

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 429**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2016 PCT/US2016/049046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17040306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2016 E 16760336 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3341494**

54 Título: **Análisis de secuencia de ácidos nucleicos de células individuales**

30 Prioridad:

28.08.2015 US 201562211597 P
15.09.2015 US 201514855207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SALATHIA, NEERAJ;
FAN, JIAN-BING;
KAPER, FIONA;
CANN, GORDON M.;
JAMSHIDI, ARASH y
ARAVANIS, ALEX

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 988 429 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

Análisis de secuencia de ácidos nucleicos de células individuales

5 **Antecedentes**

La determinación del contenido de ARNm de una célula o tejido (es decir, “perfil de expresión génica”) proporciona un método para el análisis funcional de tejidos y órganos normales y enfermos. La determinación del perfil de expresión genética generalmente se realiza aislando el ARNm de muestras de tejido y sometiendo este ARNm a hibridación en chips. Sin embargo, estos métodos solo permiten analizar genes previamente conocidos y no pueden usarse para analizar corte y empalme alternativo, promotores y señales de poliadenilación. Adicionalmente, los chips tienen dos deficiencias importantes: están vinculados a genes conocidos y tienen una sensibilidad y un intervalo dinámico limitados.

15 Macosko y col. Cell, Volumen 161, Número 5, páginas 1202-1214 desvelan un perfil de expresión altamente paralelo de todo el genoma de células individuales usando gotículas de nanolitros.

Se usa cada vez más la secuenciación directa de todo o parte del contenido de ARNm de un tejido. Sin embargo, los métodos actuales para analizar el contenido de ARNm de las células mediante secuenciación directa se basan en el análisis de ARNm en masa obtenido de muestras de tejido que típicamente contienen millones de células. Esto significa que gran parte de la información funcional presente en las células individuales se pierde o se desdibuja cuando se analiza la expresión genética en el ARNm en masa. Además, los procesos dinámicos, tales como el ciclo celular, no pueden observarse en los promedios poblacionales. De manera similar, los distintos tipos de células en un tejido complejo (por ejemplo, el cerebro) solo pueden estudiarse si se analizan las células individualmente.

A menudo no existen marcadores de superficie celular adecuados para aislar células individuales para su estudio, e incluso cuando los hay, una pequeña cantidad de células individuales no es suficiente para capturar el intervalo de variación natural en la expresión genética. Lo que se necesita es un método para preparar genotecas de ADNc que puedan usarse para analizar la expresión génica en una pluralidad de células individuales.

30 **Resumen**

Se presentan en la presente memoria métodos para preparar una genoteca de ADNc a partir de una pluralidad de células individuales. Algunos métodos pueden usarse para el análisis de la expresión génica de células individuales multiplexadas. Algunos métodos incluyen el uso de gotículas y/o perlas que llevan códigos de barras únicos tales como códigos de barras moleculares únicos (UMI).

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

40 El método para preparar una genoteca de ADNc a partir de una pluralidad de células individuales, comprendiendo el método las etapas de:

liberar ARNm de cada célula individual para proporcionar una pluralidad de muestras de ARNm individuales, en donde el ARNm en cada muestra de ARNm individual es de una célula individual;

45 sintetizar una primera cadena de ADNc a partir del ARNm en cada muestra individual de ARNm con un cebador de síntesis de primera cadena, en donde el cebador de síntesis de primera cadena es una mezcla de cebador oligo dT y cebador aleatorizador comprendiendo además cada uno un primer sitio de unión del cebador de amplificación;

50 incorporar una etiqueta en el ADNc para proporcionar una pluralidad de muestras de ADNc etiquetadas, en donde el ADNc en cada muestra de ADNc etiquetada es complementario al ARNm de una célula individual, y en donde la etiqueta comprende una secuencia identificadora específica de la célula y opcionalmente una secuencia identificadora molecular única (UMI, *unique molecular identifier*);

55 agrupar las muestras de ADNc etiquetadas;

amplificar opcionalmente las muestras de ADNc agrupadas para generar una genoteca de ADNc que comprende ADNc bicatenario; y

60 realizar una reacción de tagmentación para escindir simultáneamente cada ADNc e incorporar un adaptador en cada cadena del ADNc, generando de este modo una pluralidad de fragmentos de ADNc etiquetados, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto el ADNc bicatenario con una mezcla de transposasa que comprende una secuencia adaptadora que no se encuentra en el cebador de síntesis de la primera cadena, y en donde la mezcla de transposasa consiste esencialmente en transposomas que tienen la misma secuencia adaptadora.

65

En algunas realizaciones, el método incluye además la incorporación de un cebador oligonucleotídico de cambio de molde (cebador TSO, *template switching oligonucleotide*) junto con la mezcla de cebador oligo dT y aleatorizador, comprendiendo cada uno de cebador oligo dT y aleatorizador además un primer sitio de unión del cebador de amplificación. En algunas realizaciones, el cebador TSO comprende además un segundo sitio de unión al cebador de amplificación. En algunas realizaciones, el cebador de síntesis de primera cadena se extiende más allá del molde de ARNm y copia además la cadena del cebador TSO. En algunas realizaciones, la segunda cadena de ADNc se sintetiza usando el cebador TSO. En algunas realizaciones, la segunda cadena de ADNc se sintetiza usando el segundo cebador de amplificación complementario a la primera cadena de ADNc que se extiende más allá del molde de ARNm para abarcar la cadena TSO complementaria. En algunas realizaciones, el ADNc bicatenario se amplifica con un primer y un segundo cebadores de amplificación. En algunas realizaciones, el primer, el segundo o tanto el primer como el segundo cebadores de amplificación se inmovilizan sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos ilustrativos incluyen perlas, cubetas de lectura, micropocillos.

En algunas realizaciones, el ADNc bicatenario se somete a una reacción de tagmentación de tal manera que puedan introducirse códigos de barras en el ADNc bicatenario. Los métodos ilustrativos de tagmentación se desvelan en las patentes de EE.UU. 9.115.396; 9.080.211; 9.040.256; publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2014/0194324. En algunas realizaciones, los códigos de barras pueden usarse para determinar la información de contigüidad de la secuencia. En algunas realizaciones, los códigos de barras pueden usarse como un identificador de fuente.

En algunas realizaciones, el cebador de síntesis de primera cadena comprende una etiqueta. En algunas realizaciones, el cebador TSO comprende una etiqueta. En algunas realizaciones, el ADNc marcado de los núcleos de células individuales puede agruparse y, opcionalmente, amplificarse.

En la presente memoria se describen por referencia métodos que incluyen la preparación de una genoteca de secuenciación a partir de microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN ribosómico o ADN mitocondrial de una célula individual. El método incluye liberar los orgánulos celulares de una célula individual para proporcionar una pluralidad de orgánulos. Los orgánulos están separados espacialmente entre sí de tal manera que un orgánulo está presente en un compartimento espacial. Una primera cadena de ADN se sintetiza a partir de microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN ribosómico o ADN mitocondrial con un cebador de síntesis de primera cadena. En algunas realizaciones, el cebador de síntesis de primera cadena es un aleatorizador. En algunas realizaciones, el cebador de síntesis de primera cadena es un aleatorizador que comprende además un sitio de unión del cebador. En alguna descripción, el cebador de síntesis de primera cadena es una mezcla de un cebador de síntesis específico de primera cadena y un aleatorizador. En algunas descripciones, el cebador de síntesis de primera cadena es una mezcla de un cebador de síntesis específico de primera cadena y un aleatorizador, comprendiendo cada uno de ellos además un primer sitio de unión del cebador de amplificación.

En algunas descripciones, el cebador que se une al primer sitio de unión del cebador es un cebador de amplificación. En algunas realizaciones, el método incluye además la incorporación de un cebador de oligonucleótido de cambio de molde (cebador TSO) junto con la mezcla de un cebador de síntesis específico de primera cadena y un aleatorizador, comprendiendo cada uno del cebador de síntesis específico de primera cadena y un aleatorizador además un primer sitio de unión del cebador. En algunas descripciones el cebador TSO comprende además un segundo sitio de unión al cebador. En algunas descripciones, el cebador que se une al segundo sitio de unión del cebador es un cebador de amplificación. En algunas descripciones, el cebador de síntesis de primera cadena se extiende más allá del molde de microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN ribosómico o ADN mitocondrial y copia además la cadena del cebador TSO. En algunas descripciones, la segunda cadena de ADN se sintetiza usando el cebador TSO. En algunas descripciones, la segunda cadena de ADN se sintetiza usando el segundo cebador complementario a la primera cadena de ADN que se extiende más allá del ARN o ADN molde para abarcar la cadena TSO complementaria. En algunas descripciones, el ADN bicatenario se amplifica con un primer y un segundo cebadores.

En una realización, los orgánulos tales como núcleos, mitocondrias, ribosomas se separan espacialmente mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) y cada orgánulo se clasifica en un compartimento espacial, por ejemplo, un solo micropocillo en un chip Fluidigm C1. En algunas realizaciones, cada orgánulo está separado espacialmente en un compartimento espacial al estar inmovilizado sobre una superficie sólida. Por ejemplo, a través de un anticuerpo, donde el anticuerpo se une específicamente al orgánulo y el anticuerpo queda inmovilizado en una superficie sólida. En algunas realizaciones, la superficie sólida es una cubeta de lectura o una perla.

En algunas realizaciones, los aleatorizadores comprenden uno o más cebadores cuasi aleatorios que se seleccionan del grupo que consiste en un conjunto rico en AT de cebadores de amplificación aleatorios; un conjunto de cebadores de amplificación aleatorios que comprenden extremos 5' ricos en AT; un conjunto de cebadores de amplificación aleatorios de longitud variable, en donde cada cebador comprende una porción 3' aleatoria y un extremo 5' degenerado, cuyo extremo 5' degenerado puede ser proporcional en longitud al contenido de A/T de la porción 3' aleatoria del cebador; un conjunto de cebadores aleatorios normalizados en Tm, en donde cada cebador del conjunto comprende uno o más análogos de base que pueden normalizar la Tm de cada cebador a la Tm de otros cebadores en el conjunto de cebadores; un conjunto de cebadores aleatorios, en donde cada cebador comprende una porción 3' aleatoria y una porción de cebado 5' constante; un conjunto de cebadores de amplificación aleatorios, en donde cada

5 cebador comprende una porción 3' aleatoria y una porción de cebado 5' constante y en donde la porción 3' aleatoria comprende ARN; un conjunto de cebadores de amplificación aleatorios, en donde cada cebador comprende una porción 3' aleatoria y una porción de cebado 5' constante, y en donde la porción 3' aleatoria comprende al menos una base no natural seleccionada del grupo que consiste en ácidos nucleicos que incluyen 2'-desoxi-2-tiotimidina (2-tio-dT), 2-aminopurina-2'-desoxirribósido (2-amino-dA), N4-etil-2'-desoxicitidina (N4-Et-dC), N4-metil desoxicitidina (N4-Me-dC), 2'-desoxiinosina, 7-desazaguanina (7-desaza-G), 7-yodo-7-desazaguanina (I-desazaG), 7-metil-7-desazaguanina (MecG), 7-etil-7-desazaguanina (EtcG) y cualquier combinación de los conjuntos de cebadores anteriores. Los cebadores cuasi aleatorios establecidos anteriormente se describen con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los cebadores cuasi aleatorios se proporcionan en pares o conjuntos.

15 Se proporciona un método para preparar una genoteca de ADNc a partir de una pluralidad de células individuales, comprendiendo el método las etapas de: liberar ARNm de cada célula individual para proporcionar una pluralidad de muestras de ARNm individuales, en donde el ARNm en cada muestra de ARNm individual es de una célula individual; sintetizar una primera cadena de ADNc a partir del ARNm en cada muestra individual de ARNm con un cebador de síntesis de primera cadena, en donde el cebador de síntesis de primera cadena es una mezcla de cebador oligo dT y cebador aleatorizador comprendiendo además cada uno un primer sitio de unión del cebador de amplificación; incorporar una etiqueta en el ADNc para proporcionar una pluralidad de muestras de ADNc etiquetadas, en donde el ADNc en cada muestra de ADNc etiquetada es complementario al ARNm de una célula individual, y en donde la etiqueta comprende una secuencia identificadora específica de la célula y opcionalmente una secuencia identificadora molecular única (UMI); agrupar las muestras de ADNc etiquetadas; amplificar opcionalmente las muestras de ADNc agrupadas para generar una genoteca de ADNc que comprende ADNc bicatenario; y realizar una reacción de tagmentación para escindir simultáneamente cada ADNc e incorporar un adaptador en cada cadena del ADNc, generando de este modo una pluralidad de fragmentos de ADNc etiquetados, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto el ADNc bicatenario con una mezcla de transposasa que comprende una secuencia adaptadora que no se encuentra en el cebador de síntesis de la primera cadena, y en donde la mezcla de transposasa consiste esencialmente en transposomas que tienen la misma secuencia adaptadora. En algunas realizaciones, cuando está presente una cantidad suficiente de células individuales, puede evitarse la amplificación del ADNc. La segunda cadena de ADNc puede sintetizarse usando un cebador oligonucleótido de cambio de molde (cebador TSO), seguido de Nextera simétrico.

25 En determinadas realizaciones, el método comprende además amplificar los fragmentos de ADNc etiquetados para generar fragmentos de ADNc etiquetados amplificados. En algunos aspectos, la amplificación comprende añadir una secuencia adicional al extremo 5' de los productos de amplificación.

35 En algunos aspectos, la secuencia adicional comprende una secuencia de unión del cebador para la amplificación sobre un soporte sólido. En algunos aspectos, la secuencia adicional comprende secuencias de índice adicionales.

40 En determinadas realizaciones, el método comprende además amplificar los fragmentos de ADNc etiquetados amplificados sobre un soporte sólido.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la secuenciación de los productos de amplificación sobre el soporte sólido.

45 En determinadas realizaciones, el método comprende además la secuenciación de los fragmentos de ADNc etiquetados.

En algunos aspectos, la secuenciación comprende el recuento de etiquetas 3'.

50 En algunos aspectos, la secuenciación comprende el análisis del transcriptoma completo.

En algunos aspectos, la síntesis de la primera cadena se realiza usando una mezcla de cebadores aleatorios, comprendiendo además los cebadores aleatorios una etiqueta.

55 En algunos aspectos, el cebador de síntesis de primera cadena comprende una porción bicatenaria. En algunas realizaciones, el cebador de síntesis de primera cadena que comprende una porción bicatenaria comprende además un bucle monocatenario en un extremo. En algunos aspectos, el cebador de síntesis de primera cadena comprende una región capaz de formar una horquilla.

60 En algunos aspectos, el cebador de síntesis de primera cadena reduce los subproductos de concatenación en comparación con un cebador de síntesis de primera cadena monocatenario.

En algunos aspectos, el cebador de síntesis de primera cadena comprende una región de ARN.

65 En algunos aspectos, el cebador de síntesis de primera cadena se hibrida con un oligonucleótido complementario, formando de este modo una porción bicatenaria.

5 Se describe en la presente memoria por referencia una pluralidad de perlas, en donde cada perla comprende una pluralidad de oligonucleótidos, comprendiendo cada oligonucleótido: (a) un enlazador; (b) un sitio de unión del cebador de amplificación; (c) opcionalmente un Identificador Molecular Único que difiere para cada oligonucleótido; (d) una secuencia específica de la perla que es la misma en cada oligonucleótido de la perla pero es diferente en otras perlas; y (e) una secuencia de captura para capturar ARNm y cebar la transcripción inversa.

En algunas descripciones para referencia, la secuencia de captura comprende oligo-dT.

10 En algunas descripciones para referencia cada perla está en una gotícula separada segregada de otras perlas.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es un esquema que muestra un esquema de la síntesis de ADNc usando la metodología SMARTer.

La Figura 2A es un esquema que muestra la síntesis de la primera cadena según una realización, cebada con oligo dT al que se le ha adjuntado un código de barras molecular (UMI) opcional, un código de barras (BC, *barcode*) de muestra, una secuencia de unión del cebador de amplificación (V2.A14) y una secuencia de cebador de cambio de molde (TS, *template switch*), seguido de cambio de molde, agrupamiento de muestras y PCR de cebador individual.

20 La Figura 2B es un esquema que muestra la tagmentación de productos de amplificación agrupados con Nextera simétrico, seguida de la amplificación usando diferentes cebadores de PCR directos (V2.B15) e inversos (V2.A14) y la posterior secuenciación de extremos apareados.

25 La Figura 3A es un esquema de la síntesis de la primera cadena según una realización, cebada con oligo dT al que se le ha adjuntado un código de barras (BC) de muestra, un código de barras molecular (UMI) opcional, una secuencia de unión del cebador de amplificación (V2.A14) y una secuencia de cebador de cambio de molde (TS), seguido de cambio de molde, agrupamiento de muestras y PCR de cebador individual. El UMI opcional está en el extremo 5' del BC.

30 La Figura 3B es un esquema que muestra la tagmentación de productos de amplificación agrupados, la amplificación y la secuenciación según una realización.

35 La Figura 4A es un esquema que muestra la síntesis de primera cadena según una realización.

La Figura 4B es un esquema que muestra la tagmentación de productos de amplificación agrupados, la amplificación y la secuenciación según una realización.

40 La Figura 5 es un esquema que muestra un método de agrupamiento y secuenciación de muestras multiplexadas según una realización.

La Figura 6 es una tabla que compara los métodos de análisis de expresión genética usando 100 pg de ARN de referencia de cerebro humano.

45 La Figura 7 es una tabla que compara métodos de análisis de expresión génica de células individuales de alto rendimiento usando células individuales.

50 La Figura 8 muestra gráficos que comparan la cobertura de transcrito con tagmentación usando solo un adaptador de transposasa (V2.B15) contra tagmentación usando tagmentación estándar/asimétrica, usando dos adaptadores de transposasa (V2.A14 y V2.B15).

La Figura 9A es un esquema que muestra el análisis del transcriptoma completo que implica la síntesis de la primera cadena usando aleatorizadores, según una realización.

55 La Figura 9B es un esquema que muestra los subproductos de concatenación que pueden producirse cuando se usan aleatorizadores para la síntesis de la primera cadena.

La Figura 10 muestra diversos diseños de cebadores para reducir o evitar los subproductos de concatenación.

60 La Figura 11 es un esquema que muestra que muestra el código de barras basado en gotículas según una realización.

La Figura 12 es un esquema que muestra el código de barras basado en perlas según una realización.

65 La Figura 13 es un esquema que muestra el flujo de trabajo de secuenciación de ARN de núcleo individual.

La Figura 14 muestra las etapas de la síntesis de ADNc a partir de núcleos individuales.

La Figura 15 es un esquema que muestra la síntesis de ADNc usando el método SMARTer de cambio de molde.

La Figura 16 es un esquema de la síntesis de ADNc que se realizó en presencia de un cebador aleatorio además del cebador oligodT.

La Figura 17 muestra las ventajas del método de ensayo SMART-Plus. La Figura 17A muestra el rendimiento del ensayo SMART-plus compilado a partir de más de 1000 núcleos individuales de alta calidad. La Figura 17B muestra los datos de cobertura de la transcripción.

La Figura 18 muestra la sensibilidad del ensayo mejorada del SMART-Seq Plus con respecto al método SMART-seq.

Descripción detallada

Se presentan en la presente memoria métodos para el análisis de la expresión génica de células individuales multiplexadas. Algunos métodos incluyen el uso de gotículas y/o perlas que llevan códigos de barras únicos tales como códigos de barras moleculares únicos (UMI).

Actualmente, el método más usado para la sec. de ARN de células individuales se basa en la tecnología CLONTECH™ SMART-SEQ™ o derivados de la misma. En resumen, un cebador oligo(dT) prepara la reacción de síntesis de ADNc de primera cadena. Cuando la retrotranscriptasa (SMARTSCRIBE™) alcanza el extremo 5' del ARNm, la actividad transferasa terminal de la enzima añade unos pocos nucleótidos no molde adicionales al extremo 3' del ADNc. Un oligonucleótido de cambio de molde, diseñado para apareamiento de bases con este tramo de nucleótidos que no es molde, se une y crea un molde extendido para permitir que la RT continúe replicándose hasta el final del oligonucleótido (Fig. 1).

Los métodos presentados en la presente memoria pueden incluir métodos para generar ADNc marcado con etiquetas específicas de la muestra como se describe, por ejemplo, en la descripción del documento U.S. 2012/0010091. Como se usan en la presente memoria, los términos retrotranscripción etiquetada de célula individual y STRT se refieren a métodos descritos, por ejemplo, en el documento U.S. 2012/0010091. El ADNc bicatenario no se degrada con DNasa en el método STRT. En lugar de ello, el ADNc bicatenario se tagmenta con una transposasa, por ejemplo, la Nextera estándar.

