposasa que comprende secuencias de adaptadores y transposomas.
- 10 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde la perla que encapsula el ADN se carga en la celda de flujo antes de realizar la tagmentación.
- 15 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde la siembra comprende escindir el hidrogel para liberar la biblioteca de ADN del hidrogel, opcionalmente, en donde el hidrogel se escinde poniendo en contacto el hidrogel con una mezcla de escisión o calentando el hidrogel a aproximadamente 90°C para liberar la biblioteca de ADN, opcionalmente, en donde la mezcla de escisión comprende ditioneitol (DTT), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o tris(3-hidroxipropil)fosfina (THP).

ADN largo

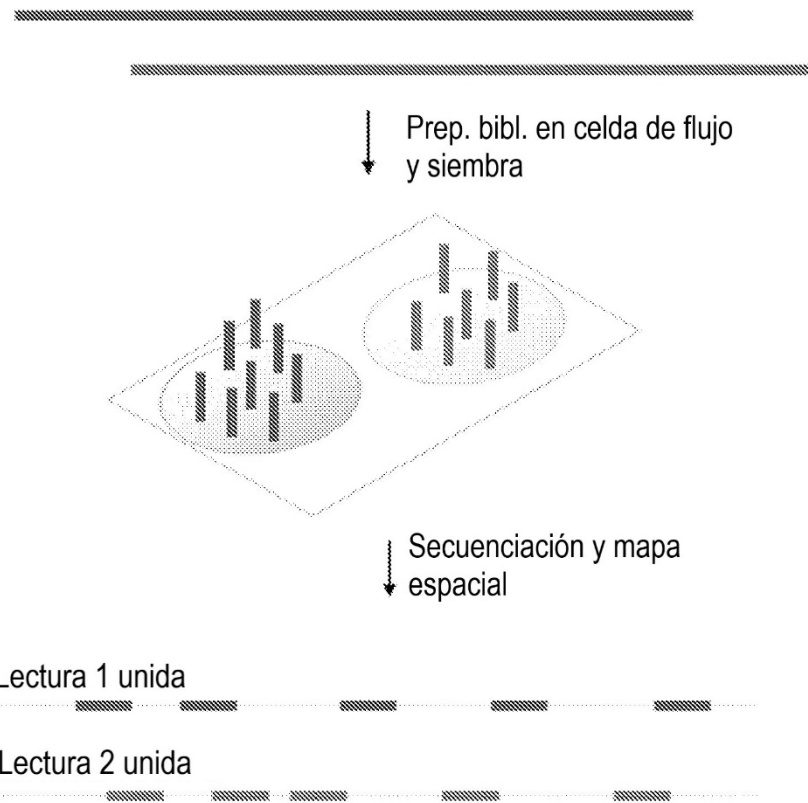


FIG. 1A

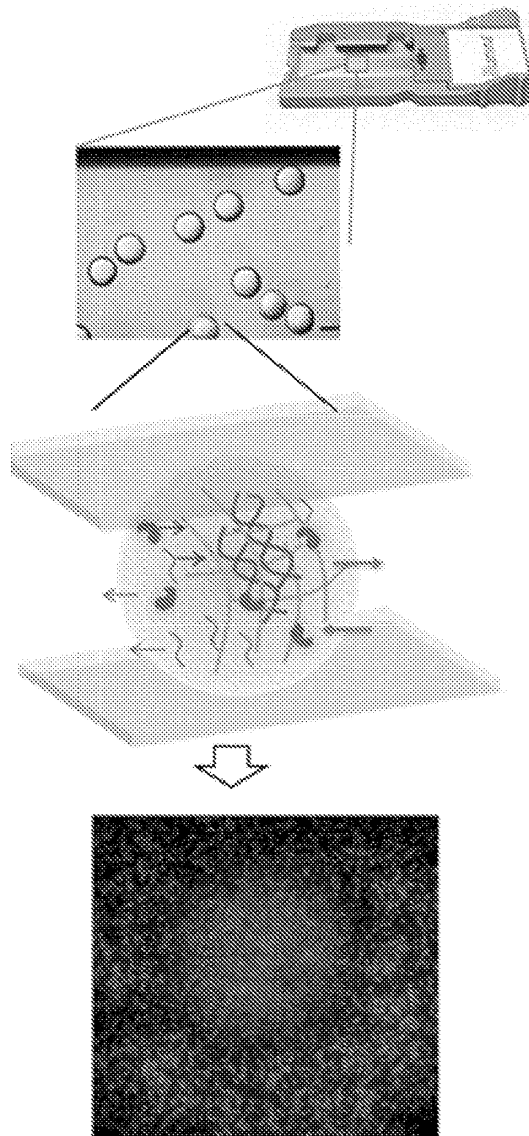


FIG. 1B

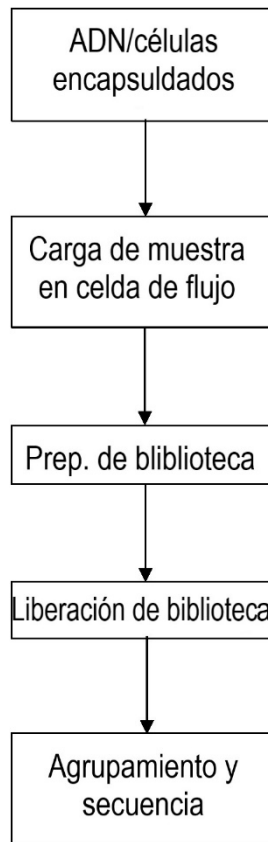


FIG. 2

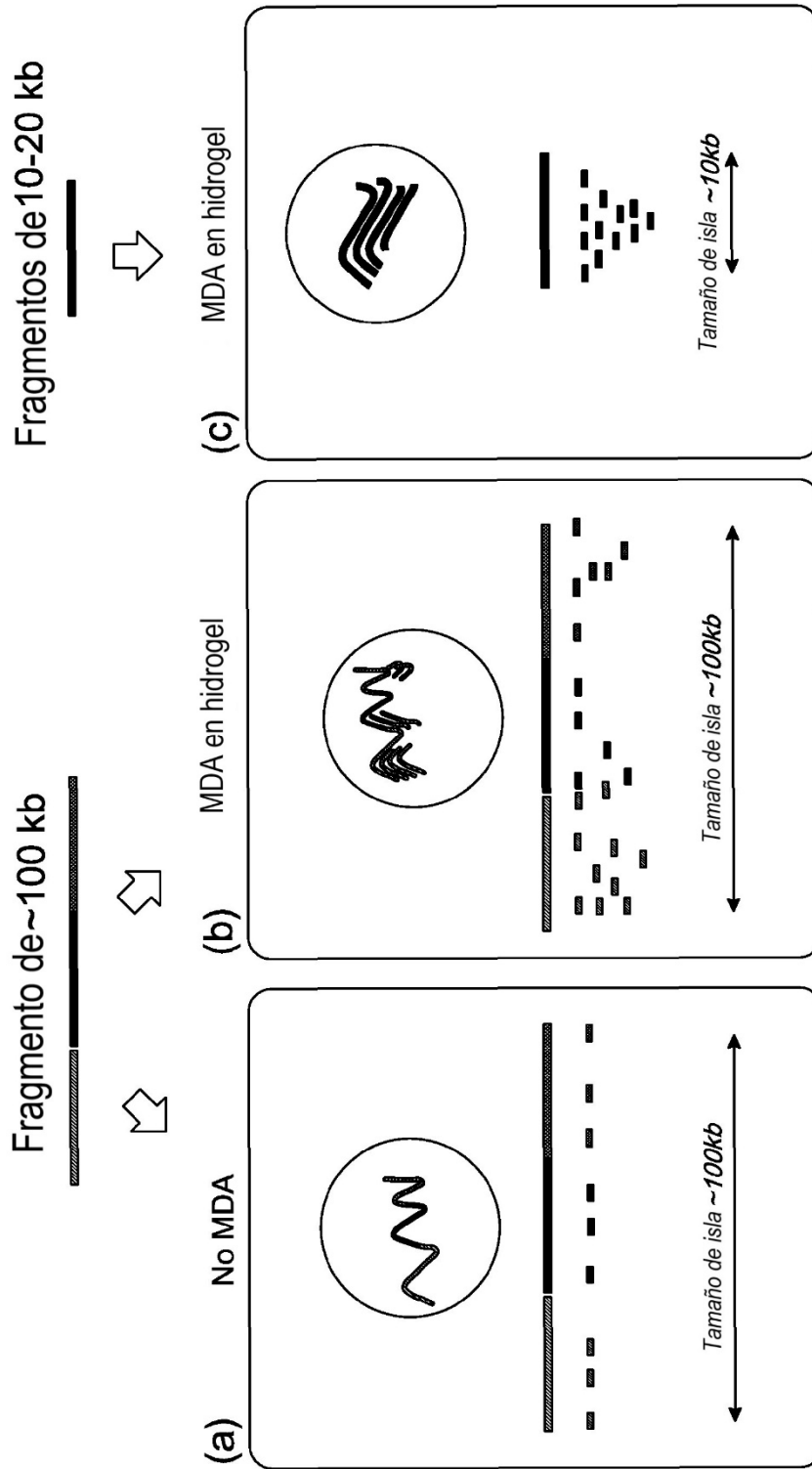


