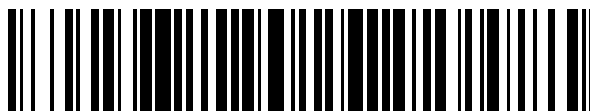


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 015**

51 Int. Cl.:
C12N 11/00 (2006.01)
C40B 40/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07754529 .1**
96 Fecha de presentación: **29.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2002019**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Artículos que tienen moléculas localizadas dispuestas sobre ellos y métodos de producción de los mismos**

30 Prioridad:
30.03.2006 US 394352

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.07.2012

73 Titular/es:
**Pacific Biosciences of California, Inc.
1380 Willow Road
Menlo Park, CA 94015, US**

72 Inventor/es:
**RANK, David R.;
WEGENER, Jeffery;
KORLACH, Jonas;
ROITMAN, Daniel;
XU, Yue;
LYLE, John;
TURNER, Stephen;
PELUSO, Paul;
OTTO, Geoff y
CICERO, Ronald L.**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

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).

ES 2 385 015 T3

DESCRIPCIÓN

Artículos que tienen moléculas localizadas dispuestas sobre ellos y métodos de producción de los mismos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos de producción de sustratos que tienen regiones químicas activas seleccionadas por empleo de elementos de los sustratos para ayudar a la localización de grupos químicos activos en regiones deseadas de sustrato.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existe una extensa gama de operaciones analíticas que pueden beneficiarse de la aptitud para analizar la reacción de moléculas individuales, números relativamente pequeños de moléculas, o moléculas a concentraciones relativamente bajas. Se han descrito varios métodos para proporcionar estas mezclas de reacción poco concentradas. Por ejemplo, en el campo de la determinación de la secuencia de los ácidos nucleicos, varios investigadores han propuesto enfoques de moléculas sencillas o de baja concentración para obtener información de secuencia en asociación con la síntesis de ácidos nucleicos dependiente del molde por la acción de enzimas polimerasa.

Los diversos enfoques diferentes para estas tecnologías de secuenciación ofrecen diferentes métodos de monitorización solamente de una o un pequeño número de reacciones de síntesis al mismo tiempo. Por ejemplo, en algunos casos, la mezcla de reacción se divide en gotitas que incluyen bajas concentraciones de sustancias reaccionantes. En otras aplicaciones, se inmovilizan ciertos reactivos sobre superficies de tal modo que los mismos pueden monitorizarse sin interferencia de otros componentes de la reacción en solución. En otro enfoque adicional, se utilizan técnicas de confinamiento óptico para establecer la información de señales únicamente de un número relativamente pequeño de reacciones, v.g. una sola molécula, dentro de un área confinada ópticamente. A pesar de la disponibilidad de las técnicas arriba descritas, existen casos en los cuales sería deseable una selectividad adicional de los componentes de la reacción para su análisis. La presente invención satisface éstas y una diversidad de necesidades.

25 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención aporta en general métodos de proporcionar modificaciones funcionales de superficies, v.g. grupos químicos activos, en regiones seleccionadas de sustratos, así como los sustratos resultantes producidos de este modo, y el uso de dichos sustratos.

De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para proporcionar un sustrato que tiene una enzima inmovilizada selectivamente sobre él, comprendiendo el método:

35 proporcionar un sustrato que tiene un primer componente de la superficie que comprende SiO₂ y un segundo componente de la superficie que comprende un metal u óxido metálico;

poner en contacto el sustrato con una primera composición que se asocia selectivamente con el primer componente de la superficie, comprendiendo dicha primera composición un silano;

40 acoplar la enzima a la primera composición; y

poner en contacto el sustrato con una segunda composición que se asocia selectivamente con el segundo componente de la superficie, comprendiendo dicha segunda composición un compuesto que comprende uno o más grupos ácido fosfónico o fosfato.

45 Las moléculas deseadas que se inmovilizan selectivamente pueden ser esencialmente moléculas cualesquiera, por ejemplo, moléculas activas tales como enzimas (v.g., polimerasas de ácido nucleico) o moléculas que comprenden restos de fijación o acoplamiento (v.g., moléculas de biotina) que pueden emplearse a su vez para inmovilizar otras moléculas.

50 Como se indica en las reivindicaciones, la presente invención proporciona métodos de inmovilización selectiva de una molécula de interés sobre un sustrato. Los métodos comprenden proporcionar un sustrato que tiene un primer componente de la superficie y un segundo componente de la superficie en donde el primer y el segundo componente de la superficie tienen características superficiales diferentes, y acoplar selectivamente la molécula de interés al primer componente de la superficie, basándose en una diferencia entre las características de superficie del primer componente de la superficie y las características de superficie del segundo componente de la superficie.

En una clase de realizaciones, las características superficiales diferentes comprenden carga superficial o interacciones electrostáticas en la superficie. Por ejemplo, el primer componente de la superficie puede tener o adquirir una carga superficial negativa y el segundo componente de la superficie una carga superficial positiva (o viceversa).