El ADNc bicatenario puede convertirse después en una genoteca de secuenciación usando, por ejemplo, NEXTERA.™ o TRUSEQ™ (Illumina, Inc.) para la sec. de ARN del transcriptoma completo; o a través de degradación enzimática, tales como DNasa I o Fragmentasa, seguido de ligadura del adaptador para secuenciación del extremo 5'. Ambos métodos tienen ventajas y desventajas: el primero solo puede multiplexarse después de que se hayan introducido los códigos de barras de muestra durante la preparación de la genoteca, mientras que el segundo puede multiplexarse después de la síntesis de ADNc, ya que los códigos de barras pueden introducirse durante la etapa de síntesis de la 1ª cadena. Por lo tanto un mayor rendimiento y un menor coste por muestra favorecen lo último. Sin embargo, la información obtenida con ambos métodos tiene aplicaciones diferentes: el primero permite secuenciar todo el transcriptoma mientras que el segundo solo interroga los niveles de expresión génica.

En la presente memoria se presentan métodos rápidos de preparación de genotecas de expresión génica que pueden aplicarse a niveles de entrada de células individuales y que permiten altos niveles de multiplexación de muestras pronto en el protocolo.

En algunas realizaciones, la síntesis de la primera cadena se inicia con un cebador oligo dT (anclado) (o potencialmente con un aleatorizador o una combinación de los dos) al que se adjunta un código de barras (BC) de muestra, un sitio de unión del cebador de amplificación y, opcionalmente, una secuencia de cebador de cambio de molde (TS). En algunas realizaciones, el sitio de unión del cebador de amplificación es una secuencia adaptadora de transposasa, tal como, por ejemplo, la secuencia adaptadora Nextera V2.A14 o V2.B15. El código de barras puede estar precedido por o seguido de un código de barras molecular (identificador molecular único o "UMI") que permitiría la detección de duplicados de PCR. Cuando la retrotranscriptasa alcanza el extremo 5' del ARNm, se produce un cambio de molde como se describe anteriormente y en el documento U.S. 2012/0010091. Esto incorpora el complemento de la secuencia del cebador TS en la 1ª cadena de ADNc. Dado que se ha introducido un código de barras de muestra en la primera cadena de ADNc, en este punto pueden agruparse diferentes muestras. Posteriormente el grupo de 1ª cadena se convertirá en bicatenario y, opcionalmente, se amplificará en una reacción de PCR con el cebador TS (Fig. 2A). Debido al hecho de que ambos extremos del ADNc contienen secuencias complementarias, la formación de estructuras de horquilla dará como resultado la supresión de la amplificación de fragmentos más pequeños tales como artefactos, etc.

En algunas realizaciones, como se expone en la Figura 2A y 3A, la síntesis de la 1ª cadena se inicia con un oligo dT al que se le ha adjuntado un código de barras (BC) de muestra, una copia de una secuencia adaptadora de transposasa (la "secuencia Nextera V2.A14"), opcionalmente con un código de barras molecular (UMI) y la secuencia del cebador de cambio de molde (TS). El cambio de molde en el extremo 3' de la cadena de ADNc incorpora la

secuencia de cebador de TS' en el otro extremo de la 1ª cadena. En este punto, pueden agruparse los ADNc de diferentes muestras.

En algunas realizaciones, como se establece en las Figura 2B y 3B, los ADNc se amplifican con un oligo TS. Esta PCR de cebador individual suprimirá los amplicones pequeños tales como el dímero de cebador, etc. El grupo de ADNc puede tagmentarse con una transposasa, por ejemplo, ("NEXTERA™") que solo contiene una secuencia adaptadora, en lugar de los dos adaptadores típicos. En el ejemplo que se muestra en la Figura 2B y 3B, las transposasas están cargadas con oligos V2.B15. Después de la tagmentación, la PCR con los cebadores de amplificación p5-V2.A14 y p7-V2.B15 amplifica preferiblemente los fragmentos del extremo 3' del ADNc. Los fragmentos generados por dos eventos de tagmentación ("fragmentos simétricos") se suprimirán durante la PCR y no generarán fragmentos secuenciables. Por ejemplo, como se muestra en las Figura 2B y 3B, los productos de amplificación generados a partir de fragmentos simétricos presentarán la secuencia del cebador P7 tanto en el extremo 5' como en el 3' del producto de amplificación, y no formarán grupos secuenciables en una cubeta de lectura Illumina estándar que contenga cebadores de amplificación P5 y p7. Adicionalmente, se suprimirán durante la PCR debido a sus extremos complementarios. Por el contrario, el fragmento terminal 3' tendrá sitios de unión de cebadores P5 y P7 después de la amplificación y puede formar grupos secuenciables en una cubeta de lectura Illumina. La secuenciación de extremos pareados dará como resultado la secuencia de muestra BC y UMI durante la lectura 1 y la secuencia de ADNc durante la lectura 2.

En consecuencia, en determinadas realizaciones presentadas en la presente memoria, en lugar de realizar la secuenciación de todo el transcrito, se realiza una forma de un ensayo de expresión genética digital que se basa en el recuento de etiquetas 3'. Los métodos presentados en la presente memoria ofrecen la capacidad de codificar individualmente las células en la etapa de síntesis de primera cadena. Adicionalmente, la codificación de barras del extremo 3' del ADNc con cebadores oligo-dT o aleatorizadores económicos proporciona importantes ventajas en términos de ahorro de costes. Además, el uso de aleatorizadores para la síntesis de ADNc es ventajoso porque hace que el método sea más similar al protocolo de secuenciación de ARN total además del ensayo de recuento de etiquetas 3'.

La posterior agrupación, la limpieza, la amplificación por PCR de ADNc con un solo cebador, la tagmentación y la preparación de la genoteca de secuenciación pueden realizarse en un solo tubo para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más células. Por lo tanto, los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria son altamente susceptibles de multiplexación. A modo de ejemplo, expuesto en la Figura 5, los métodos proporcionados en la presente memoria permiten la multiplexación a nivel celular (por ejemplo, 96 muestras por placa de 96 pocillos). Además, los métodos permiten una multiplexación adicional a nivel de placa usando placas con código de barras exclusivo (por ejemplo, tagmentación para incorporar un código de barras que identifica la placa de 96 pocillos). Estos métodos pueden automatizarse y pueden proporcionar ahorros significativos de costes y tiempo.

Se apreciará que puede variarse el orden de un código de barras de muestra y de un UMI en el cebador de síntesis de primera cadena. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el código de barras (BC) de muestra se coloca en 3' del UMI. En algunas realizaciones, el código de barras (BC) de muestra se coloca en 5' del UMI. En algunas realizaciones, el código de barras (BC) de muestra es directamente contiguo al UMI. En algunas realizaciones, el código de barras (BC) de muestra está separado del UMI en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, el código de barras (BC) de muestra se solapa con el UMI en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10 nucleótidos.

La tagmentación se realiza usando una mezcla de transposasa que contiene secuencias adaptadoras que no se encuentran en el cebador de síntesis de primera cadena. Al hacerlo, se producen fragmentos de tagmentación que llevan secuencias adaptadoras diferentes en comparación con la secuencia incorporada en el cebador de síntesis de primera cadena. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla de transposasas comprende exclusivamente transposomas que tienen un tipo de secuencia adaptadora. Los fragmentos generados por este tipo de mezcla se denominan en la presente memoria "fragmentos simétricos" y no producen grupos secuenciables en una cubeta de lectura Illumina. En algunas realizaciones, la mezcla de transposasa puede comprender cierta cantidad de la secuencia incorporada en el cebador de síntesis de primera cadena, en donde la cantidad es lo suficientemente baja como para permitir que todos o sustancialmente todos los fragmentos de ADNc 3' se amplifiquen y se secuencien. Por ejemplo, las secuencias adaptadoras en la mezcla de transposomas pueden comprender menos del 0,01 %, el 0,1 %, el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 4 %, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, el 13 %, el 14 %, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, o menos del 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 % o menos del 50 % de la secuencia incorporada en el cebador de síntesis de primera cadena. Se apreciará que cuando típicamente se usan dos adaptadores de transposasa, cualquiera de los dos adaptadores puede incorporarse al cebador de síntesis de primera cadena, y el otro adaptador puede usarse durante el evento de tagmentación. Por ejemplo, en las realizaciones ilustrativas expuestas en las Figura 3A, 3B, 4A y 4B, donde una secuencia adaptadora se incorpora en el cebador de síntesis de primera cadena, ese adaptador no se usa en la mezcla de tagmentación. Las Figura 3A y 3B muestran una realización donde el adaptador V2.A14 se incorpora al cebador de síntesis de primera cadena y el adaptador V2.B15 se usa como adaptador del transposoma durante la etapa de tagmentación. Las Figura 4A y 4B muestran una realización alternativa donde el adaptador V2.B15 se incorpora al cebador de síntesis de primera cadena y el adaptador V2.A14 se usa como adaptador del transposoma durante la etapa de tagmentación. En ambos casos, los fragmentos

de tagmentación resultantes se dividen en dos categorías: fragmentos simétricos (que no pueden amplificarse y/o secuenciarse) y fragmentos asimétricos que pueden amplificarse usando un conjunto de cebadores V2.A14 y V2.B15.

En algunas realizaciones, la cantidad de células individuales que pueden multiplexarse aumenta significativamente al incorporar índices en las secuencias adaptadoras del transposoma. Como se ilustra en la Figura 5, cada célula individual puede identificarse usando un código de barras específico de la célula y cada conjunto de células (por ejemplo, una placa de 96 células) puede ponerse en contacto con una mezcla de tagmentación que tiene un código de barras específico de la placa incorporado en la secuencia adaptadora del transposoma. En el ejemplo que se muestra en la Figura 5, los ADNc de cada una de las 96 células en una placa se agrupan antes de la tagmentación y después las muestras tagmentadas se agrupan para la secuenciación multiplexada. Se apreciará que puede agruparse cualquier cantidad de células antes de la tagmentación, y que el uso de una placa de 96 pocillos es simplemente una de una diversidad de realizaciones. Por ejemplo, un conjunto de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100 o más de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o más de 1000, y cualquier número intermedio de células pueden agruparse para la tagmentación. La síntesis de la primera cadena puede tener lugar en cualquier recipiente pocillo individual o múltiples pocillos, tal como una placa de múltiples pocillos, un chip, un dispositivo microfluídico, una emulsión, una mezcla de perlas o cualquier otro formato adecuado para la manipulación múltiple de una pluralidad de células.

Como se muestra en la Figura 7 (células individuales), cuando se analizó la expresión génica usando tagmentación simétrica (versión Nextera V2.B15) en comparación con tagmentación asimétrica (versión Nextera V2.B15/V2.A14), se detectó una cantidad significativa de genes y se obtuvieron otras métricas. La Figura 8 muestra que la cobertura de la transcripción está casi totalmente sesgada hacia el extremo 3' de los transcritos cuando se realiza la tagmentación usando solo un adaptador de transposasa (V2.B15) contra la tagmentación usando dos adaptadores de transposasa (V2.A14 y V2.B15).

En algunas realizaciones, la codificación de barras de muestras y UMI puede realizarse separando células individuales en gotículas. En algunas realizaciones, las gotículas se separan entre sí en una emulsión. En algunas realizaciones, las gotículas se forman y/o se manipulan usando un accionador de gotículas. En realizaciones particulares, una o más gotículas comprenden un conjunto diferente de cebadores de síntesis de primera cadena que contienen un código de barras. En algunas realizaciones, cada gotícula comprende una multitud de cebadores de síntesis de primera cadena, cada uno de estos cebadores tiene una secuencia idéntica que incluye códigos de barras idénticos y los códigos de barras de una gotícula difieren de los de otra gotícula, mientras que la porción restante del cebador de síntesis de primera cadena permanece igual entre las gotículas. Por lo tanto, en estas realizaciones, los códigos de barras actúan como identificadores de las gotículas, así como de la célula individual comprendida por la gotícula. En realizaciones particulares, una o más gotículas comprenden un conjunto diferente de cebadores de síntesis de primera cadena que contienen UMI. Por lo tanto, cada célula individual que se liza en cada gotícula será identificable mediante los códigos de barras de cada gotícula. Como se ilustra en la Figura 11, la codificación de barras basada en gotículas puede realizarse fusionando gotículas que contienen células individuales con otras gotículas que comprenden conjuntos únicos de códigos de barras. Este formato permite una multiplexación adicional a la disponible en un formato de múltiples pocillos. La síntesis de la primera cadena y el cambio de molde se realizan dentro de cada gotícula individual. En algunas realizaciones, pueden fusionarse dos o más gotículas antes de la PCR. Adicional o alternativamente, en algunas realizaciones, las gotículas pueden fusionarse antes de la tagmentación. Adicional o alternativamente, en algunas realizaciones, las gotículas pueden fusionarse después de la PCR y antes de la tagmentación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, después de que se realice la síntesis de la primera cadena en gotículas individuales, los ADNc marcados pueden fusionarse, agrupando por lo tanto los ADNc.

Similarmente, en algunas realizaciones, la codificación de muestras y UMI puede realizarse segregando células individuales con perlas que llevan un cebador marcado con UMI y/o código de barras para la síntesis de la primera cadena. En algunas realizaciones, las perlas se separan en gotículas en una emulsión. En algunas realizaciones, las perlas se separan y se manipulan usando un accionador de gotículas. Como se ilustra en la Figura 12, la codificación de barras basada en perlas puede realizarse creando un conjunto de perlas, llevando cada cuenta un conjunto o conjuntos únicos de códigos de barras.

Secuenciación del transcriptoma completo

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para realizar la secuenciación del transcriptoma completo. En tales realizaciones, la síntesis de la primera cadena se expande usando aleatorizadores. Como se ilustra en la Figura 9A, el cebado aleatorio expande la ventana de fragmentos secuenciables a cualquier lugar a lo largo de la longitud del transcrito donde un aleatorizador puede hibridar y cebar la síntesis de la primera cadena. Los aleatorizadores pueden incluir las mismas combinaciones de códigos de barras de muestra e identificadores moleculares únicos además de otros sitios de unión de adaptadores y cebadores, tales como una secuencia adaptadora de transposoma y/o un cebador de cambio de molde (TS). El cambio de molde y la síntesis de la segunda cadena pueden realizarse como se describió anteriormente para la síntesis de ADNc cebada con oligo-dT. Los ADNc bicatenarios resultantes pueden después someterse a una reacción de tagmentación como se describió anteriormente. La diferencia entre el uso de aleatorizadores y cebadores oligo-dT es que puede obtenerse una

secuencia de transcripción completa o sustancialmente completa, en lugar de la porción 3' del transcrito. Como se muestra en la Figura 6 (100 pg de ARN), cuando se analizó la expresión genética usando oligo-dT en comparación con una mezcla de oligo-dT y aleatorizadores para la síntesis de la primera cadena, se detectó una cantidad significativa de genes y se obtuvieron otras métricas.

Un tipo de subproducto que puede producirse cuando se usan aleatorizadores para iniciar la síntesis de la primera cadena son los subproductos de concatenación. Específicamente, en algunas situaciones, como se ilustra en la Figura 9B, los cebadores aleatorios pueden hibridarse con otros cebadores aleatorios, superando por lo tanto el emparejamiento con los transcritos de ARN. Los productos de ADNc resultantes pueden estar sujetos a un cebado aleatorio adicional y puede producirse una cascada de eventos de cambio de molde. Esta cascada puede conducir a la formación de un subproducto de concatámeros que puede ser dependiente de la presencia del oligonucleótido de cambio de molde.

Con el fin de reducir y/o minimizar la formación de dichos subproductos, se presenta en la presente memoria una diversidad de diseños de cebadores que reducen la probabilidad de formación de subproductos. En la Figura 10 se exponen diseños ilustrativos, aunque se apreciará que el alcance de las composiciones de cebado expuestas en la presente memoria se extiende más allá de los ejemplos expuestos en la figura. En una realización, los cebadores pueden configurarse para formar una horquilla para evitar o minimizar el cebado aleatorio en cualquier porción de las regiones de unión del código de barras, del adaptador o del cebador de amplificación. Por lo tanto, una porción bicatenaria formada en el propio cebador puede superar en competencia a la hibridación aleatoria. En algunas realizaciones, la porción bicatenaria de la horquilla comprende la secuencia del extremo de mosaico (ME) del adaptador de transposasa. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, la porción bicatenaria puede comprender parte o la totalidad de la secuencia adaptadora de transposasa, más allá de la secuencia del extremo de mosaico. En algunas realizaciones, la secuencia adaptadora puede reemplazarse completamente con una secuencia de ARN corta, reduciendo por lo tanto la longitud del cebador y minimizando la posibilidad de que un aleatorizador se hibride con el cebador. En algunas realizaciones, se proporciona un complemento de la secuencia de ARN corta en o cerca del extremo 5' del cebador, lo que permite la formación de una horquilla. En algunas realizaciones, se forma una región bicatenaria mediante el emparejamiento de un oligonucleótido complementario a la porción adaptadora y/o cebadora, evitando o minimizando de este modo el cebado aleatorio a cualquier porción de las regiones de unión del código de barras, adaptador o cebador de amplificación y reduciendo o evitando de este modo los subproductos de concatenación.

Aleatorizador o cebador aleatorio

Como se usan en la presente memoria, el término “aleatorizador” y la expresión “cebador aleatorio” se usan indistintamente. El término aleatorio se refiere a los cebadores aleatorios que pueden exhibir una degeneración cuádruple en cada posición.

En algunas realizaciones, los aleatorizadores comprenden cebadores de ácidos nucleicos que son de una diversidad de longitudes de secuencia aleatoria, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los aleatorizadores pueden comprender una secuencia aleatoria que tiene una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos. En determinadas realizaciones, la pluralidad de cebadores aleatorios puede comprender aleatorizadores de diversas longitudes. En determinadas realizaciones, la pluralidad de aleatorizadores puede comprender aleatorizadores que tienen la misma longitud. En determinadas realizaciones, la pluralidad de aleatorizadores puede comprender una secuencia aleatoria que tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 18 nucleótidos. En algunas realizaciones, la pluralidad de aleatorizadores comprende hexámeros aleatorios. Los cebadores aleatorios, y particularmente los hexámeros aleatorios, son comercializados y se usan ampliamente en reacciones de amplificación como la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), como lo ejemplifican los kits de amplificación del genoma completo REPLI-g (QIAGEN, Valencia, CA). Se apreciará que puede usarse cualquier longitud adecuada de aleatorizadores en los métodos y las composiciones presentados en la presente memoria.

A continuación se muestran secuencias de aleatorizadores ilustrativas que comprenden una porción de secuencia aleatoria 3' y una porción de secuencia definida 5':

```

GTGTAGATCT CGGTGGTCGC CGTATCATN NNNN
GTGTAGATCT CGGTGGTCGC CGTATCATN NNNNN
GTGTAGATCT CGGTGGTCGC CGTATCATN NNNNNN
GTGTAGATCT CGGTGGTCGC CGTATCATN NNNNNNN
GTGTAGATCT CGGTGGTCGC CGTATCATN NNNNNNNN
ATCTCGTATG CCGTCTTCTG CTTGNNNNN
    
```

ATCTCGTATG CCGTCTTCTG CTTGNNNNNNN

ATCTCGTATG CCGTCTTCTG CTTGNNNNNNN

ATCTCGTATG CCGTCTTCTG CTTGNNNNNNN

ATCTCGTATG CCGTCTTCTG CTTGNNNNNNNNN

5 Como se usa en la presente memoria, el término “SMART-Seq Plus” significa un método para preparar ADNc a partir de ARN usando un cebador de síntesis de primera cadena que comprende un primer sitio de unión del cebador de amplificación, un aleatorizador que comprende un primer sitio de unión del cebador de amplificación y un oligonucleótido de cambio de oligonucleótido que es parcialmente complementario a la primera cadena del ADNc y comprende un segundo sitio de unión del cebador de amplificación. El cebador de síntesis de primera cadena comprende una porción oligo(dT).

10 Códigos de barras y UMI

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión “código de barras” o “BC” se refiere a una etiqueta de ácido nucleico que puede usarse para identificar una muestra o una fuente del material de ácido nucleico. Por lo tanto, cuando las muestras de ácidos nucleicos proceden de múltiples fuentes, los ácidos nucleicos de cada muestra de ácidos nucleicos pueden etiquetarse con diferentes etiquetas de ácidos nucleicos de tal manera que pueda identificarse la fuente de la muestra. Los códigos de barras, también denominados comúnmente índices, etiquetas y similares, son bien conocidos por los expertos en la materia. Puede usarse cualquier código de barras o conjunto de códigos de barras adecuado, como se conoce en la técnica y como se ilustra en las descripciones de la Pat de EE.UU. N.º 8.053.192 y la Pub. PCT. WO05/068656. La codificación de barras de células individuales puede realizarse como se describe, por ejemplo, en la descripción del documento U.S. 2013/0274117.