FIG. 3

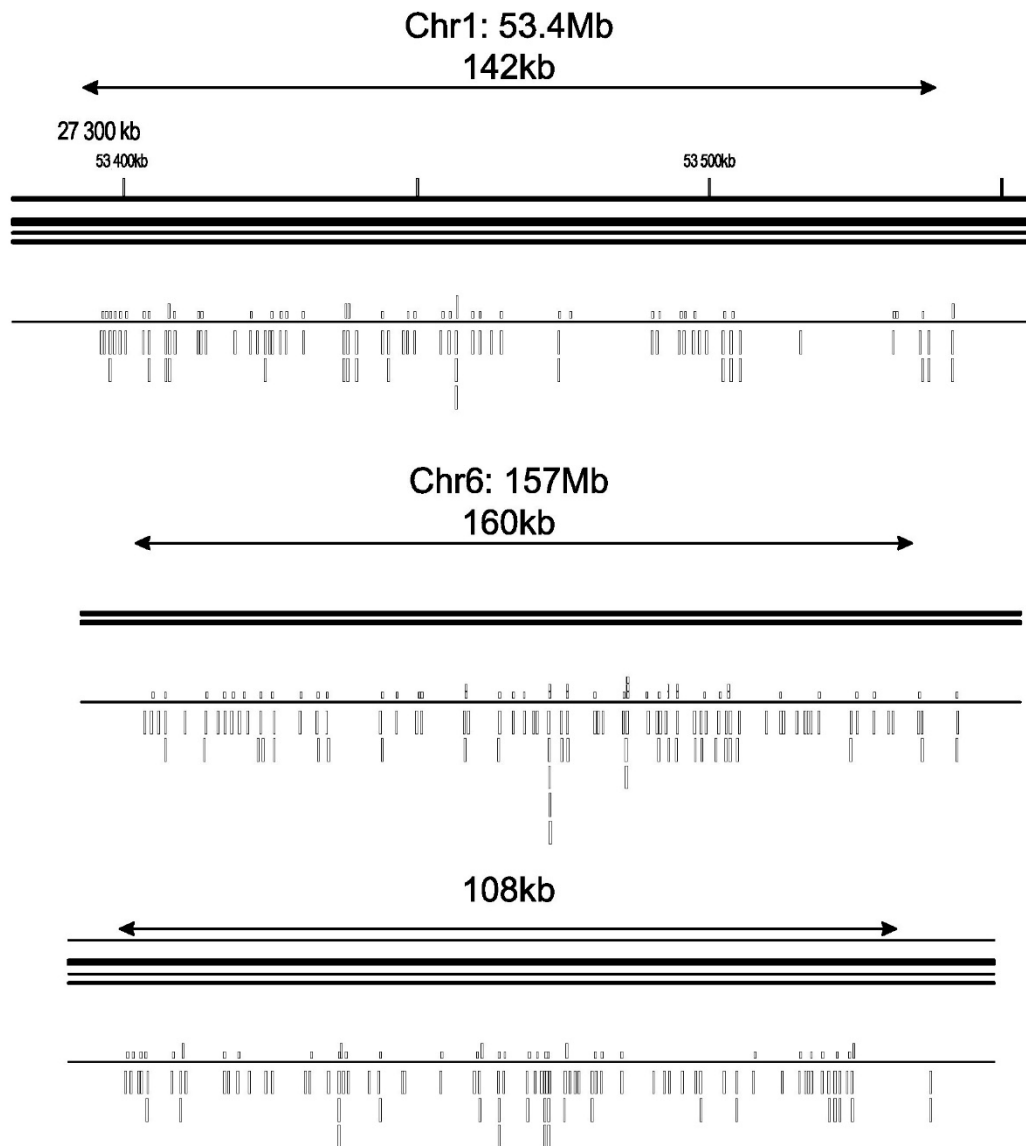


FIG. 4

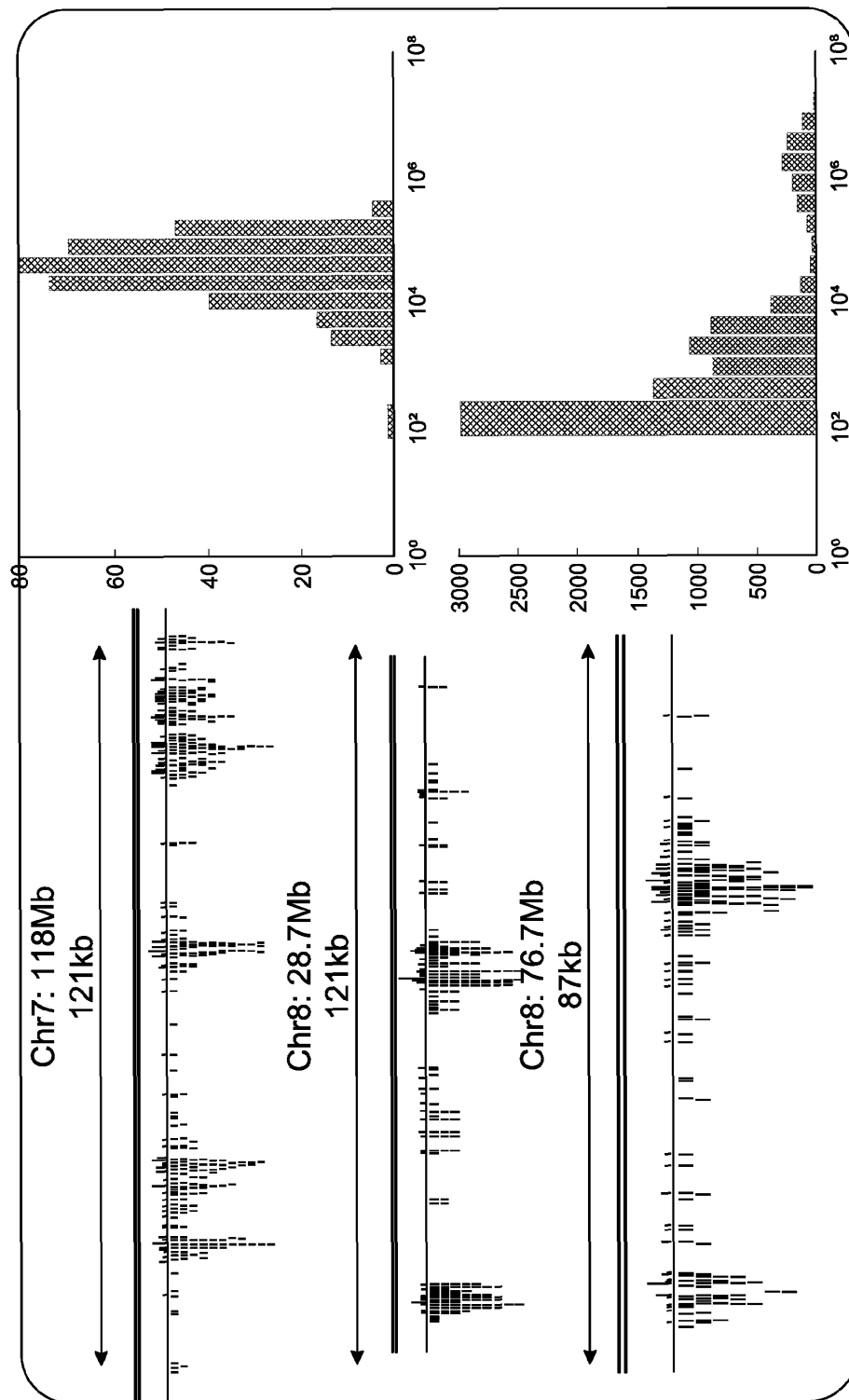


FIG. 5

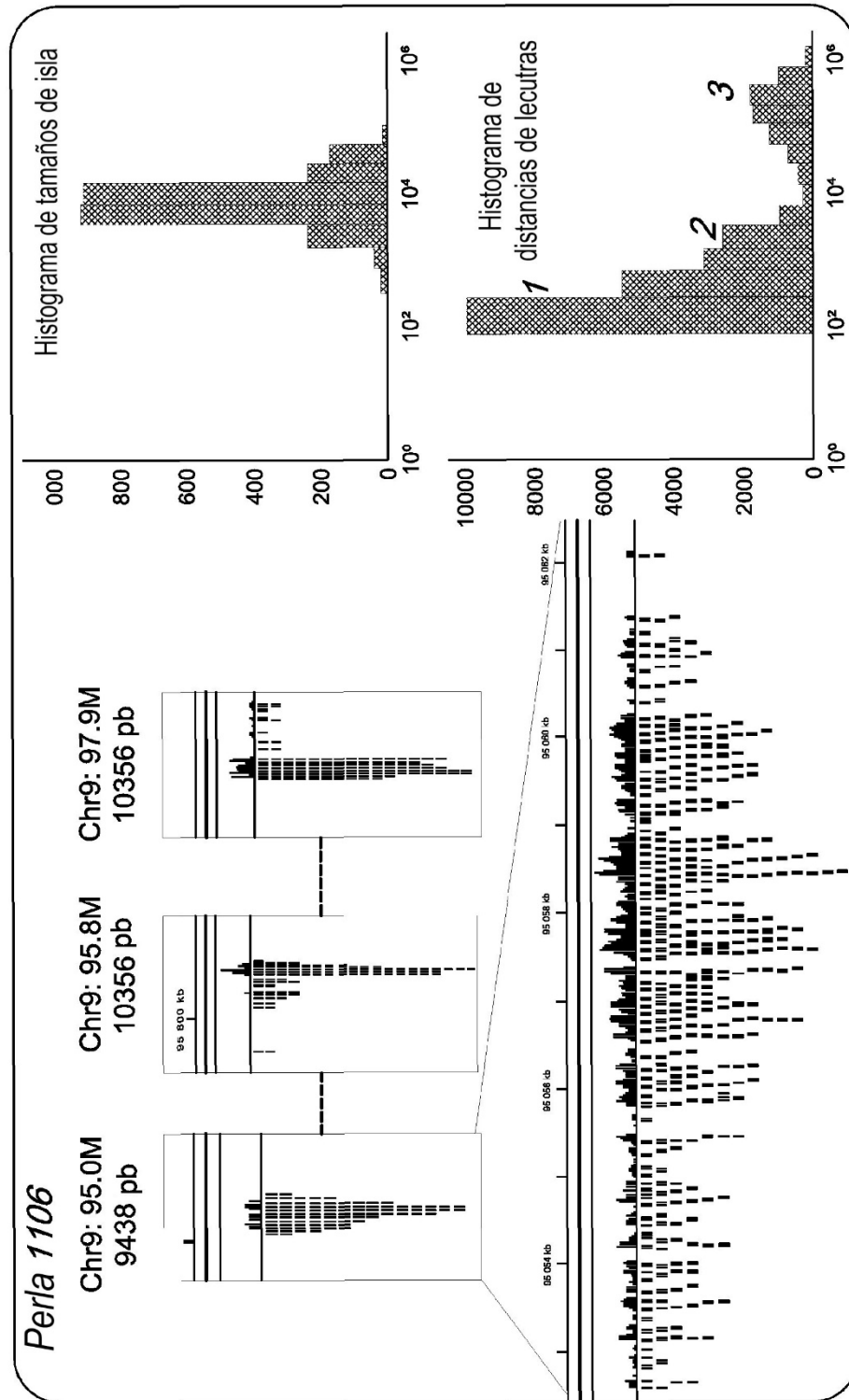
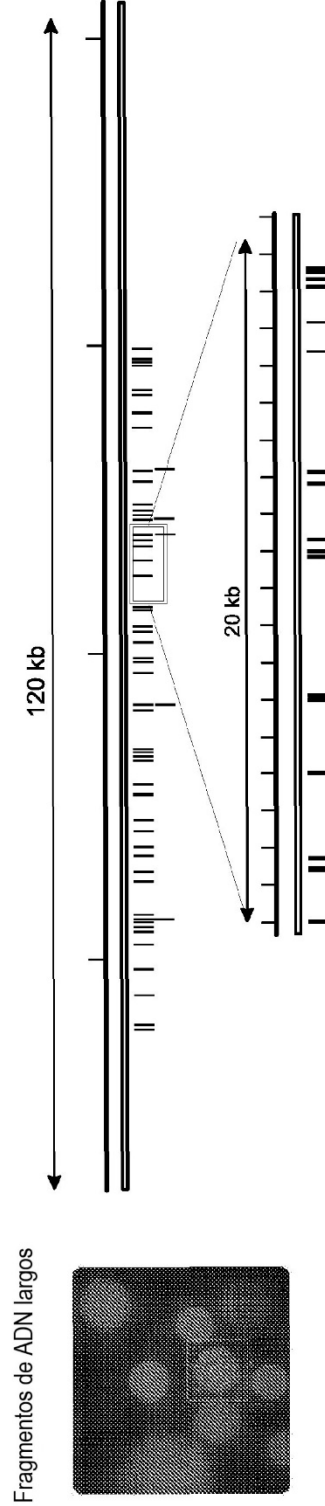
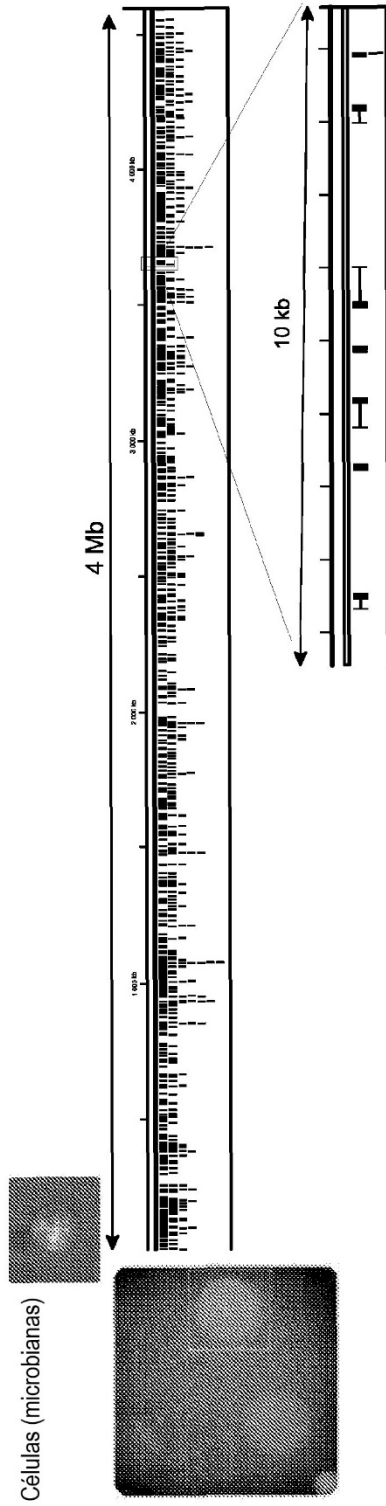


FIG. 6



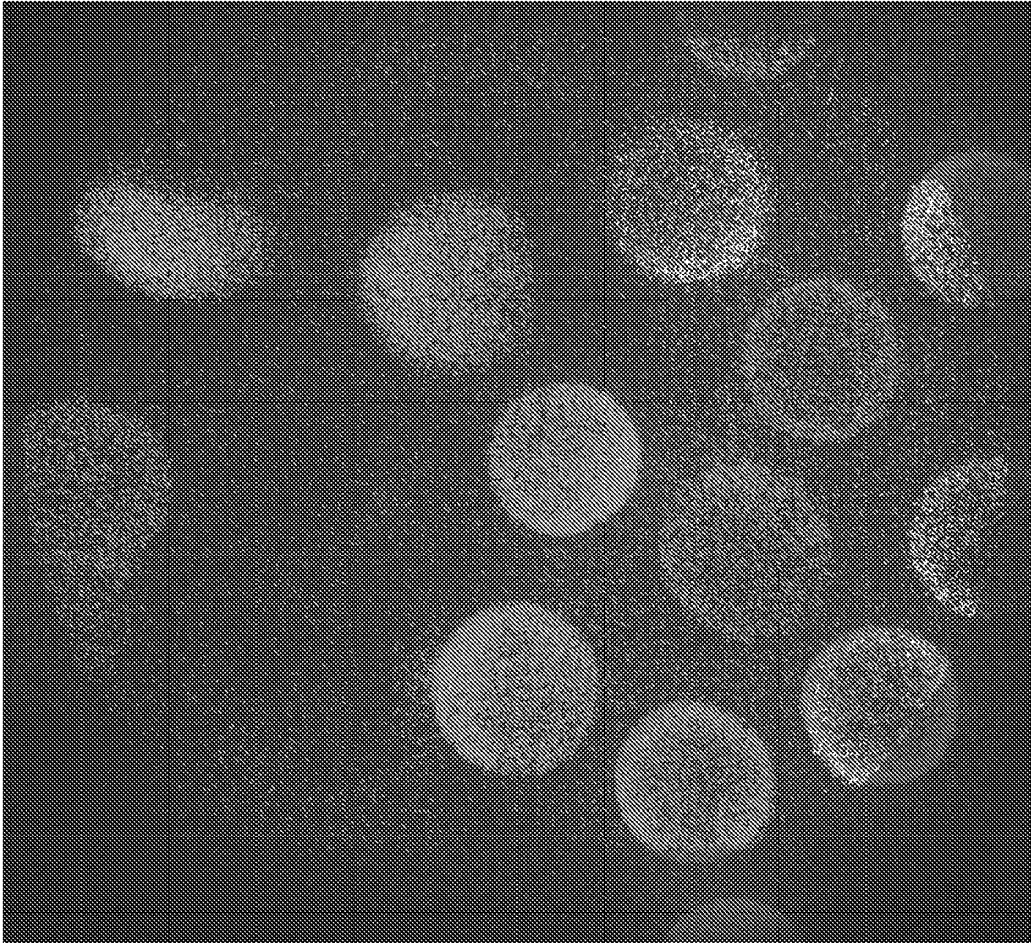