20 Los ácidos nucleicos de más de una fuente pueden incorporar una secuencia de etiqueta variable. Esta secuencia de etiqueta puede tener hasta 100 nucleótidos de longitud (pares de bases si se refiere a moléculas bicatenarias), preferiblemente de 1 a 10 nucleótidos de longitud, más preferiblemente 4, 5 o 6 nucleótidos de longitud y comprende combinaciones de nucleótidos. Por ejemplo, en una realización, si se eligen seis pares de bases para formar la etiqueta y se usa una permutación de cuatro nucleótidos diferentes, entonces puede crearse un total de 4096 anclajes de ácido nucleico (por ejemplo, horquillas), cada uno con una etiqueta única de 6 bases.

25 Como se usan en la presente memoria, los términos y expresiones UMI, identificador único e identificador molecular único se refieren a una secuencia de ácido nucleico única que está unida a cada una de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Cuando se incorpora a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, durante la síntesis de ADNc de primera cadena, puede usarse un UMI para corregir el sesgo de amplificación posterior contando directamente los identificadores moleculares únicos (UMI) que se secuencian después de la amplificación. El diseño, la incorporación y la aplicación de los UMI puede realizarse como se conoce en la técnica, como se ilustra, por ejemplo, en las descripciones del documento WO 2012/142213, Islam y col. Nat. Methods (2014) 11:163-166 y Kivioja, T. y col. Nat. Methods (2012) 9: 72-74.

Tagmentación

40 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 formado 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 una etapa de purificación para retirar la enzima transposasa, pueden añadirse secuencias adicionales a los extremos de los fragmentos adaptadores, por ejemplo, mediante PCR, ligadura o cualquier otra metodología adecuada conocida por los expertos en la materia.

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

50 En los métodos de preparación de muestras estándar, cada molde contiene un adaptador en cualquiera de los extremos del inserto y normalmente son necesarias varias etapas tanto para modificar el ADN o el ARN como para purificar los productos deseados de las reacciones de modificación. Estas etapas se realizan en solución antes de la adición de los fragmentos adaptados a una celda de flujo, donde se acoplan a la superficie mediante una reacción de

extensión de cebador que copia el fragmento hibridado al extremo de un cebador unido covalentemente a la superficie. Estos moldes 'semilla' dan lugar a continuación a grupos monoclonales de molde copiados a través de varios ciclos de amplificación.

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

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

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

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

25 Brevemente, una "reacción de trasposición" es una reacción en donde uno o más transposones se insertan en ácidos nucleicos diana en sitios aleatorios o sitios casi aleatorios. Los componentes esenciales en una reacción de trasposición son una transposasa y oligonucleótidos de ADN que presentan las secuencias de nucleótidos de un transposón, incluyendo la secuencia de transposón transferida y su complemento (es decir, la secuencia terminal del transposón no transferido), así como otros componentes necesarios para formar una trasposición o un complejo de transposoma funcional. Los oligonucleótidos de ADN pueden comprender secuencias adicionales (por ejemplo, secuencias adaptadoras o de cebador), según se necesite o desee. Brevemente, la trasposición *in vitro* puede iniciarse poniendo en contacto un complejo de transposoma y un ADN diana. Los procedimientos y los sistemas de trasposición 30 ilustrativos que pueden adaptarse fácilmente para su uso con las transposasas de la presente descripción se describen, por ejemplo, en los documentos WO 10/048605; US 2012/0301925; US 2013/0143774.

35 Los adaptadores que se añaden al extremo 5' y/o 3' de un ácido nucleico pueden comprender una secuencia universal. Una secuencia universal es una región de secuencia de nucleótidos que es común a, es decir, está compartida por, dos o más moléculas de ácido nucleico. Opcionalmente, las dos o más moléculas de ácido nucleico también tienen regiones de diferencias de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, los adaptadores 5' pueden comprender secuencias de ácido nucleico idénticas o universales y los adaptadores 3' pueden comprender secuencias idénticas o universales. Una secuencia universal que puede estar presente en diferentes miembros de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico puede permitir la replicación o la amplificación de múltiples secuencias diferentes utilizando un solo cebador 40 universal que es complementario a la secuencia universal. Algunas secuencias de cebadores universales usadas en los ejemplos presentados en la presente memoria incluyen las secuencias Nextera™ V2.A14 y V2.B15. Sin embargo, se apreciará fácilmente que puede utilizarse cualquier secuencia adaptadora adecuada en los métodos y las composiciones presentados en la presente memoria. Por ejemplo, la secuencia final de mosaico Tn5 A14 (Tn5MEA) y/o la secuencia final de mosaico Tn5 B15 (Tn5MEB), incluyendo la secuencia complementaria no transferida (NTS) 45 como se establece a continuación, pueden usarse en los métodos proporcionados en la presente memoria.

Tn5MEA: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO: 1)'

Tn5MEB: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO: 2)

Tn5 NTS: 5'- CTGTCTCTTATACACATCT-3' (SEQ ID NO: 3)

Códigos de barras y UMI en gotículas

En algunas realizaciones, los cebadores que llevan códigos de barras de muestra pueden estar en solución. Adicional o alternativamente, los cebadores que llevan secuencias UMI pueden estar en solución. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una o más gotículas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, puede presentarse una pluralidad de gotículas, en donde cada gotícula en la pluralidad lleva un código de barras de muestra único y/o secuencias UMI, cada una de las cuales es única para una molécula. Por lo tanto, una persona con experiencia en la técnica comprenderá que, en algunas realizaciones, los códigos de barras son únicos de una gotícula y los UMI son exclusivos de una molécula de tal manera que los UMI se repiten muchas veces dentro de una colección de gotículas. En algunas realizaciones, las células individuales se ponen en contacto con una gotícula que tiene un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar la célula individual. En algunas realizaciones, los lisados de células individuales se ponen en contacto con una gotícula que tiene un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar los lisados de células individuales. En algunas realizaciones, el ácido nucleico purificado de las células individuales se pone en contacto con una gotícula que tiene un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar el ácido nucleico purificado de la célula individual.

Puede usarse cualquier sistema adecuado para formar y manipular gotículas en las realizaciones presentadas en la presente memoria donde cada gotícula de una pluralidad de gotículas lleva un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI. Por ejemplo, puede usarse un accionador de gotículas.

“Accionador de gotitas” significa un dispositivo para manipular gotitas. Para ver ejemplos de accionadores de gotículas, véase Pamula y col., Patente de EE.UU. N.º 6.911.132, titulada “Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques”, concedida el 28 de junio de 2005; Pamula y col., Publ. de Patente de EE.UU. N.º 20060194331, titulada “Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board”, publicada el 31 de agosto de 2006; Pollack y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2007/120241, titulada “Droplet-Based Biochemistry”, publicada el 25 de octubre de 2007; Shenderov, Patente de EE.UU. N.º 6.773.566, titulada “Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same”, concedida el 10 de agosto de 2004; Shenderov, Patente de EE.UU. N.º 6.565.727, titulada “Actuators for Microfluidics Without Moving Parts”, concedida el 20 de mayo de 2003; Kim y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20030205632, titulada “Electrowetting-driven Micropumping”, publicada el 6 de noviembre de 2003; Kim y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20060164490, titulada “Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle”, publicada el 27 de julio de 2006; Kim y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20070023292, titulada “Small Object Moving on Printed Circuit Board”, publicada el 1 de febrero de 2007; Shah y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20090283407, titulada “Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics”, publicada el 19 de noviembre de 2009; Kim y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20100096266, titulada “Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip”, publicada el 22 de abril de 2010; Velez, U.S. Patent N.º 7,547,380, titulada “Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface”, concedida el 16 de junio de 2009; Sterling y col., U.S. Patent N.º 7,163,612, titulada “Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like”, concedida el 16 de enero de 2007; Becker y col., U.S. Patent N.º 7,641,779, titulada “Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing”, concedida el 5 de enero de 2010; Becker y col., U.S. Patent N.º 6,977,033, titulada “Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing”, concedida el 20 de diciembre de 2005; Decre y col., U.S. Patent N.º 7,328,979, titulada “System for Manipulation of a Body of Fluid”, concedida el 12 de febrero de 2008; Yamakawa y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20060039823, titulada “Chemical Analysis Apparatus”, publicada el 23 de febrero de 2006; Wu, Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20110048951, titulada “Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes”, publicada el 3 de marzo de 2011; Fouillet y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20090192044, titulada “Electrode Addressing Method”, publicada el 30 de julio de 2009; Fouillet y col., U.S. Patent N.º 7,052,244, titulada “Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces”, concedida el 30 de mayo de 2006; Marchand y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20080124252, titulada “Droplet Microreactor”, publicada el 29 de mayo de 2008; Adachi y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20090321262, titulada “Liquid Transfer Device”, publicada el 31 de diciembre de 2009; Roux y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20050179746, titulada “Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates”, publicada el 18 de agosto de 2005; y Dhindsa y col., “Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality”, Lab Chip, 10:832-836 (2010). Ciertos accionadores de gotitas incluirán uno o más sustratos dispuestos con un espacio de operaciones de gotitas entre ellos y electrodos asociados con (p. ej., en capas, adheridos y/o incrustados en) los uno o más sustratos y dispuestos para realizar una o más operaciones de gotitas. Por ejemplo, ciertos accionadores de gotitas incluirán un sustrato base (o fondo), electrodos de operaciones de gotitas asociados con el sustrato, una o más capas dieléctricas encima del sustrato y/o electrodos, y opcionalmente una o más capas hidrófobas encima del sustrato, capas dieléctricas y/o los electrodos forman una superficie de operaciones de gotitas. También se puede proporcionar un sustrato superior, que está separado de la superficie de operaciones de gotitas por un espacio, comúnmente denominado espacio de operaciones de gotitas. Diversas disposiciones de electrodos en los sustratos superior y/o inferior se discuten en las patentes y solicitudes mencionadas anteriormente y ciertas disposiciones de electrodos novedosas se discuten en la descripción de la presente descripción. Durante las operaciones de gotitas, se prefiere que las gotitas permanezcan en contacto continuo o en contacto frecuente con un electrodo de tierra o de referencia. Se puede asociar un electrodo de tierra o de referencia con el sustrato superior que mira hacia el espacio,

el sustrato inferior que mira hacia el espacio, en el espacio. Cuando se proporcionan electrodos en ambos sustratos, los contactos eléctricos para acoplar los electrodos a un instrumento accionador de gotitas para controlar o monitorizar los electrodos, pueden asociarse con una o ambas placas. En algunos casos, los electrodos de un sustrato se acoplan eléctricamente al otro sustrato de modo que solo un sustrato está en contacto con el accionador de gotitas. En una realización, un material conductor (por ejemplo, un epoxi, como MASTER BOND™ Polymer System EP79, disponible en Master Bond, Inc., Hackensack, NJ) proporciona la conexión eléctrica entre los electrodos en un sustrato y las trayectorias eléctricas en los otros sustratos, por ejemplo, un electrodo de tierra en un sustrato superior se puede acoplar a una trayectoria eléctrica en un sustrato inferior mediante tal material conductor. Cuando se utilizan múltiples sustratos, se puede proporcionar un espaciador entre los sustratos para determinar la altura del espacio entre ellos y definir depósitos de dispensación en el accionador. La altura del espaciador puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 µm, 100 µm, 200 µm, 250 µm, 275 µm o más. Como alternativa o adicionalmente, la altura del espaciador puede ser como máximo de aproximadamente 600 µm, 400 µm, 350 µm, 300 µm o menos. El espaciador puede estar formado, por ejemplo, por una capa de proyecciones de los sustratos superior o inferior, y/o un material insertado entre los sustratos superior e inferior. Se pueden proporcionar una o más aberturas en los uno o más sustratos para formar un paso de fluido a través de la cual se puede administrar líquido al espacio de operaciones de gotitas. En algunos casos, las una o más aberturas pueden estar alineadas para la interacción con uno o más electrodos, p. ej., alineadas de tal modo que el líquido que fluye a través de la abertura se acerque lo suficiente a uno o más electrodos de operación de gotitas para permitir que una operación de gotitas sea efectuada por los electrodos de operaciones de gotitas que utilizan el líquido. En algunos casos, los sustratos base (o inferior) y superior pueden formarse como un componente integral en algunos casos. Se pueden proporcionar uno o más electrodos de referencia en la base (o el fondo) y/o los sustratos superiores y/o en el espacio. Se proporcionan ejemplos de disposiciones de electrodos de referencia en las patentes y solicitudes de patente mencionadas anteriormente. En diversas realizaciones, la manipulación de gotitas por un accionador de gotitas puede estar mediada por electrodos, p. ej., mediada por electrohumectación o mediada por dielectroforesis o mediada por fuerza coulombica. Los ejemplos de otras técnicas para controlar operaciones de gotículas que pueden usarse en los accionadores de gotículas de la presente descripción incluyen el uso de dispositivos que inducen presión fluidica hidrodinámica, tales como aquellos que funcionan sobre la base de principios mecánicos (por ejemplo, bombas de jeringa externas, bombas de membrana neumáticas, bombas de membrana vibratorias, dispositivos de vacío, fuerzas centrífugas, bombas piezoeléctricas/ultrasónicas y fuerzas acústicas); principios eléctricos o magnéticos (por ejemplo, flujo electroosmótico, bombas electrocinéticas, tapones ferrofluidicos, bombas electrohidrodinámicas, atracción o repulsión mediante fuerzas magnéticas y bombas magnetohidrodinámicas); principios termodinámicos (por ejemplo, generación de burbujas de gas/expansión de volumen inducida por cambio de fase); otras clases de principios de humectación de superficies (por ejemplo, electrohumectación y optoelectrohumectación, así como gradientes de tensión superficial inducidos química, térmica, estructural y radiactivamente); gravedad; tensión superficial (por ejemplo, acción capilar); fuerzas electrostáticas (por ejemplo, flujo electroosmótico); flujo centrífugo (sustrato dispuesto sobre un disco compacto y girado); fuerzas magnéticas (por ejemplo, los iones oscilantes provocan flujo); fuerzas magnetohidrodinámicas; y vacío o diferencial de presión. En determinadas realizaciones, se pueden emplear combinaciones de dos o más de las técnicas anteriores para realizar una operación de gotitas en un accionador de gotitas de la presente descripción. De manera similar, uno o más de los anteriores pueden usarse para administrar líquido en un espacio de operaciones de gotitas, p. ej., desde un depósito en otro dispositivo o desde un depósito externo del accionador de gotitas (p. ej., un depósito asociado con un sustrato del accionador de gotitas y un paso de flujo desde el depósito hasta el espacio de operaciones de gotitas). Las superficies de operaciones de gotitas de ciertos accionadores de gotitas de la presente descripción pueden estar hechas de materiales hidrófobos o pueden estar revestidas o tratadas para hacerlas hidrófobas. Por ejemplo, en algunos casos, una parte o la totalidad de las superficies de operaciones de gotículas pueden derivatizarse con materiales o compuestos químicos de baja energía superficial, por ejemplo, mediante deposición o usando síntesis in situ usando compuestos tales como compuestos polifluorados o perfluorados en solución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen TEFLON® AF (comercializados por DuPont, Wilmington, DE), miembros de la familia de materiales cytop, revestimientos de la familia FLUROPEL® de revestimientos hidrófobos y superhidrófobos (disponibles en Cytonix Corporation, Beltsville, MD), revestimientos de silano, revestimientos de fluorosilano, derivados de fosfonato hidrófobos (por ejemplo, los vendidos por Aculon, Inc) y recubrimientos electrónicos NOVEC™ (comercializados por 3M Company, St. Paul, MN), otros monómeros fluorados para la deposición química en fase de vapor mejorada con plasma (PECVD, *plasma-enhanced chemical vapor deposition*) y organosiloxano (por ejemplo, SiOC) para PECVD. En algunos casos, la superficie de operaciones de gotitas puede incluir un revestimiento hidrófobo que tiene un espesor que varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm. Además, en algunas realizaciones, el sustrato superior del accionador de gotitas incluye un polímero orgánico eléctricamente conductor, que después se recubre con un recubrimiento hidrófobo o se trata de otro modo para hacer que la superficie de operaciones de gotitas sea hidrófoba. Por ejemplo, el polímero orgánico eléctricamente conductor que se deposita sobre un sustrato plástico puede ser poli(3,4-etilendioxitiofeno) poli(estirenosulfonato) (PEDOT: PSS). Otros ejemplos de polímeros orgánicos conductores de electricidad y capas conductoras alternativas se describen en Pollack y col., Publ. de Patente Internacional N.º WO/2011/002957, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods", publicada el 6 de enero de 2011. Se pueden fabricar uno o ambos sustratos usando una placa de circuito impreso (PCB, *printed circuit board*), vidrio, vidrio revestido con óxido de indio y estaño (ITO, *indium tin oxide*) y/o materiales semiconductores como el sustrato. Cuando el sustrato es vidrio revestido con ITO, el revestimiento ITO tiene preferentemente un espesor de al menos aproximadamente 20 nm, 50 nm, 75 nm, 100 nm o más. Como alternativa o adicionalmente, el espesor puede ser como máximo de aproximadamente 200 nm, 150 nm, 125 nm o menos. En algunos casos, el sustrato superior y/o inferior incluye un sustrato de PCB que está

revestido con un dieléctrico, tal como un dieléctrico de poliimida, que en algunos casos también puede revestirse o tratarse de otro modo para hacer que la superficie de las operaciones de gotitas sea hidrófoba. Cuando el sustrato incluye un PCB, los siguientes materiales son ejemplos de materiales adecuados: MITSUI™ BN-300 (comercializado por MITSUI Chemicals America, Inc., San Jose CA); ARLON™ 11N (Arlon, Inc, Santa Ana, CA); NELCO® N4000-6 y N5000-30/32 (comercializado por Park Electrochemical Corp., Melville, NY); ISOLA™ FR406 (comercializado por Isola Group, Chandler, AZ), especialmente IS620; familia de fluoropolímeros (adecuado para la detección de fluorescencia ya que tiene baja fluorescencia de fondo); familia de poliimidias; poliéster; naftalato de polietileno; policarbonato; polieteretercetona; polímero de cristal líquido; copolímero de cicloolefina (COC); polímero de cicloolefina (COP); aramida; reforzamiento de aramida no tejida THERMOUNT® (comercializado por DuPont, Wilmington, DE); fibra de marca NOMEX® (comercializado por DuPont, Wilmington, DE); y papel. También son adecuados diversos materiales para su uso como componente dieléctrico del sustrato. Los ejemplos incluyen: dieléctrico depositado en vapor, tal como PARYLENE™ C (especialmente sobre vidrio), PARYLENE™ N y PARYLENE™ HT (para alta temperatura, ~300 °C) (comercializado por Parylene Coating Services, Inc., Katy, TX); recubrimientos TEFLON® AF; cytop; máscaras de soldadura, tales como máscaras de soldadura de fotoimagen líquida (por ejemplo, en PCB) como TAIYO™ Serie PSR4000, TAIYO™ Series PSR y AUS (comercializado por Taiyo America, Inc. Carson City, NV) (buenas características térmicas para aplicaciones que implican control térmico) y PROBIMER™ 8165 (buenas características térmicas para aplicaciones que implican control térmico (comercializado por Huntsman Advanced Materials Americas Inc., Los Angeles, CA)); máscara de soldadura de película seca, tales como aquellas en la línea de máscara de soldadura de película seca VACREL® (comercializado por DuPont, Wilmington, DE); dieléctricos de película, tales como película de poliimida (por ejemplo, película de poliimida KAPTON®, comercializado por DuPont, Wilmington, DE), polietileno y fluoropolímeros (por ejemplo, FEP), politetrafluoroetileno; poliéster; naftalato de polietileno; copolímero de cicloolefina (COC); polímero de cicloolefina (COP); cualquier otro material de sustrato de PCB enumerado anteriormente; resina de matriz negra; polipropileno; y materiales de circuitos flexibles negros, tales como DuPont™ Pyralux® HXC y DuPont™ Kapton® MBC (comercializado por DuPont, Wilmington, DE). El voltaje y la frecuencia de transporte de las gotitas se pueden seleccionar para el rendimiento con los reactivos utilizados en protocolos de ensayo específicos. Los parámetros de diseño pueden variar, p. ej., el número y la ubicación de depósitos en el accionador, el número de conexiones de electrodo independientes, el tamaño (volumen) de diferentes depósitos, la ubicación de imanes/zonas de lavado de perlas, el tamaño de electrodo, el paso entre electrodos y la altura del espacio (entre los sustratos superior e inferior) se pueden variar para su uso con reactivos específicos, protocolos, volúmenes de gotitas, etc. En algunos casos, un sustrato de la presente descripción puede derivatizarse con materiales o compuestos químicos de baja energía superficial, p. ej., usando deposición o síntesis in situ utilizando compuestos poli o perfluorados en solución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen revestimientos TEFLON® AF y revestimientos FLUOROPEL® para revestimiento por inmersión o pulverización, otros monómeros fluorados para la deposición química en fase de vapor mejorada con plasma (PECVD) y organosiloxano (por ejemplo, SiOC) para PECVD. De forma adicional, en algunos casos, una parte o la superficie entera de operaciones de las gotículas puede recubrirse con una sustancia para reducir el ruido de fondo, tal como la fluorescencia de fondo de un sustrato de PCB. Por ejemplo, el revestimiento reductor de ruido puede incluir una resina de matriz negra, como las resinas de matriz negra disponibles en Toray industries, Inc., Japón. Los electrodos de un accionador de gotitas son controlados típicamente por un controlador o un procesador, que a su vez se proporciona como parte de un sistema, que puede incluir funciones de procesamiento, así como almacenamiento de datos y programas informáticos y capacidades de entrada y salida. Los reactivos se pueden proporcionar en el accionador de gotitas en el espacio de operaciones de gotitas o en un depósito acoplado de manera fluida al espacio de operaciones de gotitas. Los reactivos pueden estar en forma líquida, p. ej., gotitas, o pueden proporcionarse en una forma reconstituible en el espacio de operaciones de gotitas o en un depósito acoplado de manera fluida al espacio de operaciones de gotitas. Los reactivos reconstituibles típicamente se pueden combinar con líquidos para su reconstitución. Un ejemplo de reactivos reconstituibles adecuados para su uso con los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria incluye aquellos descritos en Meathrel y col., en la Patente de EE.UU. N.º 7.727.466 titulada “Disintegratable Films for Diagnostic Devices”, concedida el 1 de junio de 2010.