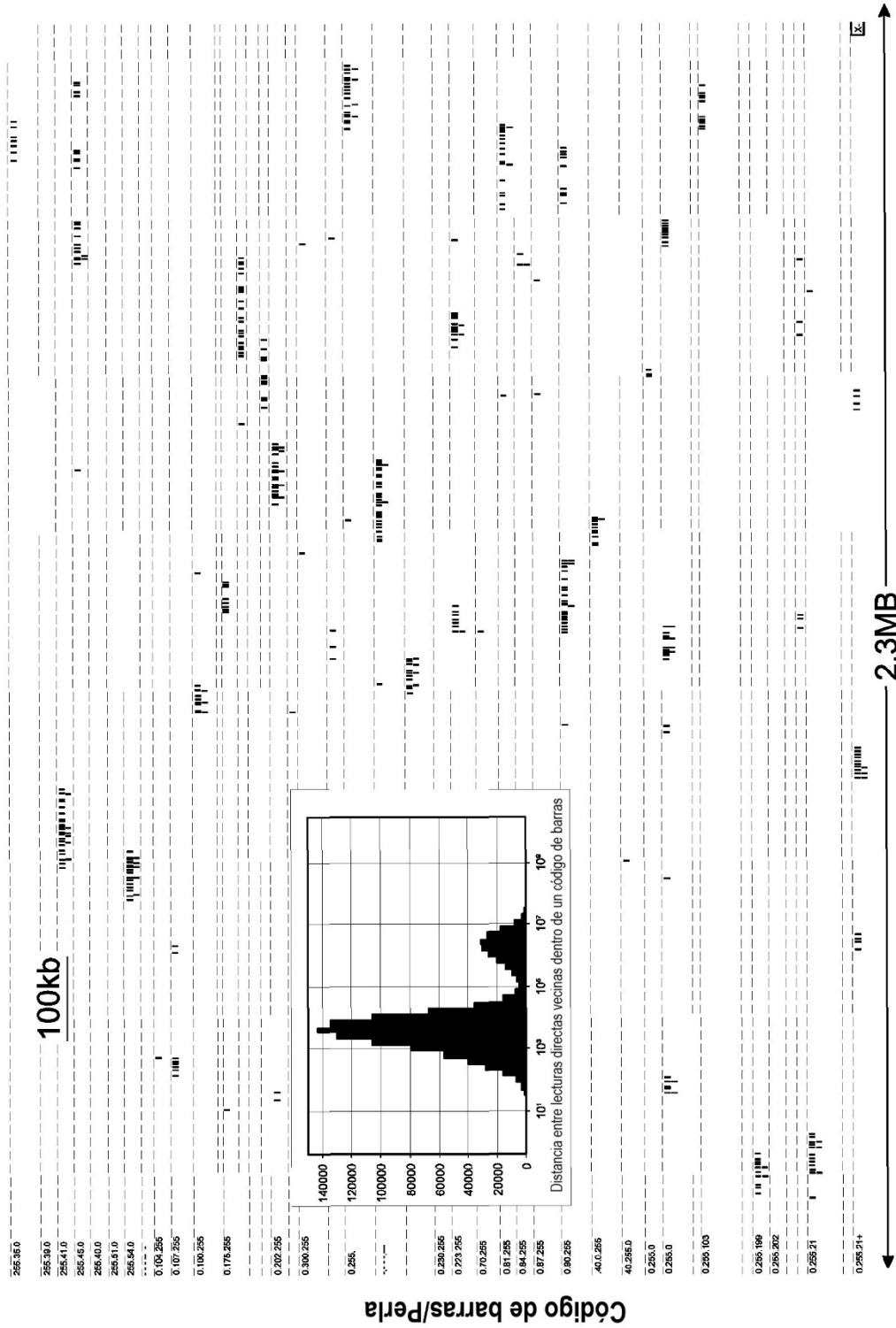