50 “Activar”, con referencia a uno o más electrodos, significa afectar a un cambio en el estado eléctrico de uno o más electrodos que, en presencia de una gotícula, da como resultado una operación de gotícula. La activación de un electrodo puede lograrse usando corriente alterna (AC) o corriente continua (DC). Puede usarse cualquier voltaje adecuado. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando un voltaje que sea mayor que aproximadamente 150 V, o mayor que aproximadamente 200 V, o mayor que aproximadamente 250 V, o de aproximadamente 275 V a

55 aproximadamente 1000 V, o aproximadamente 300 V. Cuando se usa una señal de AC, puede emplearse cualquier frecuencia adecuada. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando una señal de AC que tenga una frecuencia de aproximadamente 1 Hz a aproximadamente 10 MHz, o de aproximadamente 10 Hz a aproximadamente 60 Hz, o de aproximadamente 20 Hz a aproximadamente 40 Hz, o de aproximadamente 30 Hz.

60 “Perla”, con respecto a las perlas en un accionador de gotículas, significa cualquier perla o partícula que sea capaz de interactuar con una gotícula en o cerca de un accionador de gotículas. Las perlas pueden tener cualquiera de una amplia diversidad de formas, tales como esféricas, generalmente esféricas, ovaladas, discoidales, cúbicas, amorfas y otras formas tridimensionales. La perla puede, por ejemplo, ser capaz de ser sometida a una operación de gotícula en una gotícula en un accionador de gotícula o de otro modo configurada con respecto a un accionador de gotícula de una manera que permita que una gotícula en el accionador de gotícula entre en contacto con la perla en el accionador de gotícula y/o fuera del accionador de gotícula. Las perlas pueden proporcionarse en una gotícula, en un hueco de

operaciones de gotículas o en una superficie de operaciones de gotículas. Las perlas pueden proporcionarse en un depósito que está externo a un espacio de operaciones de gotículas o situado separado de una superficie de operaciones de gotículas, y el depósito puede estar asociado con una trayectoria de flujo que permite que una gotícula que incluye las perlas se lleve a un espacio de operaciones de gotículas o entre en contacto con una superficie de operaciones de gotículas. Las perlas pueden fabricarse utilizando una amplia variedad de materiales, incluidos, por ejemplo, resinas y polímeros. Las perlas pueden tener cualquier tamaño adecuado, incluyendo, por ejemplo, micropérlas, micropartículas, nanopérlas y nanopartículas. En algunos casos, las cuentas reaccionan magnéticamente; en otros casos las cuentas reaccionan magnéticamente de forma significativa. Para perlas magnéticamente reactivas, el material magnéticamente reactivo puede constituir sustancialmente la totalidad de una perla, una parte de una perla o solo un componente de una perla. El resto de la perla puede incluir, entre otras cosas, material polimérico, recubrimientos y restos que permitan la unión de un reactivo de ensayo. Los ejemplos de perlas adecuadas incluyen micropérlas de citometría de flujo, micropartículas y nanopartículas de poliestireno, micropartículas y nanopartículas de poliestireno funcionalizadas, micropartículas y nanopartículas de poliestireno recubiertas, micropérlas de sílice, microesferas y nanoesferas fluorescentes recubiertas, micropartículas y nanopartículas teñidas de color, micropartículas y nanopartículas magnéticas, micropartículas y nanopartículas superparamagnéticas (por ejemplo, partículas DYNABEADS[®], comercializadas por Invitrogen Group, Carlsbad, CA), micropartículas y nanopartículas fluorescentes, micropartículas y nanopartículas magnéticas recubiertas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas, micropartículas y nanopartículas ferromagnéticas recubiertas y aquellas descritas en Watkins y col., Publ. de Patente de EE.U. N.º 20050260686, titulada "Multiplex Flow Assays Preferably with Magnetic Particles as Solid Phase", publicada el 24 de noviembre de 2005; Chandler., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20030132538, titulada "Encapsulation of Discrete Quanta of Fluorescent Particles", publicada el 17 de julio de 2003; Chandler y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20050118574, titulada "Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method", publicada el 2 de junio de 2005; Chandler y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20050277197, titulada "Microparticles with Multiple Fluorescent Signals and Methods of Using Same", publicada el 15 de diciembre de 2005; y Chandler y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20060159962, titulada "Magnetic Microspheres for use in Fluorescence-based Applications", publicada el 20 de julio de 2006. Las perlas pueden estar preacopladas con una biomolécula u otra sustancia que sea capaz de unirse y formar un complejo con una biomolécula. Las perlas pueden estar preacopladas con un anticuerpo, proteína o antígeno, sonda de ADN/ARN o cualquier otra molécula con afinidad por una diana deseada. Los ejemplos de técnicas de accionadores de gotículas para inmovilizar perlas magnéticamente sensibles y/o perlas no magnéticamente sensibles y/o realizar protocolos de operaciones de gotículas usando perlas se describen en Pollack y col., Pub. de patente de EE.UU. N.º 20080053205, titulada "Droplet-Based Particle Sorting", publicada el 6 de marzo de 2008; Sol. de Patente de EE.UU. N.º 61/039.183, titulada "Multiplexing Bead Detection in a Single Droplet", presentada el 25 de marzo de 2008; Pamula y col., Sol. de Patente de EE.UU. N.º 61/047.789, titulada "Droplet Actuator Devices and Droplet Operations Using Beads", presentada el 25 de abril de 2008; Sol. de Patente de EE.UU. N.º 61/086.183, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods for Manipulating Beads", presentada el 5 de agosto de 2008; Eckhardt y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2008/098236, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads", publicada el 14 de agosto de 2008; Grichko y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2008/134153, titulada "Bead-based Multiplexed Analytical Methods and Instrumentation", publicada el 6 de noviembre de 2008; Eckhardt y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2008/116221, "Bead Sorting on a Droplet Actuator", publicada el 25 de septiembre de 2008; y Eckhardt y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2007/120241, titulada "Droplet-based Biochemistry", publicada el 25 de octubre de 2007. Las características de las perlas pueden emplearse en los aspectos de multiplexación de la presente descripción. Los ejemplos de perlas que tienen características adecuadas para multiplexación, así como métodos para detectar y analizar señales emitidas por dichas perlas, pueden encontrarse en Whitman y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20080305481, titulada "Systems and Methods for Multiplex Analysis of PCR in Real Time", publicada el 11 de diciembre de 2008; Roth, Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20080151240, "Methods and Systems for Dynamic Range Expansion", publicada el 26 de junio de 2008; Sorensen y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20070207513, titulada "Methods, Products, and Kits for Identifying an Analyte in a Sample", publicada el 6 de septiembre de 2007; Roth, Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20070064990, titulada "Methods and Systems for Image Data Processing", publicada el 22 de marzo de 2007; Chandler y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20060159962, titulada "Magnetic Microspheres for use in Fluorescence-based Applications", publicada el 20 de julio de 2006; Chandler y col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20050277197, titulada "Microparticles with Multiple Fluorescent Signals and Methods of Using Same", publicada el 15 de diciembre de 2005; y Chandler y col., Publicación de Patente de EE.UU. N.º 20050118574, titulada "Multiplexed Analysis of Clinical Specimens Apparatus and Method", publicada el 2 de junio de 2005.

"Gotita" significa un volumen de líquido en un accionador de gotitas. Típicamente, una gotita está al menos parcialmente delimitada por un fluido de relleno. Por ejemplo, una gotita puede estar completamente rodeada por un fluido de relleno o puede estar delimitada por un fluido de relleno y una o más superficies del accionador de gotitas. Como otro ejemplo, una gotita puede estar delimitada por el fluido de relleno, una o más superficies del accionador de gotitas y/o la atmósfera. Como otro ejemplo más, una gotita puede estar delimitada por el fluido de relleno y la atmósfera. Las gotitas pueden ser, por ejemplo, acuosas o no acuosas o pueden ser mezclas o emulsiones que incluyen componentes acuosos y no acuosos. Las gotículas pueden adoptar una amplia diversidad de formas; los ejemplos no limitantes incluyen generalmente en forma de disco, en forma de babosa, esfera truncada, elipsoide, esférica, esfera parcialmente comprimida, hemisférica, ovoide, cilíndrica, combinaciones de tales formas y varias

formas formadas durante operaciones de gotículas, tales como fusión o división o formadas como resultado del contacto de tales formas con una o más superficies de un accionador de gotículas. Para ejemplos de fluidos de gotículas que pueden someterse a operaciones de gotículas usando el enfoque de la presente descripción, véase Eckhardt y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2007/120241, titulada, “Droplet-Based Biochemistry”, publicada el 25 de octubre de 2007.

En diversas realizaciones, una gotita puede incluir una muestra biológica, como sangre total, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido seminal, excreción vaginal, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido cístico, bilis, orina, líquido gástrico, líquido intestinal, muestras fecales, líquidos que contienen una o varias células, líquidos que contienen orgánulos, tejidos fluidizados, organismos fluidizados, líquidos que contienen múltiples organismos celulares, hispos biológicos y lavados biológicos. Además, una gotita puede incluir un reactivo, como agua, agua desionizada, soluciones salinas, soluciones ácidas, soluciones básicas, soluciones detergentes y/o tampones. Una gotícula puede incluir ácidos nucleicos, tales como ADN, ADN genómico, ARN, ARNm o análogos de los mismos; nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos, tales como análogos que tienen restos terminadores tales como aquellos descritos en Bentley y col., Nature 456:53-59 (2008); Gormley y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2013/131962, titulada, “Improved Methods of Nucleic Acid Sequencing”, publicada el 12 de septiembre de 2013; Barnes y col., Patente de EE.UU. N.º 7,057,026, titulada “Labelled Nucleotides”, concedida el 6 de junio de 2006; Kozlov y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2008/042067, titulada, “Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing”, publicada el 10 de abril de 2008; Rigatti y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2013/117595, titulada, “Targeted Enrichment and Amplification of Nucleic Acids on a Support”, publicada el 15 de agosto de 2013; Hardin y col., Patente de EE.UU. N.º 7.329.492, titulada “Methods for Real-Time Single Molecule Sequence Determination”, concedida el 12 de febrero de 2008; Hardin y col., Patente de EE.UU. N.º 7.211.414, titulada “Enzymatic Nucleic Acid Synthesis: Compositions and Methods for Altering Monomer Incorporation Fidelity”, concedida el 1 de mayo de 2007; Turner y col., Patente de EE.UU. N.º 7.315.019, titulada “Arrays of Optical Confinements and Uses Thereof”, concedida el 1 de enero de 2008; Xu y col., Patente de EE.UU. N.º 7.405.281, titulada “Fluorescent Nucleotide Analogs and Uses Thereof”, concedida el 29 de julio de 2008; y Ranky col., Pub. de Patente de EE.UU. N.º 20080108082, titulada “Polymerase Enzymes and Reagents for Enhanced Nucleic Acid Sequencing”, publicada el 8 de mayo de 2008; enzimas tales como polimerasas, ligasas, recombinasas o transposasas; compañeros de unión tales como anticuerpos, epítopos, estreptavidina, avidina, biotina, lectinas o carbohidratos; u otras moléculas bioquímicamente activas. Otros ejemplos de contenido de gotitas incluyen reactivos, como un reactivo para un protocolo bioquímico, como un protocolo de amplificación de ácido nucleico, un protocolo de ensayo basado en afinidad, un protocolo de ensayo enzimático, un protocolo de secuenciación y/o un protocolo para análisis de fluidos biológicos. Una gotita puede incluir una o más perlas.

“Operación de gotitas” significa cualquier manipulación de una gotita en un accionador de gotitas. Una operación de gotículas puede incluir, por ejemplo: cargar una gotícula en el accionador de gotículas; dispensar una o más gotículas desde una gotícula fuente; dividir a la mitad, separar o dividir una gotícula en dos o más gotículas; transportar una gotícula de un lugar a otro en cualquier dirección; fusionar o combinar dos o más gotículas en una gotícula individual; diluir una gotícula; mezclar una gotícula; agitar una gotícula; deformar una gotícula; mantener una gotícula en su posición; incubar una gotícula; calentar una gotícula; vaporizar una gotícula; enfriar una gotícula; desechar una gotícula; transportar una gotícula fuera de un accionador de gotículas; otras operaciones de gotículas descritas en la presente memoria; y/o combinación de las anteriores. Los términos “fusionar”, “fusión”, “combinar”, “combinación” y similares se utilizan para describir la creación de una gotita a partir de dos o más gotitas. Debe entenderse que cuando tal término se usa en referencia a dos o más gotitas, se puede usar cualquier combinación de operaciones de gotitas que sea suficiente para dar como resultado la combinación de dos o más gotitas en una gotita. Por ejemplo, “fusionar la gotita A con la gotita B” se puede lograr transportando la gotita A en contacto con una gotita estacionaria B, transportando la gotita B en contacto con una gotita estacionaria A o transportando las gotitas A y B en contacto entre sí. Los términos “partir”, “separar” y “dividir” no pretenden implicar ningún resultado en particular con respecto al volumen de las gotitas resultantes (es decir, el volumen de las gotitas resultantes puede ser el mismo o diferente) o el número de gotitas resultantes (el número de gotitas resultantes puede ser 2, 3, 4, 5 o más). El término “mezclar” se refiere a operaciones de gotitas que dan como resultado una distribución más homogénea de uno o más componentes dentro de una gotita. Ejemplos de operaciones de “carga” de gotitas incluyen carga de microdiálisis, carga asistida por presión, carga robótica, carga pasiva y carga de pipetas. Las operaciones de gotitas pueden estar mediadas por electrodos. En algunos casos, las operaciones de gotitas se facilitan aún más mediante el uso de regiones hidrófilas y/o hidrófobas en superficies y/o mediante obstáculos físicos. Para ver ejemplos de operaciones de gotitas, consulte las patentes y solicitudes de patente citadas anteriormente bajo la definición de “accionador de gotitas”. En ocasiones, se pueden utilizar técnicas de detección o formación de imágenes de impedancia o capacitancia para determinar o confirmar el resultado de una operación de gotitas. Los ejemplos de tales técnicas se describen en Sturmer y col., Pub. de Patente de EE.UU. US-20100194408, titulada “Capacitance Detection in a Droplet Actuator”, publicada el 5 de agosto de 2010. En términos generales, las técnicas de detección o formación de imágenes se pueden usar para confirmar la presencia o ausencia de una gotita en un electrodo específico. Por ejemplo, la presencia de una gotita dispensada en el electrodo de destino después de una operación de dispensación de gotitas confirma que la operación de dispensación de gotitas fue eficaz. De manera similar, la presencia de una gotita en un punto de detección en una etapa apropiada en un protocolo de ensayo puede confirmar que un conjunto previo de operaciones de gotita ha

producido con éxito una gotita para la detección. El tiempo de transporte de las gotitas puede ser bastante rápido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el transporte de una gotita de un electrodo al siguiente puede superar aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente 0,1 segundos, o aproximadamente 0,01 segundos, o aproximadamente 0,001 segundos. En una realización, el electrodo funciona en modo de CA pero se cambia al modo de CC para la obtención de imágenes. Es útil para realizar operaciones con gotículas que el área de la huella de la gotícula sea similar al área de electrohumectación; en otras palabras, las gotículas 1x, 2x y 3x se controlan de manera útil usando 1, 2 y 3 electrodos, respectivamente. Si la huella de la gotícula es mayor que el número de electrodos disponibles para realizar una operación de gotículas en un momento dado, la diferencia entre el tamaño de la gotícula y el número de electrodos no debería ser típicamente mayor que 1; en otras palabras, una gotícula 2x se controla de forma útil usando 1 electrodo y una gotícula 3x se controla de forma útil usando 2 electrodos. Cuando las gotitas incluyen perlas, es útil que el tamaño de la gotita sea igual al número de electrodos que controlan la gotita, p. ej., que transportan la gotita.

“Fluido de relleno” significa un fluido asociado con un sustrato de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas, cuyo fluido es suficientemente inmiscible con una fase de gotitas para hacer que la fase de gotitas esté sujeta a operaciones de gotitas mediadas por electrodos. Por ejemplo, el espacio de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas se llena típicamente con un fluido de relleno. El fluido de relleno puede ser, por ejemplo, o incluir aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de relleno de hexadecano. El fluido de relleno puede ser o incluir un aceite halogenado, tal como un aceite fluorado o perfluorado. El fluido de relleno puede llenar todo el espacio del accionador de gotitas o puede revestir una o más superficies del accionador de gotitas. Los fluidos de relleno pueden ser conductores o no conductores. Los fluidos de relleno se pueden seleccionar para mejorar las operaciones de las gotitas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias diana de las gotitas, mejorar la formación de microgotitas, reducir la contaminación cruzada entre las gotitas, reducir la contaminación de las superficies del accionador de gotitas, reducir la degradación de los materiales del accionador de gotitas, etc. Por ejemplo, se pueden seleccionar fluidos de relleno para que sean compatibles con los materiales del accionador de gotitas. Como ejemplo, los fluidos de relleno fluorados se pueden emplear de manera útil con revestimientos superficiales fluorados. Los fluidos de relleno fluorados son útiles para reducir la pérdida de compuestos lipofílicos, tales como sustratos de umbeliferona como sustratos de 6-hexadecanoilamido-4-metilumbeliferona (por ejemplo, para uso en Krabbe, Niemann-Pick u otros ensayos); otros sustratos de umbeliferona se describen en Winger y col., Pub. de Patente de EE.UU. US-20110118132, titulada “Enzymatic Assays Using Umbelliferone Substrates with Cyclodextrins in Droplets of Oil”, publicada el 19 de mayo de 2011. Entre los ejemplos de aceites fluorados adecuados se incluyen los de la línea Galden, tales como Galden HT170 (punto de ebullición = 170 °C, viscosidad = 1,8 cSt, densidad = 1,77), Galden HT200 (punto de ebullición = 200 °C, viscosidad = 2,4 cSt, d = 1,79), Galden HT230 (punto de ebullición = 230 °C, viscosidad = 4,4 cSt, d = 1,82) (todos de Solvay Solexis); aquellos de la línea Novec, tales como Novec 7500 (punto de ebullición = 128 °C, viscosidad = 0,8 cSt, d = 1,61), Fluorinert FC-40 (punto de ebullición = 155 °C, viscosidad = 1,8 cSt, d = 1,85), Fluorinert FC-43 (punto de ebullición = 174 °C, viscosidad = 2,5 cSt, d = 1,86) (ambos de 3M). En general, la selección de fluidos de relleno perfluorados se basa en la viscosidad cinemática (se prefiere <7 cSt, pero no se requiere) y en el punto de ebullición (se prefiere > 150 °C, pero no se requiere, para su uso en aplicaciones basadas en ADN/ARN (PCR, etc.)). Los fluidos de relleno pueden, por ejemplo, estar dopados con tensioactivos u otros aditivos. Por ejemplo, se pueden seleccionar aditivos para mejorar las operaciones de las gotitas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias diana de las gotitas, la formación de microgotitas, la contaminación cruzada entre gotitas, la contaminación de las superficies del accionador de gotitas, la degradación de los materiales del accionador de gotitas, etc. La composición del fluido de relleno, incluido el dopado con tensioactivo, se puede seleccionar por su rendimiento con los reactivos utilizados en los protocolos de ensayo específicos y la interacción o no interacción eficaz con los materiales del accionador de gotitas. Los ejemplos de fluidos de material de carga y formulaciones de fluidos de material de carga adecuados para su uso con los métodos establecidos en la presente memoria se proporcionan en Srinivasan y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2010/027894, titulada “Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods”, publicada el 3 de junio de 2010; Srinivasan y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2009/021173, titulada “Use of Additives for Enhancing Droplet Operations”, publicada el 12 de febrero de 2009; Sista y col., Pub. de Patente Internacional N.º WO/2008/098236, titulada “Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads”, publicada el 15 de enero de 2009; y Monroe y col., Pub. de Patente de EE.UU. US-20080283414, titulada “Electrowetting Devices”, publicada el 20 de noviembre de 2008. En algunos casos, los aceites fluorados pueden estar dopados con tensioactivos fluorados, p. ej., Zonyl FSO-100 (Sigma-Aldrich) y/u otros. Un fluido de relleno es típicamente un líquido. En algunas realizaciones, se puede usar un gas de relleno en lugar de un líquido.

“Inmovilizar”, con respecto a perlas que responden magnéticamente, significa que las perlas están sustancialmente restringidas en su posición en una gotícula o en un fluido de carga en un accionador de gotículas. Por ejemplo, en una realización, las perlas inmovilizadas están suficientemente restringidas en su posición en una gotícula para permitir la ejecución de una operación de división de gotículas, produciendo una gotícula con sustancialmente todas las perlas y una gotícula sustancialmente carente de perlas.

“Que responde magnéticamente” significa que responde a un campo magnético. Las “perlas que responden al magnetismo” incluyen o están compuestas de materiales que responden al magnetismo. Los ejemplos de materiales que responden magnéticamente incluyen materiales paramagnéticos, materiales ferromagnéticos, materiales ferromagnéticos y materiales metamagnéticos. Los ejemplos de materiales paramagnéticos adecuados incluyen

hierro, níquel y cobalto, así como óxidos metálicos, tales como Fe₃O₄, BaFe₁₂O₁₉, CoO, NiO, Mn₂O₃, Cr₂O₃ y CoMnP.

5 “Depósito” significa un recinto o recinto parcial configurado para contener, almacenar o suministrar líquido. Un sistema accionador de gotitas de la presente descripción puede incluir depósitos dentro del cartucho y/o depósitos fuera del cartucho. Los depósitos sobre cartucho pueden ser (1) depósitos sobre accionador, que son depósitos en el hueco de operaciones de gotículas o en la superficie de operaciones de gotículas; (2) depósitos fuera del accionador, que son depósitos en el cartucho del accionador de gotículas, pero fuera del hueco de operaciones de gotículas, y no en contacto con la superficie de operaciones de gotículas; o (3) depósitos híbridos que tienen regiones con accionador activado y regiones con accionador desactivado. Un ejemplo de un depósito sin accionador es un depósito en el sustrato superior. Un depósito fuera del accionador está típicamente en comunicación fluida con una abertura o paso de flujo dispuesto para hacer fluir líquido desde el depósito fuera del accionador al espacio de operaciones de gotitas, tal como a un depósito en el accionador. Un depósito fuera del cartucho puede ser un depósito que no forma parte del cartucho accionador de gotitas en absoluto, pero que fluye líquido a alguna parte del cartucho accionador de gotitas. 10 Por ejemplo, un depósito sin cartucho puede ser parte de un sistema o estación de acoplamiento a la que se acopla el cartucho accionador de gotitas durante el funcionamiento. De manera similar, un depósito fuera del cartucho puede ser un recipiente de almacenamiento de reactivos o una jeringa que se usa para forzar el ingreso de fluido en un depósito en el cartucho o en un espacio de operaciones de gotitas. Un sistema que usa un depósito fuera del cartucho incluirá típicamente un medio de paso de fluido mediante el cual el líquido puede transferirse desde el depósito fuera del cartucho a un depósito dentro del cartucho o en un espacio de operaciones de gotitas. 20

“Transportar dentro del campo magnético de un imán”, “transportar hacia un imán” y similares, como se usan en la presente memoria para referirse a gotículas y/o perlas magnéticamente sensibles dentro de gotículas, pretenden referirse a transportar dentro de una región de un campo magnético capaz de atraer sustancialmente perlas magnéticamente sensibles en la gotícula. De manera similar, “transportar lejos de un imán o campo magnético”, “transportar fuera del campo magnético de un imán” y similares, como se usa en la presente memoria para referirse a gotículas y/o perlas magnéticamente sensibles dentro de gotículas, pretende referirse a transportar lejos de una región de un campo magnético capaz de atraer sustancialmente perlas magnéticamente sensibles en la gotícula, ya sea que la gotícula o las perlas magnéticamente sensibles se eliminen completamente del campo magnético o no. Se apreciará que en cualquiera de los casos descritos en la presente memoria, la gotícula puede ser transportada hacia o lejos de la región deseada del campo magnético, y/o la región deseada del campo magnético puede ser movida hacia o lejos de la gotícula. La referencia a un electrodo, una gotícula o perlas magnéticamente sensibles que están “dentro” o “en” un campo magnético, o similar, pretende describir una situación en que el electrodo está situado de una manera que le permite transportar una gotícula hacia y/o lejos de una región deseada de un campo magnético, o la gotícula o las perlas magnéticamente sensibles están situadas en una región deseada del campo magnético, en cada caso donde el campo magnético en la región deseada es capaz de atraer sustancialmente cualquier perla magnéticamente sensible en la gotícula. De manera similar, la referencia a un electrodo, una gotícula o perlas magnéticamente sensibles que están “fuera de” o “lejos de” un campo magnético, y similares, tiene previsto describir una situación en que el electrodo está situado de una manera que permite que el electrodo transporte una gotícula lejos de una cierta región de un campo magnético, o la gotícula o las perlas magnéticamente sensibles están situadas lejos de una cierta región del campo magnético, en cada caso donde el campo magnético en dicha región no es capaz de atraer sustancialmente ninguna perla magnéticamente sensible en la gotícula o en que cualquier atracción restante no elimina la eficacia de las operaciones con gotículas realizadas en la región. En varios aspectos de la presente descripción, un sistema, un accionador de gotículas u otro componente de un sistema puede incluir un imán, tal como uno o más imanes permanentes (por ejemplo, un solo imán cilíndrico o de barra o una matriz de dichos imanes, tal como una matriz Halbach) o un electroimán o una matriz de electroimanes, para formar un campo magnético para interactuar con perlas magnéticamente sensibles u otros componentes en el chip. Tales interacciones pueden incluir, por ejemplo, inmovilizar o restringir sustancialmente el movimiento o flujo de perlas magnéticamente sensibles durante el almacenamiento o en una gotícula durante una operación de gotícula o extraer perlas magnéticamente sensibles de una gotícula. 25 30 35 40 45 50

“Lavar” con respecto a lavar una perla significa reducir la cantidad y/o la concentración de una o más sustancias en contacto con la perla o expuestas a la perla desde una gotícula en contacto con la perla. La reducción de la cantidad y/o la concentración de la sustancia puede ser parcial, sustancialmente completa o incluso completa. La sustancia puede ser cualquiera de una amplia diversidad de sustancias; los ejemplos incluyen sustancias objetivo para análisis posteriores y sustancias no deseadas, tales como componentes de una muestra, contaminantes y/o exceso de reactivo. En algunas realizaciones, una operación de lavado comienza con una gotícula inicial en contacto con una perla sensible magnéticamente, donde la gotícula incluye una cantidad inicial y una concentración inicial de una sustancia. La operación de lavado puede realizarse usando una diversidad de operaciones de gotículas. La operación de lavado puede producir una gotícula que incluye la perla sensible magnéticamente, donde la gotícula tiene una cantidad y/o una concentración totales de la sustancia que es menor que la cantidad y/o concentración iniciales de la sustancia. Se describen ejemplos de técnicas de lavado adecuadas en Pamula y col., Patente de EE.UU. N.º 7.439.014, titulada “Droplet-Based Surface Modification and Washing”, concedida el 21 de octubre de 2008. 55 60

65 Los términos “arriba”, “abajo”, “encima”, “debajo” y “sobre” se usan a lo largo de la descripción con referencia a las posiciones relativas de los componentes de la cubeta de lectura y/o accionador de gotículas, tal como las posiciones

relativas de sustratos superior e inferior de la cubeta de lectura y/o el accionador de gotículas. Se apreciará que el accionador de gotículas es funcional independientemente de su orientación en el espacio.

5 Cuando un líquido en cualquier forma (p. ej., una gotita o un cuerpo continuo, ya sea en movimiento o estacionario) se describe como “encima”, “en” o “sobre” un electrodo, sección, matriz o superficie, dicho líquido podría estar ya sea en contacto directo con el electrodo/sección/matriz/superficie, o podría estar en contacto con una o más capas o películas que se interponen entre el líquido y el electrodo/sección/matriz/superficie. En un ejemplo, el fluido de material de carga puede considerarse como una película entre dicho líquido y la superficie del electrodo/chip/matriz.

10 Cuando una gotita se describe como “sobre” o “cargada” en un accionador de gotitas, debe entenderse que la gotita está dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita el uso del accionador de gotitas para realizar una o más operaciones de gotita en la gotita, estando la gotita dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita la detección de una propiedad o una señal de la gotita, y/o la gotita se ha sometido a una operación de gotita en el accionador de gotitas.

15 Códigos de barras y UMI sobre perlas

20 En algunas realizaciones, los cebadores que llevan códigos de barras de muestra pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Adicional o alternativamente, los cebadores que llevan secuencias UMI pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una o más perlas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, puede presentarse una pluralidad de perlas, en donde cada perla en la pluralidad lleva un código de barras de muestra único y/o una secuencia UMI. En algunas realizaciones, las células individuales se ponen en contacto con una o más perlas que tienen un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar la célula individual. En algunas realizaciones, los lisados de células individuales se ponen en contacto con una o más perlas que tienen un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar los lisados de células individuales. En algunas realizaciones, el ácido nucleico purificado de células individuales se pone en contacto con una o más perlas que tienen un conjunto único de códigos de barras de muestra y/o secuencias UMI para identificar el ácido nucleico purificado de la célula individual. Las perlas pueden manipularse de cualquier manera adecuada como se conoce en la técnica, por ejemplo, usando accionadores de gotículas como se describe anteriormente en la presente memoria.

35 Las expresiones “superficie sólida”, “soporte sólido” y otros equivalentes gramaticales en la presente memoria se refieren a cualquier material que sea apropiado para o que pueda modificarse para que sea adecuado para la unión de los cebadores, los códigos de barras y las secuencias descritos en la presente memoria. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de sustratos posibles es muy grande. Posibles sustratos incluyen, pero sin limitarse a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, cerámicas, resinas, sílice o materiales basados en sílice que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas y una variedad de otros polímeros. Los soportes sólidos y superficies sólidas especialmente útiles para algunas realizaciones están situados dentro de un aparato de celda de flujo. A continuación se exponen celdas de flujo ilustrativas con mayor detalle.

45 En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una superficie con patrones adecuada para la inmovilización de cebadores, códigos de barras y secuencias descritos en la presente memoria en un patrón ordenado. Una “superficie con patrones” se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un soporte sólido. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser características donde haya uno o más complejos transposómicos. Las características pueden estar separadas por regiones intersticiales donde no haya complejos transposómicos. En algunas realizaciones, el patrón puede ser un formato de casillas x-y que estén en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición repetitiva de casillas y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede ser una disposición aleatoria de casillas y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, los complejos transposómicos se distribuyen aleatoriamente sobre el soporte sólido. En algunas realizaciones, los complejos transposómicos se distribuyen en una superficie con patrones. En la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2013/0116153 A1 o en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2012/0316086 A1, se describen superficies con patrones ilustrativas que pueden usarse en los métodos expuestos en la presente memoria.

60 En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una matriz de pocillos o surcos en una superficie. Este puede fabricarse, como se sabe generalmente en la técnica, utilizando una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la materia, la técnica utilizada dependerá de la composición y forma del sustrato de la matriz.

65 La composición y la geometría del soporte sólido pueden variar con su uso. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una estructura plana, tal como un portaobjetos, un chip, un microchip y/o una matriz. Como tal, la superficie de un sustrato puede tener la forma de una capa plana. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una o más superficies de una cubeta de lectura. El término “cubeta de lectura”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cámara que comprende una superficie sólida a través de la cual pueden fluir uno o más reactivos líquidos. Se

describen ejemplos de cubetas de lectura y de sistemas fluidos y plataformas de detección relacionados que pueden utilizarse fácilmente en los métodos de la presente descripción, por ejemplo, en Bentley y col., Nature 456:53-59 (2008), documentos WO 04/018497; US-7.057.026; WO 91/06678; WO 07/123744; US-7.329.492; US-7.211.414; US-7.315.019; US-7.405.281, y US 2008/0108082.

5 En algunas realizaciones, el soporte sólido o su superficie no forma un plano, tal como la superficie interna o externa de un tubo o un recipiente. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende microesferas o perlas. Por “microesferas” o “perlas” o “partículas” o equivalentes gramaticales se entiende en la presente memoria partículas discretas pequeñas. Las composiciones de perlas adecuadas incluyen, pero sin limitación, plástico, cerámica, vidrio, poliestireno, metilestireno, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de toria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados, tales como Sepharose, celulosa, nailon, micelas reticuladas y teflón, así como cualquier otro material indicado en la presente memoria para soportes sólidos. La “Microsphere Detection Guide” de Bangs Laboratories, Fishers Ind. es una guía útil. En determinadas realizaciones, las microesferas son microesferas o perlas magnéticas.

10 15 Las perlas no tienen por qué ser esféricas; pueden utilizarse partículas irregulares. De forma alternativa o adicional, las perlas pueden ser porosas. Los tamaños de las perlas varían de nanómetros, es decir, 100 nm, a milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose las perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, prefiriéndose particularmente las de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones pueden utilizarse perlas más pequeñas o más grandes.

20 El término que comprende se entiende en la presente memoria como abierto, incluyendo no sólo los elementos citados, sino abarcando además cualquier elemento adicional.

25 Se ha descrito un número de realizaciones. No obstante, se entenderá que se podrán realizar diversas modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una genoteca de ADNc a partir de una pluralidad de células individuales, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 liberar ARNm de cada célula individual para proporcionar una pluralidad de muestras de ARNm individuales, en donde el ARNm en cada muestra de ARNm individual es de una célula individual; sintetizar una primera cadena de ADNc a partir del ARNm en cada muestra individual de ARNm con un cebador de síntesis de primera cadena, en donde el cebador de síntesis de primera cadena es una mezcla de cebador oligo dT y cebador aleatorizador comprendiendo además cada uno un primer sitio de unión del cebador de amplificación;
 - 10 incorporar una etiqueta en el ADNc para proporcionar una pluralidad de muestras de ADNc etiquetadas, en donde el ADNc en cada muestra de ADNc etiquetada es complementario al ARNm de una célula individual, y en donde la etiqueta comprende una secuencia identificadora específica de la célula y opcionalmente una secuencia identificadora molecular única (UMI);
 - 15 agrupar las muestras de ADNc etiquetadas;
 - amplificar opcionalmente las muestras de ADNc agrupadas para generar una genoteca de ADNc que comprende ADNc bicatenario; y
 - 20 realizar una reacción de tagmentación para escindir simultáneamente cada ADNc e incorporar un adaptador en cada cadena del ADNc, generando de este modo una pluralidad de fragmentos de ADNc etiquetados, en donde la reacción de tagmentación comprende poner en contacto el ADNc bicatenario con una mezcla de transposasa que comprende una secuencia adaptadora que no se encuentra en el cebador de síntesis de la primera cadena, y en donde la mezcla de transposasa consiste esencialmente en transposomas que tienen la misma secuencia adaptadora.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además amplificar los fragmentos de ADNc etiquetados para generar fragmentos de ADNc etiquetados amplificados.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la amplificación comprende añadir una secuencia adicional al extremo 5' de los productos de amplificación.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la secuencia adicional comprende una secuencia de unión del cebador para la amplificación sobre un soporte sólido.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, que comprende además amplificar los fragmentos de ADNc etiquetados amplificados sobre un soporte sólido.
6. El método de la reivindicación 5, que comprende además la secuenciación de los productos de amplificación sobre el soporte sólido.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, que comprende además secuenciar los fragmentos de ADNc etiquetados.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la secuenciación comprende el recuento de etiquetas 3'.
- 45 9. El método de la reivindicación 7, en donde la secuenciación comprende el análisis del transcriptoma completo.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el cebador oligo dT o el cebador aleatorizador comprende una porción bicatenaria.
- 50 11. El método de la reivindicación 10, en donde el cebador oligo dT o el cebador aleatorizador reduce los subproductos de concatenación en comparación con un cebador de síntesis de primera cadena monocatenario.
12. El método de la reivindicación 10, en donde el cebador oligo dT o el cebador aleatorizador comprende una región capaz de formar una horquilla o comprende una región de ARN.
- 55 13. El método de la reivindicación 10, en donde el cebador oligo dT o cebador aleatorizador se hibrida con un oligonucleótido complementario, formando de este modo una porción bicatenaria.