FIG. 8

FIG. 9



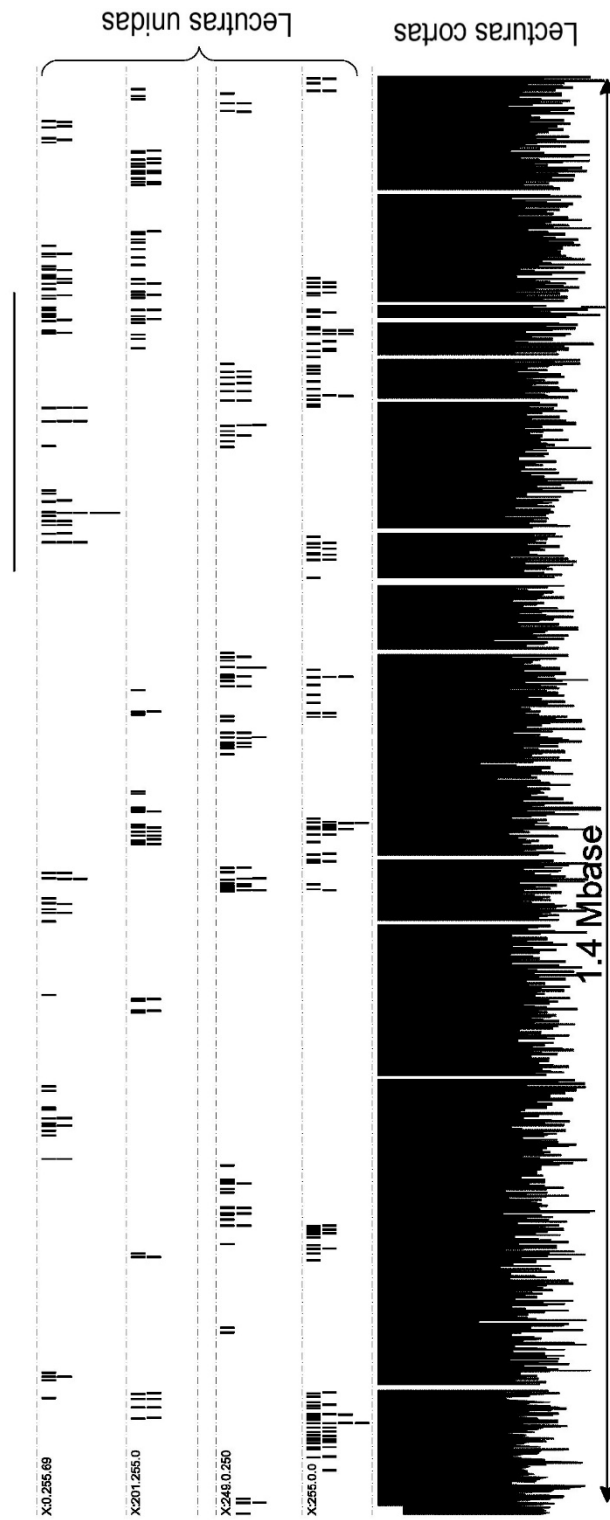


FIG. 10A

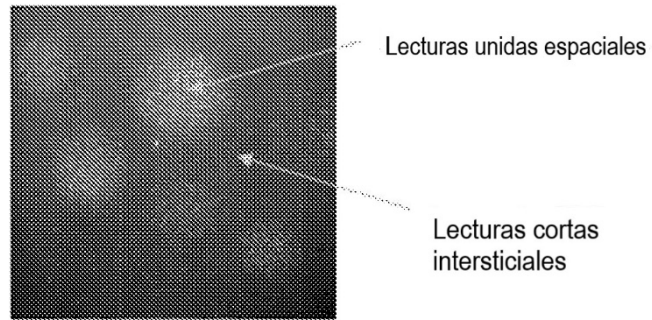


FIG. 10B