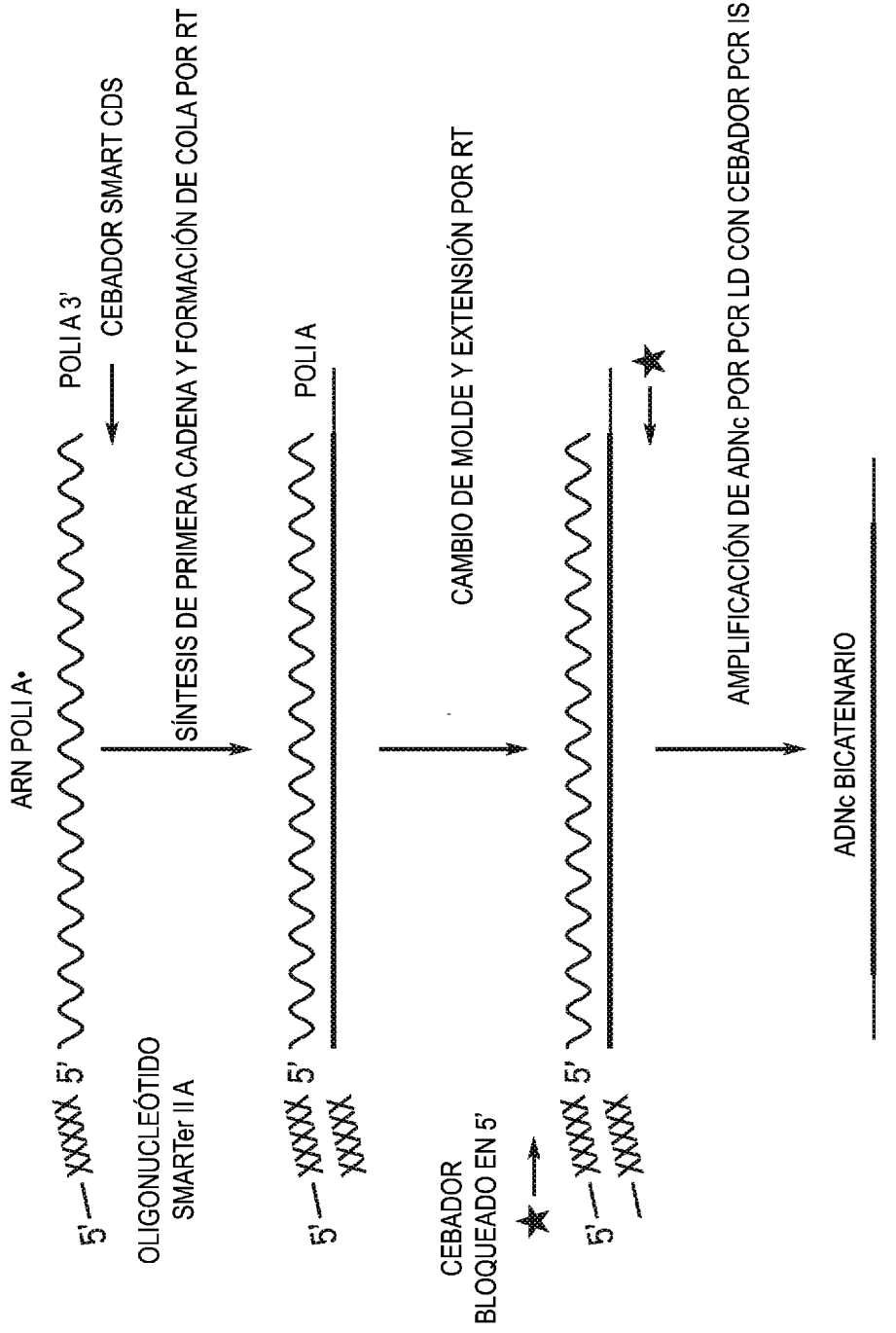


Figura 1

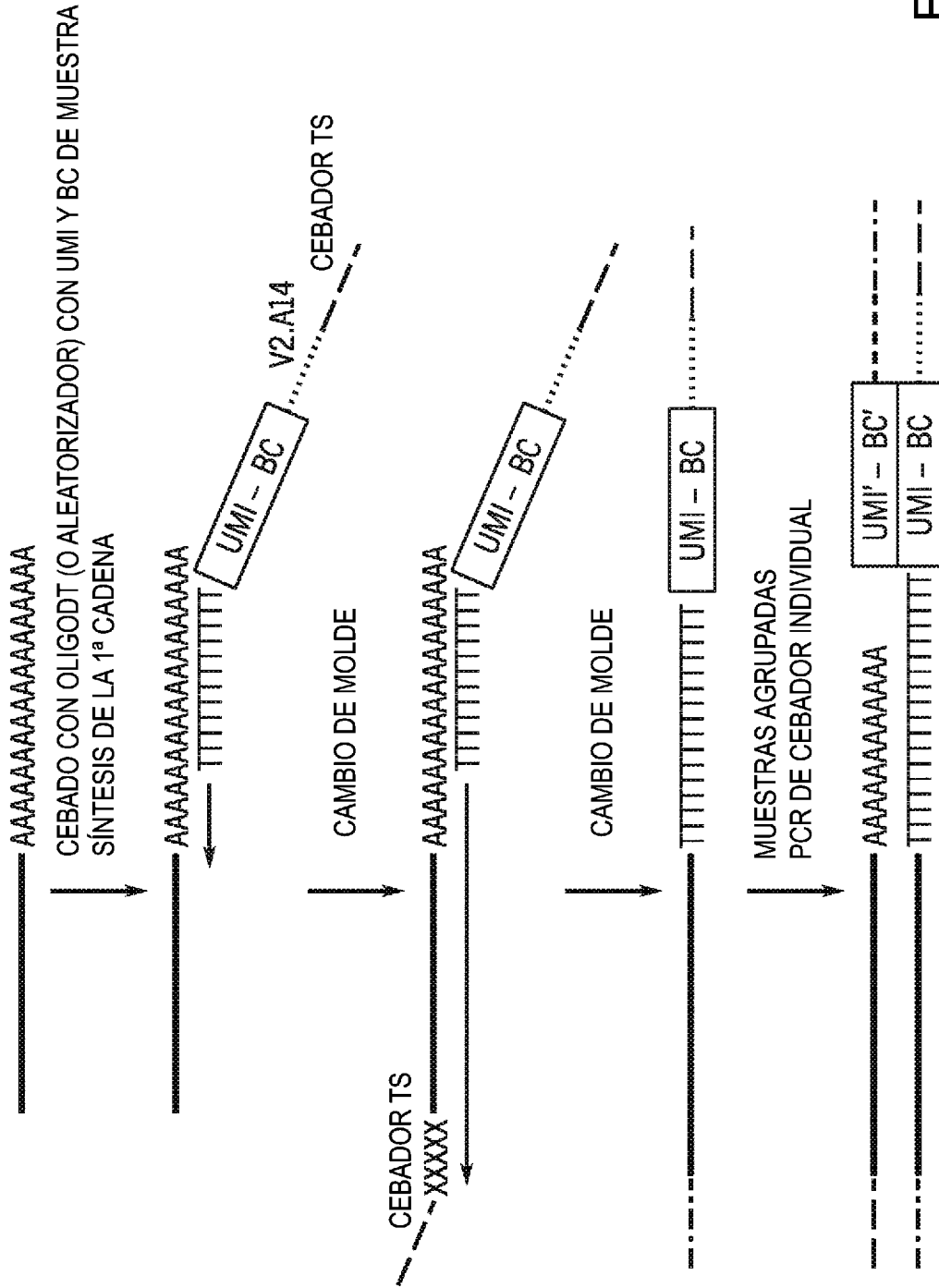


Figura 2A

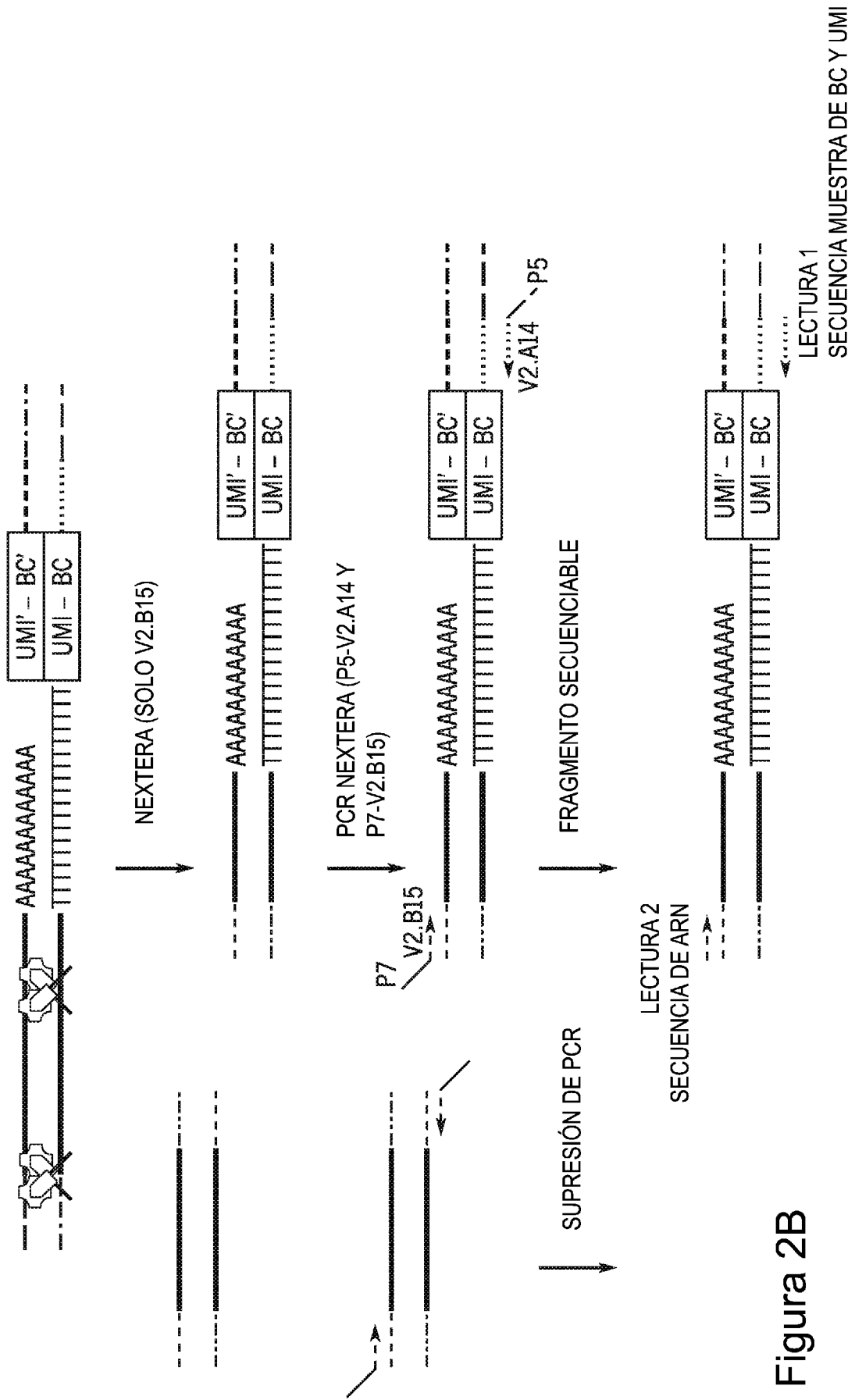


Figura 2B

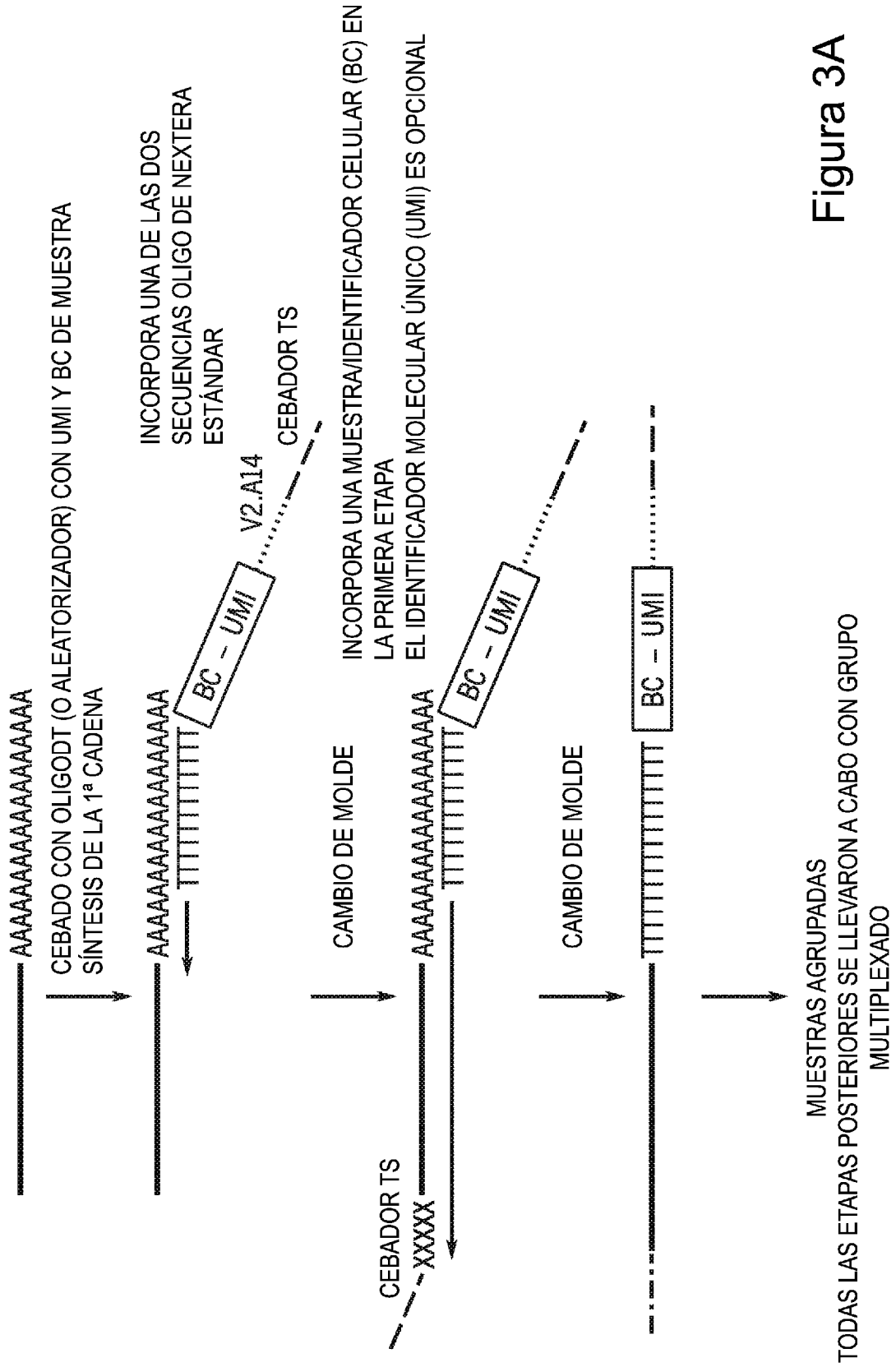


Figura 3A

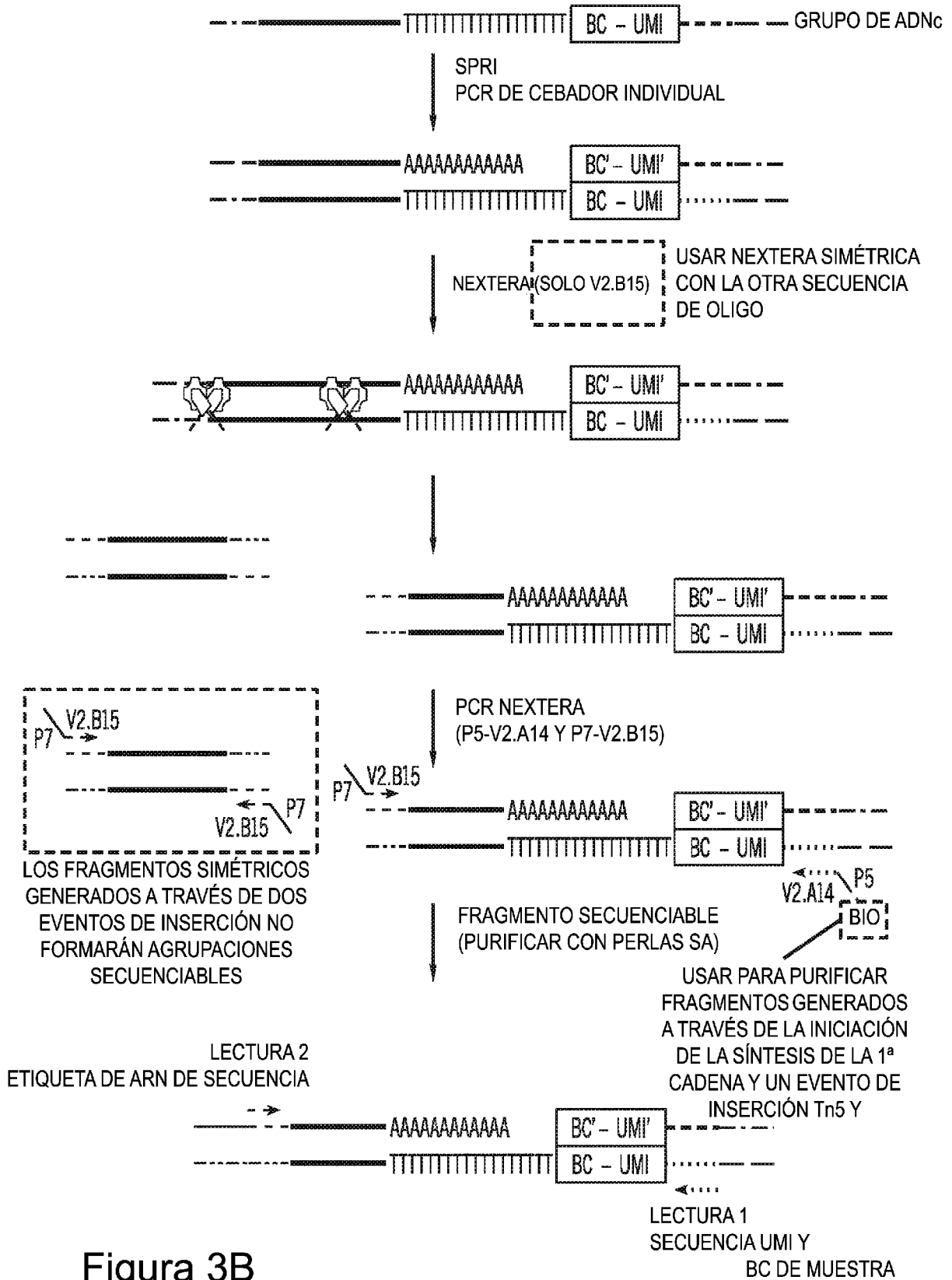
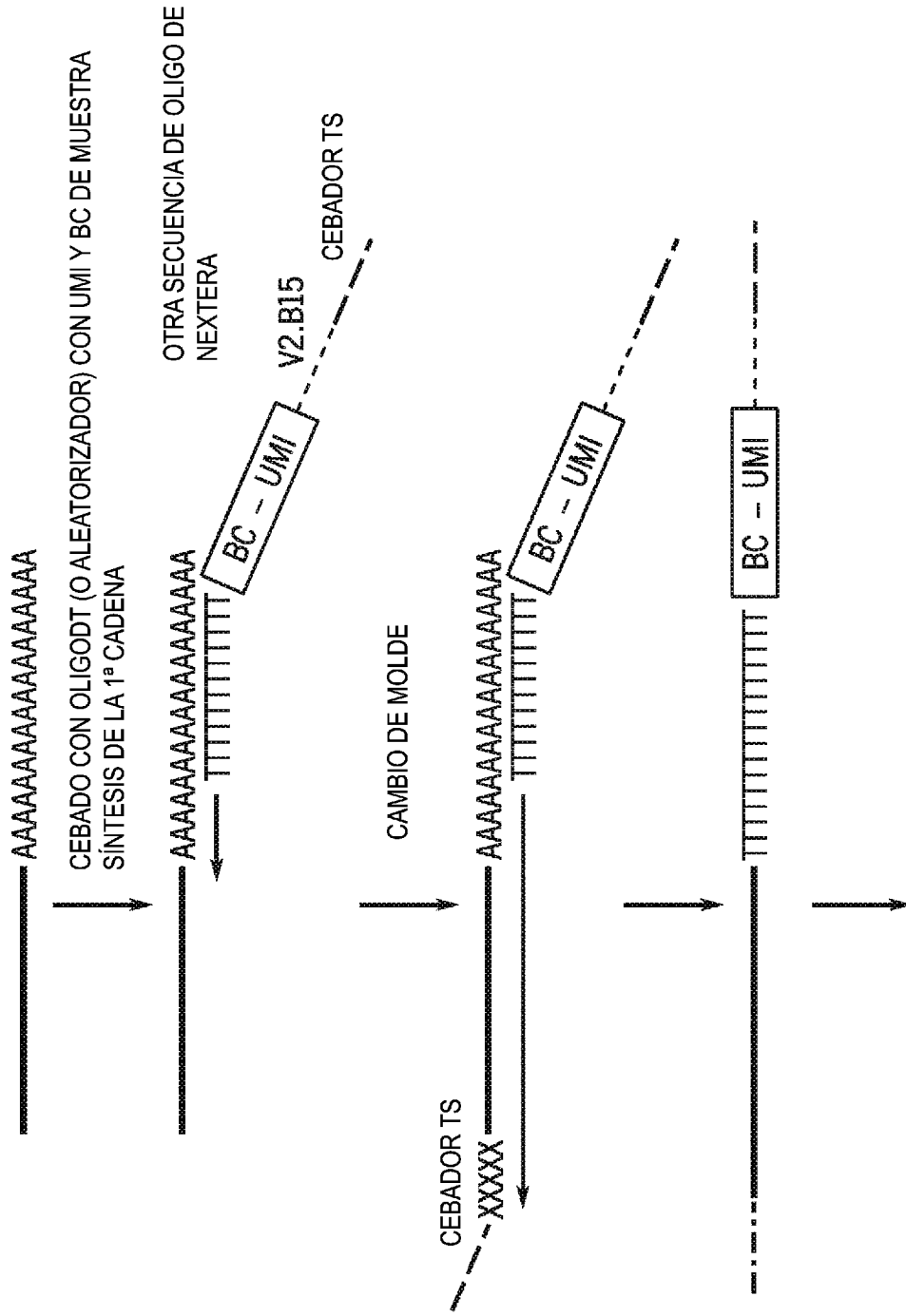


Figura 3B



TODAS LAS ETAPAS POSTERIORES SE LLEVARON A CABO CON GRUPO MULTIPLEXADO

Figura 4A

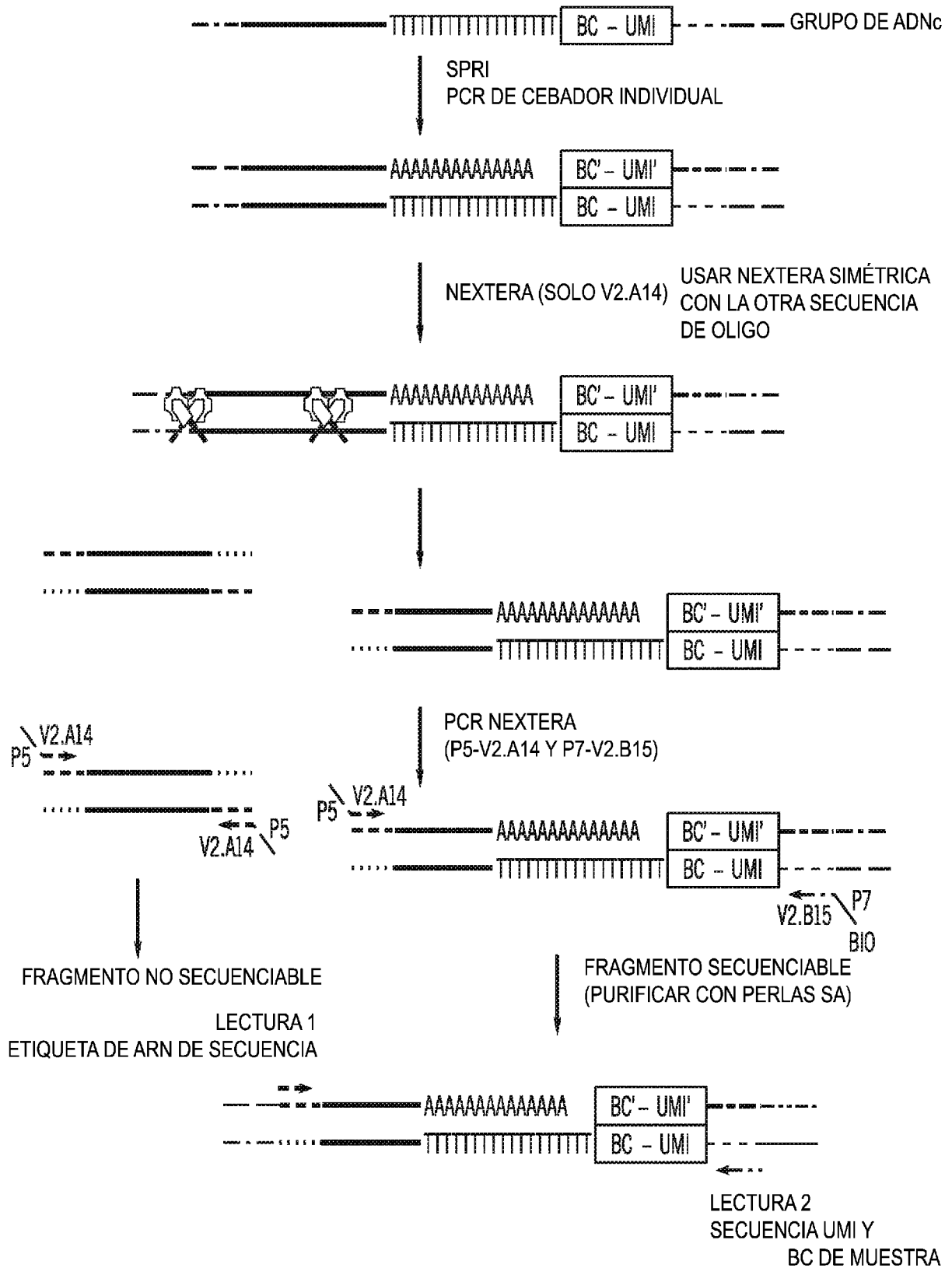


Figura 4B

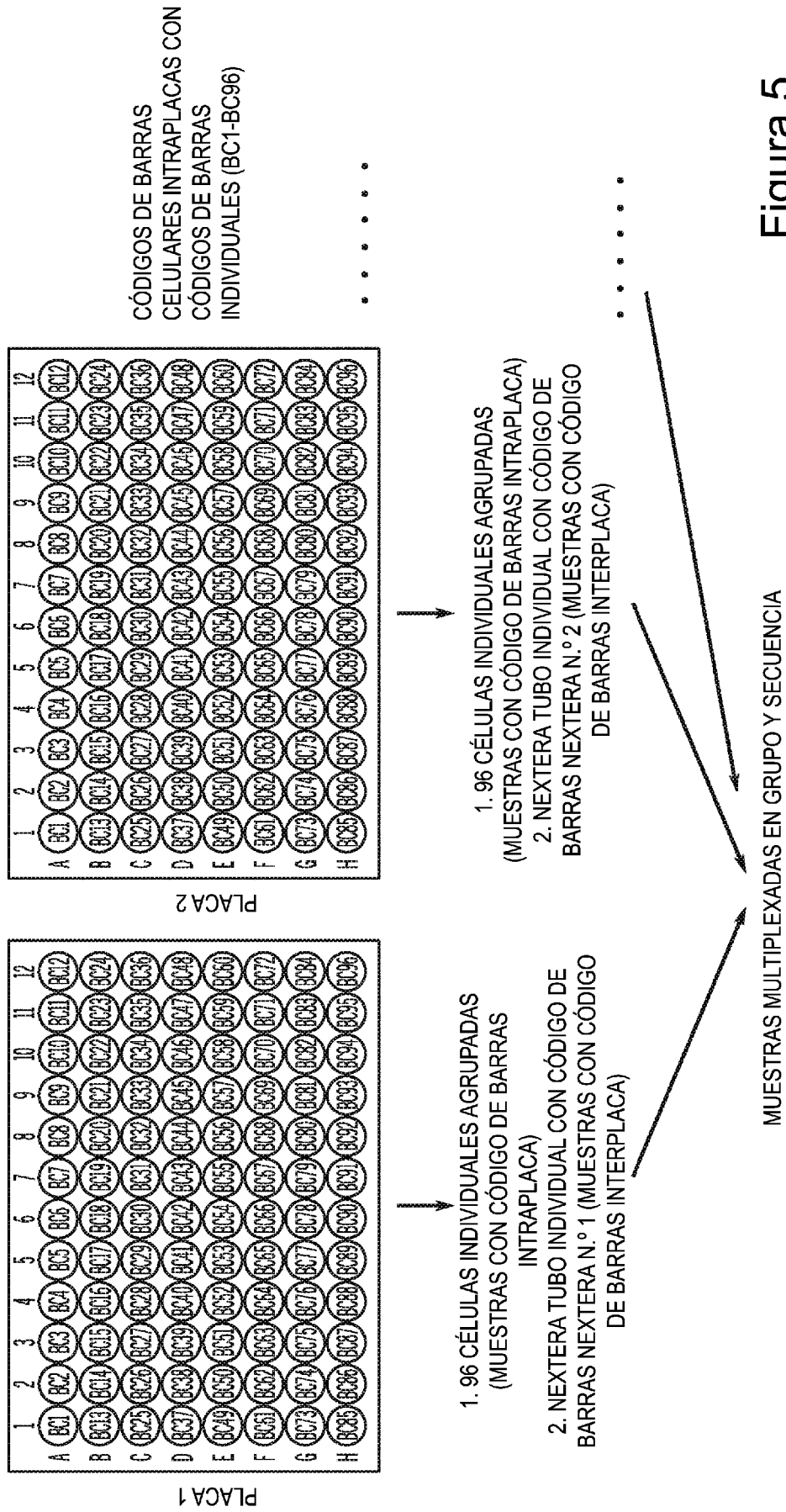


Figura 5

MÉTRICAS DE SECUENCIA CLAVE USANDO 100 pg HBR

MÉTRICA DE SECUENCIA	ESTADÍSTICA			
	GEX DE ALTO RENDIMIENTO	STRT	SMART	
MÉTODO DE CEBADO DE LA 1ª CADENA	OLIGO-DT	OLIGO-DT	OLIGO-DT+ALEATORIZADOR	OLIGO-DT
ALINEADO CON EL TRANSCRIPTOMA HG19	63 %	75 %	50 %	78 %
VELOCIDAD DE MAPEADO				
RIBOSÓMICO	1 %	2 %	12 %	1 %
MITOCONDRIAL	15 %	14 %	15 %	12 %
OTROS	1 %	0 %	0 %	1 %
NO ALINEADO	20 %	9 %	23 %	8 %
CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE RÉPLICAS TÉCNICAS (R)	0,9	0,85	0,72	0,94
N.º DE GENES DETECTADOS (FPKM >1)	10,021	11.254	11.683	8.492

Figura 6

DATOS INICIALES DE <u>CÉLULAS INDIVIDUALES</u>			
MÉTRICA DE SECUENCIA	ESTADÍSTICA		
	OLIGO-DT	GEX DE ALTO RENDIMIENTO	STR
MÉTODO DE CEBADO DE LA 1ª CADENA	OLIGO-DT	OLIGO-DT	OLIGO-DT + ALEATORIZADOR
VERSIÓN DE NEXTERA	V2.B15	V2.B15 / V2.A14	V2.B15 / V2.A14
VELOCIDAD DE MAPEADO	ALINEADO CON HG19 / MM10	69%	77%
	RIBOSÓMICO	1%	1%
	MITOCONDRIA	--	--
	OTROS	1%	1%
	NO ALINEADO	29%	21%
CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE RÉPLICAS TÉCNICAS (R)	0,95	0,94	0,60*
N.º DE GENES DETECTADOS (FPKM >1)	6.904	7.789	8.727
* CORRELACIÓN INUSUALMENTE BAJA DEBIDO A UN VALOR ATÍPICO.			

Figura 7

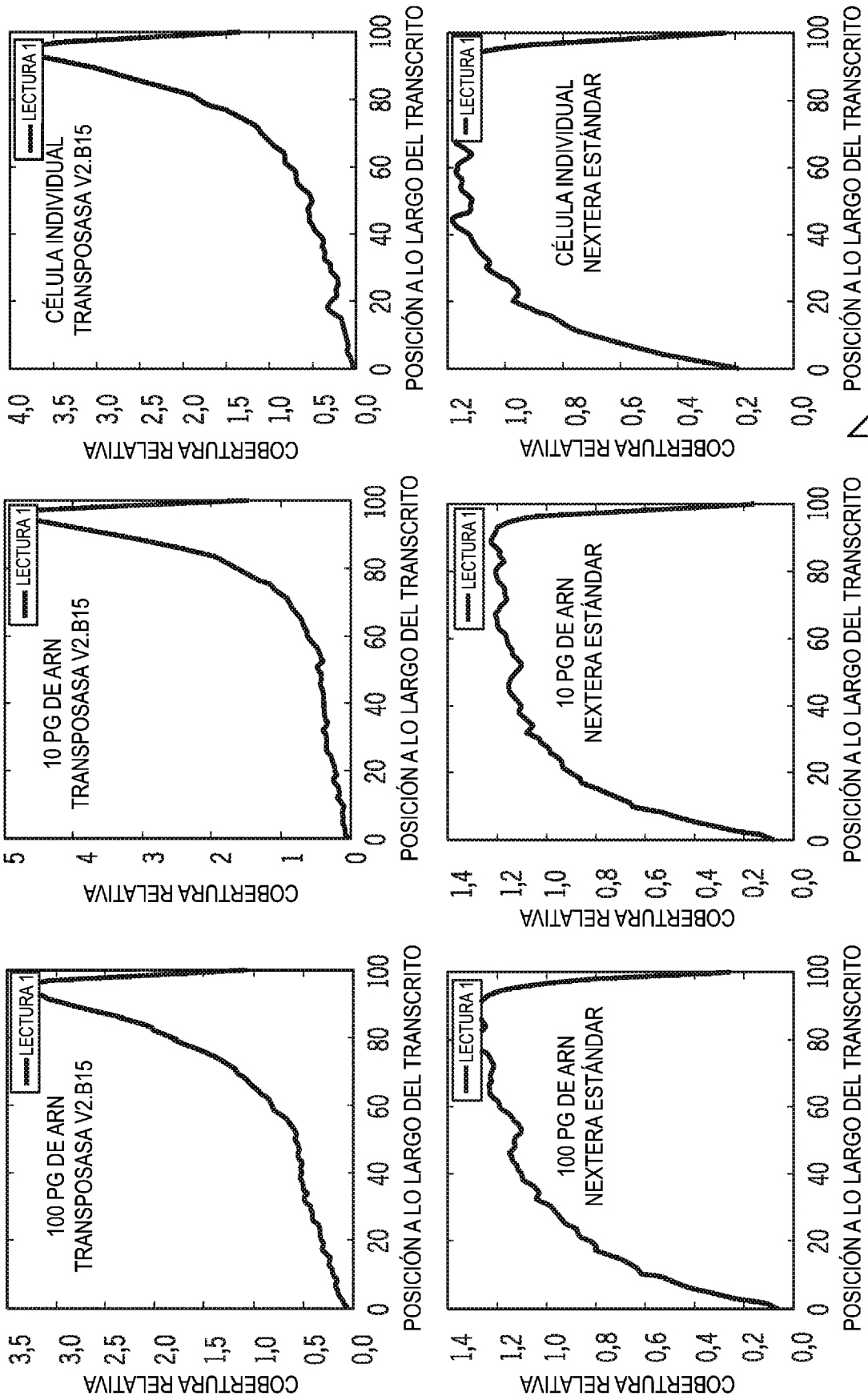


Figura 8

CEBADO CON ALEATORIZADOR Y OLIGO-DT

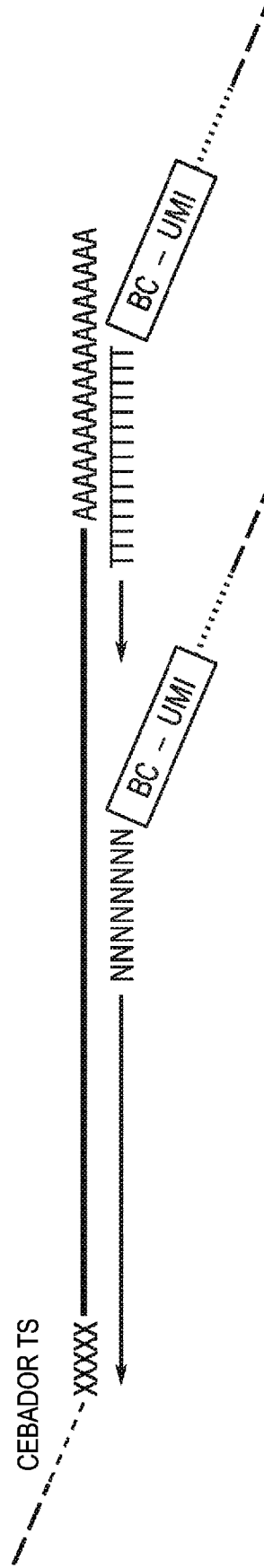


Figura 9A

SUBPRODUCTO DE CONCATENACIÓN DE ALEATORIZADOR

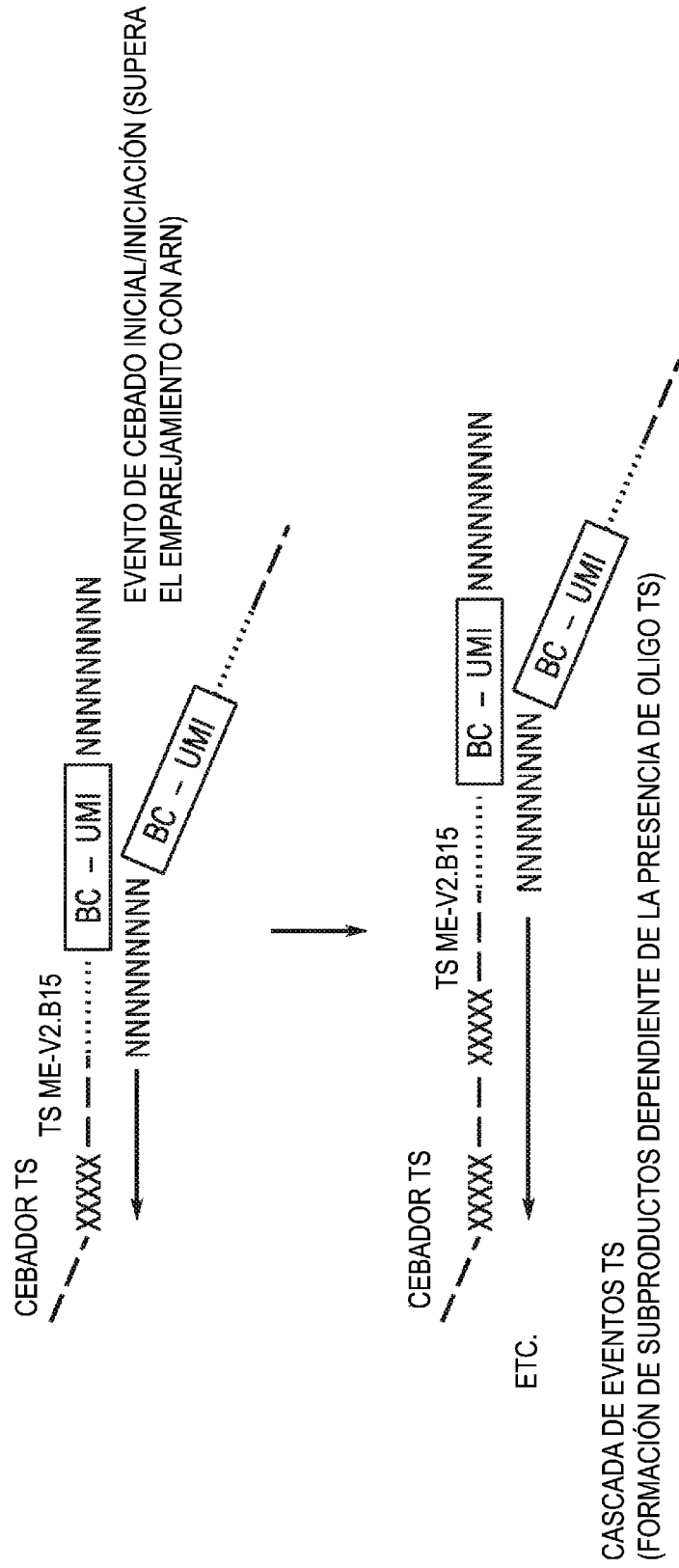


Figura 9B

POSIBLES ESTRATEGIAS PARA REDUCIR EL SUBPRODUCTO DE CONCATENACIÓN

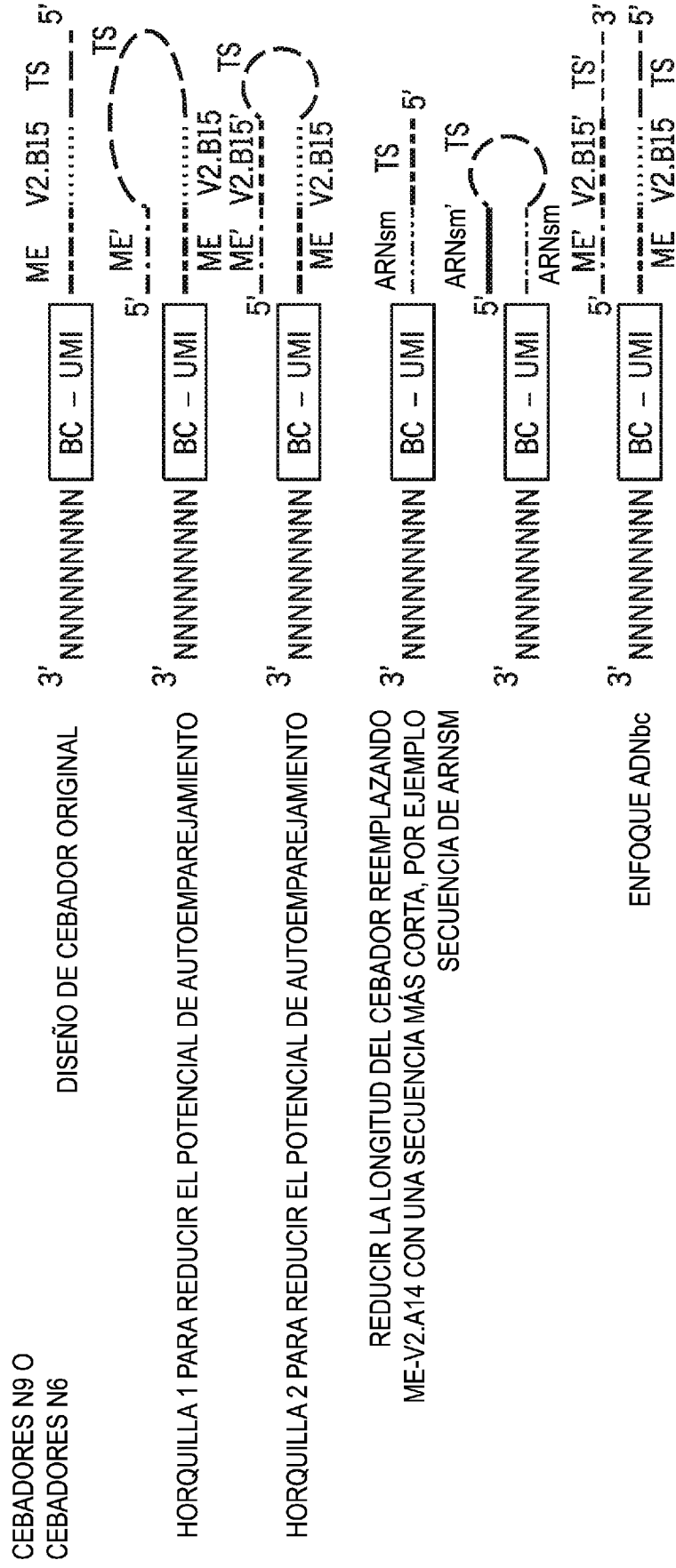


Figura 10

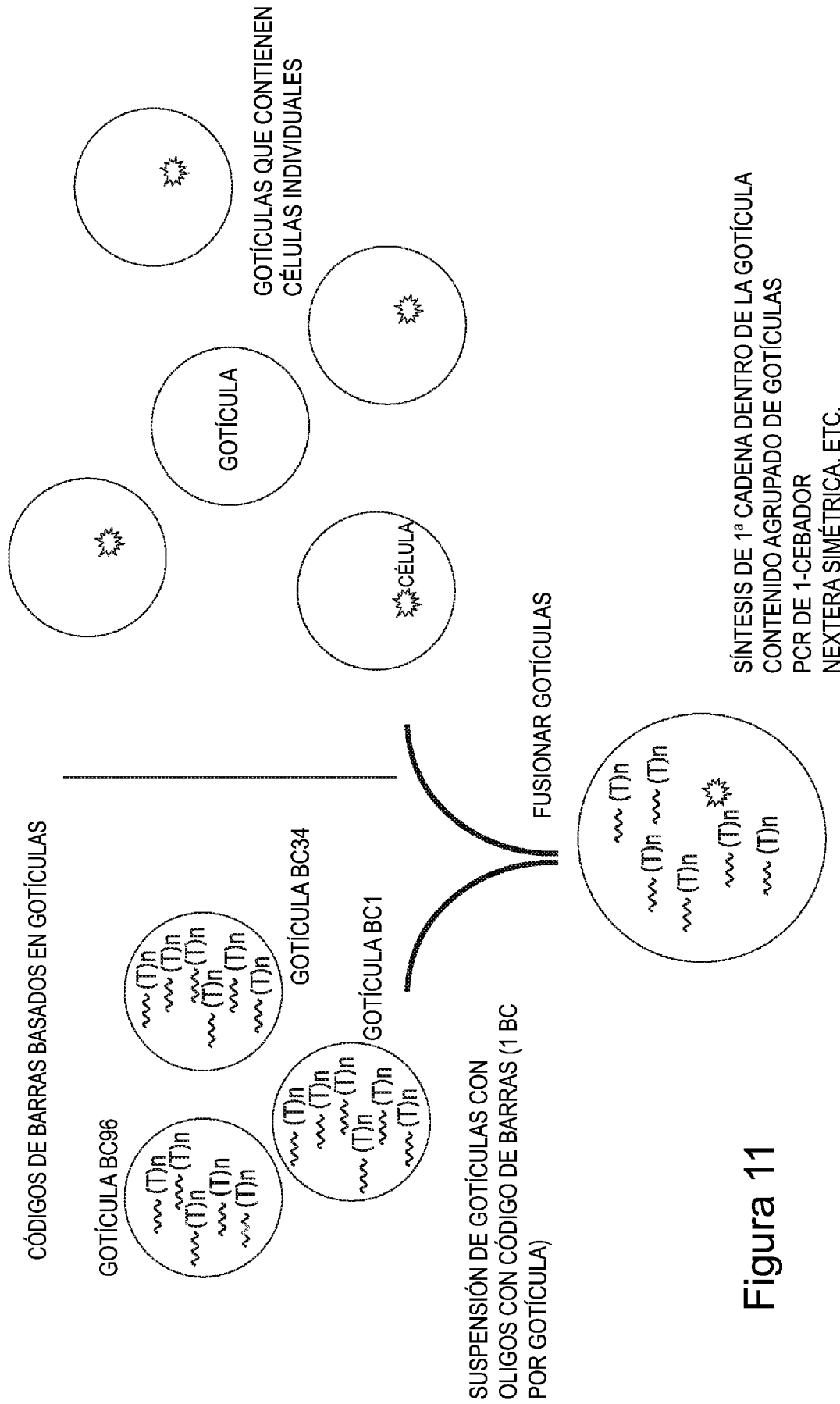


Figura 11

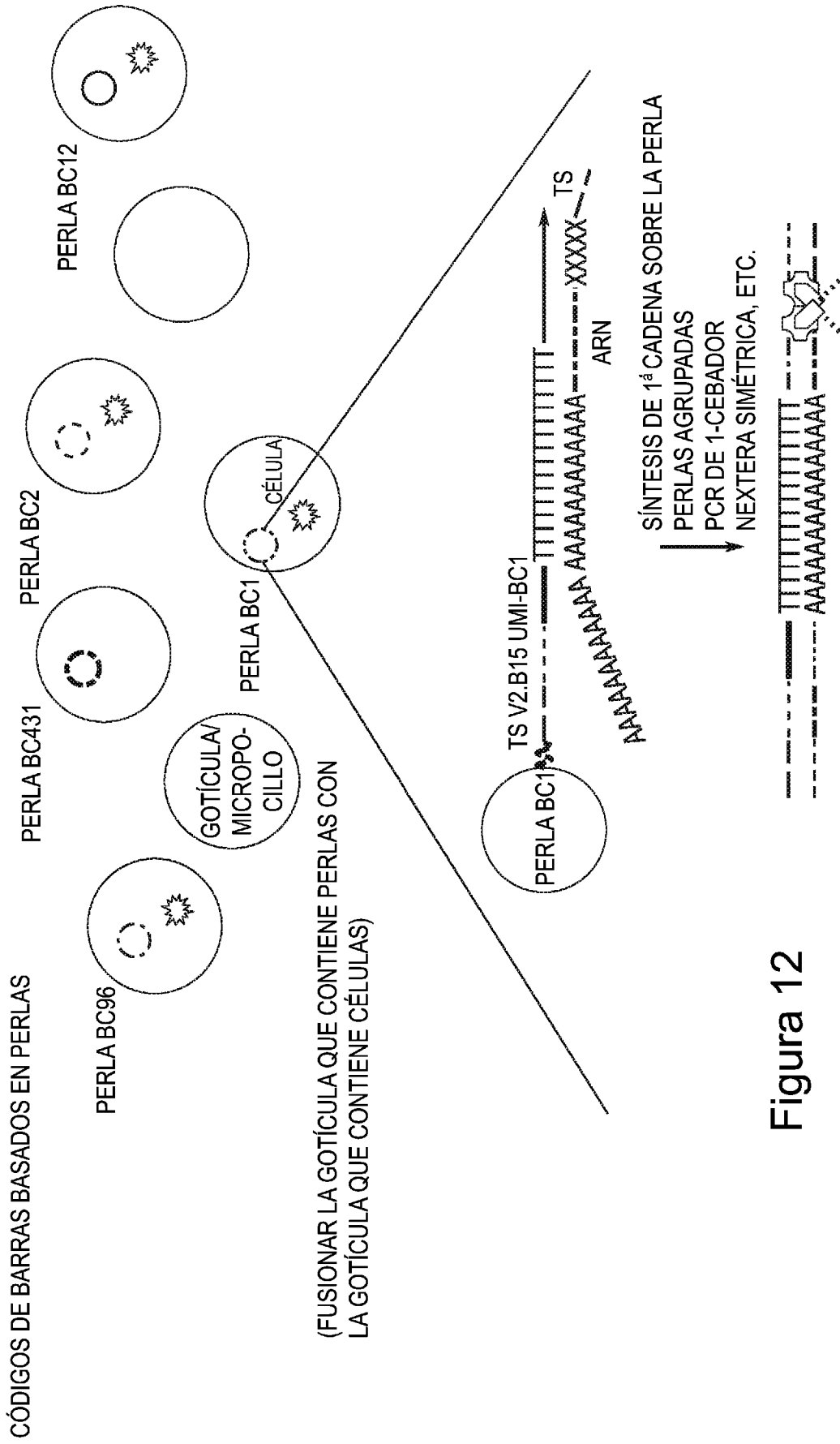


Figura 12

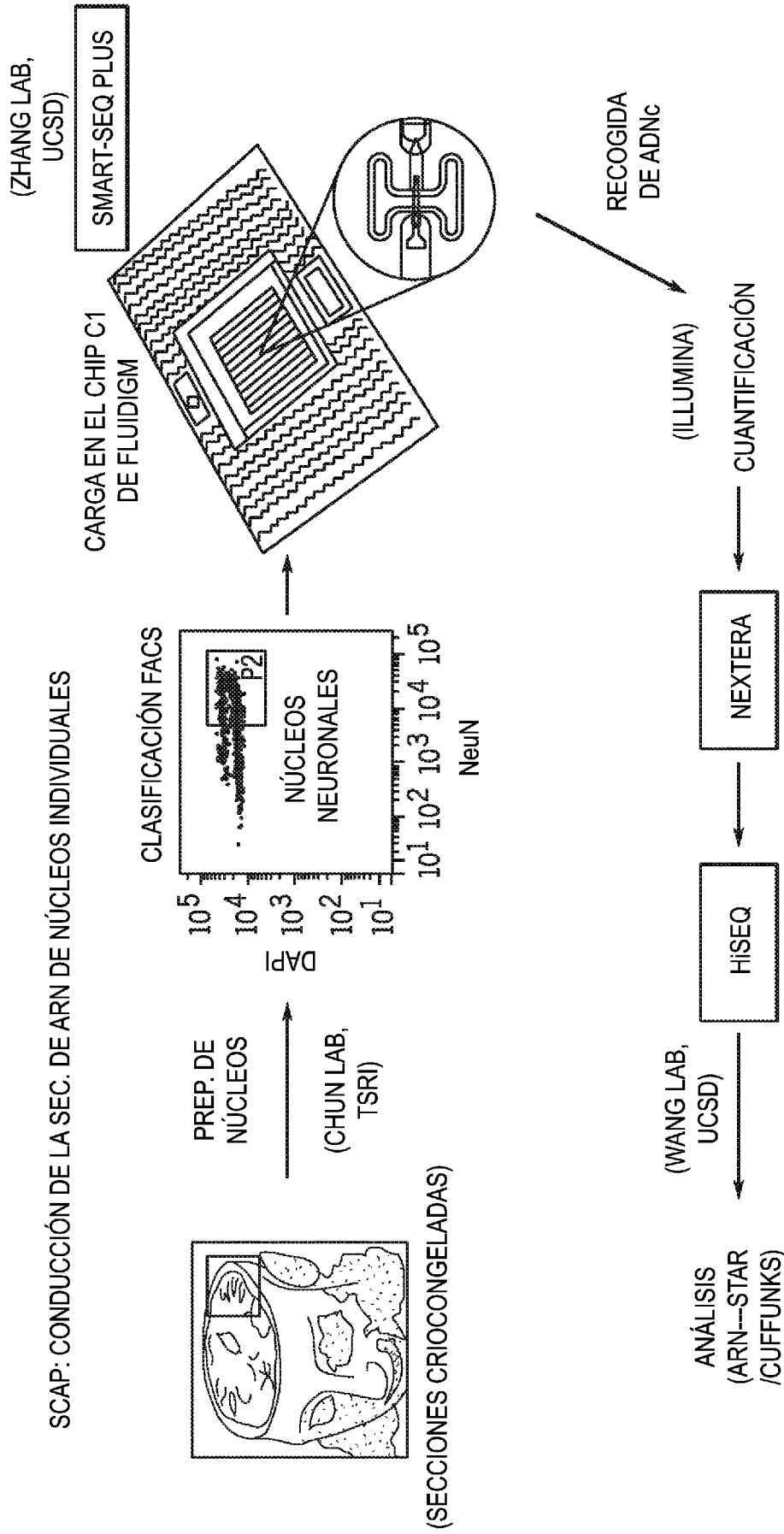


Figura 13

ADNc DE NÚCLEOS INDIVIDUALES
 VISIÓN GENERAL DEL SISTEMA C1 DE FLUIDIGM PARA LA SEC. DE ARN

- PERFILADO DE TRANSCRIPTOMA A PARTIR DE NÚCLEOS EN LUGAR DE NEURONAS COMPLETAS
- TÉCNICAMENTE DIFÍCIL AISLAR NEURONAS CON ALTO RENDIMIENTO
- CONTAMINACIÓN DE ARN PROCEDENTE DEL ARN SINÁPTICO NEURONAL ADYACENTE

-SISTEMA C1 DISEÑADO PARA VOLÚMENES DE REACCIÓN DE 96 NANOLITROS

- CARGA Y CAPTURA DE NÚCLEOS
- LAVADO, LISIS
- SÍNTESIS DE ADNc
- AMPLIFICACIÓN POR PCR
- RECOGIDA DE ADNc

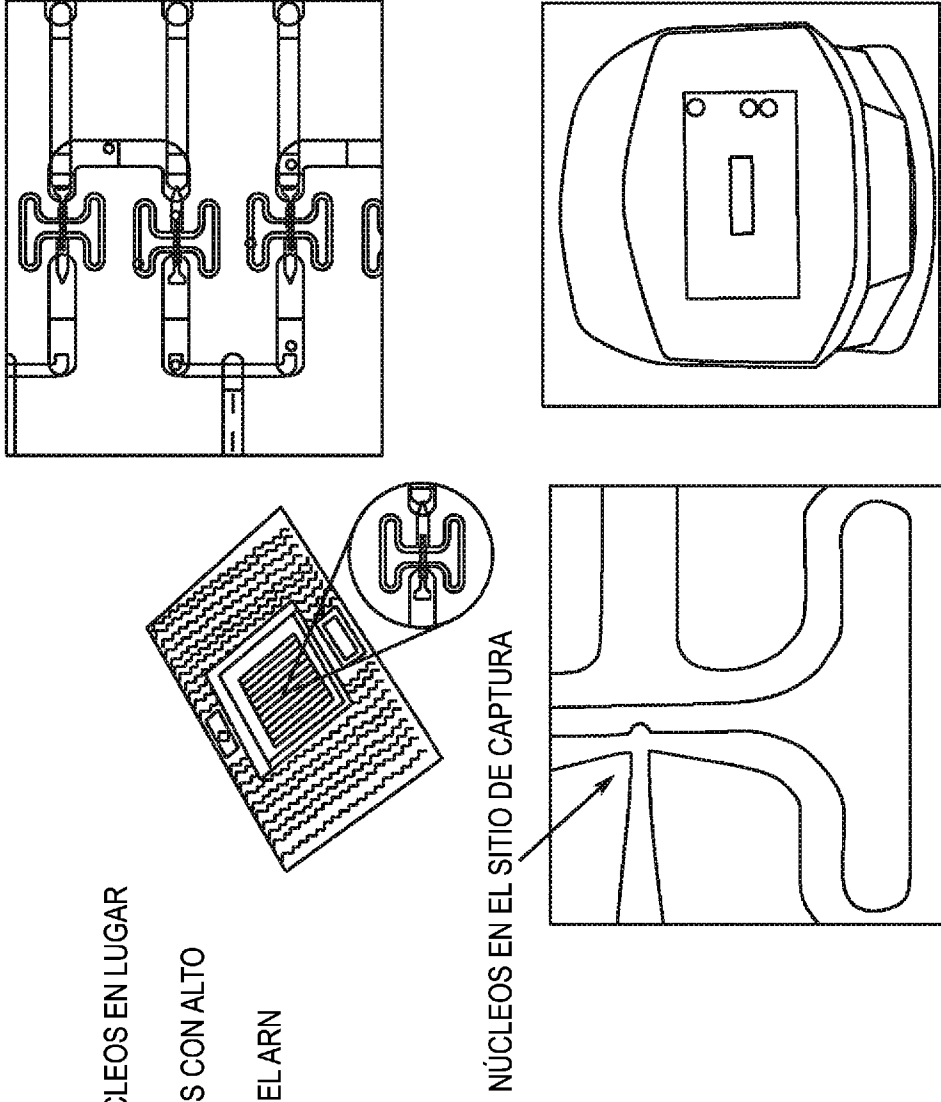
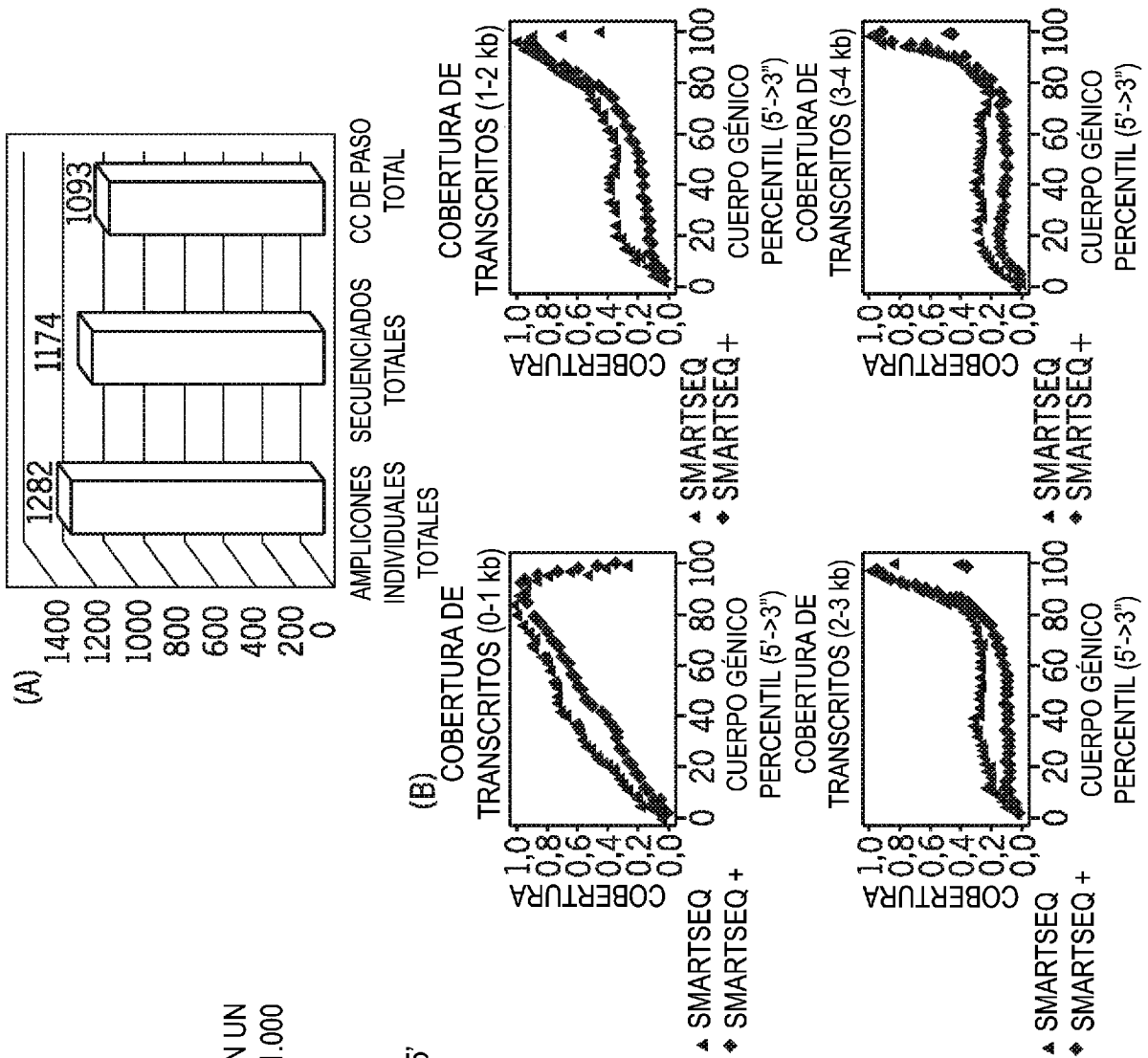


Figura 14

SMART-PLUS: MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DEL ENSAYO Y DE LA COBERTURA DEL CUERPO GÉNICO



Figura 16



VENTAJAS DE SMART-PLUS

- EL RENDIMIENTO DEL ENSAYO SE HA VALIDADO EN UN CONJUNTO DE DATOS COMPILADO A PARTIR DE >1.000 NÚCLEOS INDIVIDUALES DE ALTA CALIDAD (A)
- REPRESENTACIÓN MEJORADA DE LAS REGIONES 5' DE LOS CUERPOS GÉNICOS (B)

Figura 17

SMART-SEQ PLUS: SENSIBILIDAD DEL ENSAYO AUMENTADA

□ AUMENTO DE APROXIMADAMENTE 1,5x EN LA SENSIBILIDAD (NÚMERO DE GENES IDENTIFICADOS POR LA SEC. DE ARN) USANDO SMART-SEQ PLUS (FIGURA A)

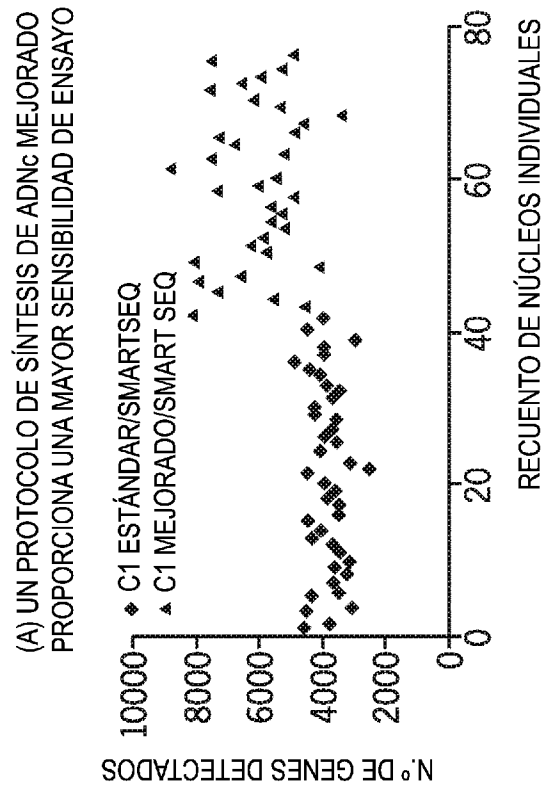


Figura 18