60 Como otro ejemplo, los componentes de superficie pueden tener características de quimisorción superficial diferentes; por ejemplo, el segundo componente de la superficie puede tener afinidad química fuerte para un grupo particular (v.g. grupos fosfonato o fosfato), mientras que el primer componente de la superficie no tiene afinidad fuerte para dicho grupo.

65 Los métodos pueden emplearse para inmovilizar selectivamente moléculas de interés, v.g. en un ZMW u otro sustrato híbrido. Así, por ejemplo, el sustrato comprende opcionalmente una capa del segundo componente de la superfi-

5 cie sobre una capa del primer componente de la superficie, con un guiaondas en modo cero dispuesto a través de la segunda capa de componente de la superficie hasta la capa del primer componente de la superficie. En tales realizaciones (entre otras), el primer componente de la superficie puede comprender SiO₂ y/o el segundo componente de la superficie puede comprender un metal u óxido metálico (v.g., aluminio u óxido de aluminio). En realizaciones en las cuales el sustrato híbrido está en contacto con una solución, el sustrato puede comprender un primer componente de la superficie que es un material con un punto de carga cero por debajo del pH de la solución (v.g. SiO₂ a pH > 2) y/o un segundo componente de la superficie que comprende un óxido metálico con un punto de carga cero por encima del pH de la solución (v.g. óxido de aluminio a pH < 8; otros óxidos metálicos que están cargados positivamente a pH neutro incluyen, pero sin carácter limitante, óxido de talio, óxido de hierro, óxido de itrio, óxido de cinc, óxido de lantano, y óxido de magnesio).

15 En ciertas realizaciones, la molécula de interés se asocia preferentemente al primer componente de la superficie. Por ejemplo, las moléculas de polimerasa cargadas positivamente se asocian preferentemente con silicato cargado negativamente sobre superficies metálicas cargadas positivamente. En otras realizaciones, el sustrato está en contacto con una primera composición que se asocia selectivamente con el primer componente de la superficie basándose en la diferencia entre las características de superficie de los componentes de superficie primero y segundo. La primera composición puede servir para una función de bloqueo, o puede asociarse, directa o indirectamente, con la molécula de interés. Así, por ejemplo, en una clase de realizaciones, la primera composición comprende un primer grupo de acoplamiento, y el acoplamiento selectivo de la molécula de interés al primer componente de la superficie comprende el acoplamiento de la molécula de interés al primer grupo de acoplamiento (v.g., un grupo funcional químico, un grupo de fijación tal como biotina, o análogos).

25 En una clase de realizaciones, la primera composición comprende un silano, v.g., para asociación selectiva con un primer componente de la superficie de silicato. Silanos ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, biotina-PEG-silanos. En otra clase de realizaciones, la primera composición comprende un fosfolípido. En otra clase adicional de realizaciones, la primera composición comprende polilisina-PEG o polilisina-PEG-biotina.

30 Los métodos incluyen opcionalmente poner en contacto el sustrato con una segunda composición que se asocia selectivamente con el segundo componente de la superficie basándose en la diferencia entre las características de superficie de los componentes de superficie primero y segundo. El tratamiento con la segunda composición se realiza opcionalmente antes o después del acoplamiento de la molécula de interés al primer componente de la superficie, incluyendo antes o después del tratamiento con cualquier primera composición. En algunas realizaciones, la segunda composición comprende un segundo grupo de acoplamiento, típicamente diferente de cualquier primer grupo de acoplamiento. Segundas composiciones ilustrativas incluyen, v.g., polielectrólitos y copolímeros polielectrólito-PEG. El método incluye opcionalmente depositar una multicapa de polielectrólito sobre el segundo componente de la superficie.

40 Segundas composiciones ilustrativas adicionales incluyen compuestos que comprenden uno o más grupos ácido fosfónico o uno o más grupos fosfato. Por ejemplo, la segunda composición puede comprender ácido polivinilfosfónico; ácido 2-carboxietil-fosfónico; ácido amino tri(metilenofosfónico); ácido 1-hidroxi-etilideno-1,1-difosfónico; ácido hexametilenodiaminatetra(metilenofosfónico); ácido dietilenotriaminapenta(metilenofosfónico); ácido etilenodiaminatetra(metilenofosfónico); ácido bis(hexametileno-triaminapenta(metilenofosfónico)); ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico; o monoetanolamina-difosfonato. Como ejemplos adicionales, la segunda composición puede comprender un alquilfosfato o un alquilfosfonato, tal como ácido octil-fosfónico, ácido decil-fosfónico, ácido dodecil-fosfónico, ácido hexadecil-fosfónico, ácido octadecil-fosfónico, ácido docosil-fosfónico, ácido hidroxi-dodecil-fosfónico, ácido hidroxi-undecenil-fosfónico, ácido decanodilbis(fosfónico), dodecilsfosfato, o hidroxi-dodecilsfosfato.

50 Los dos componentes de superficie pueden modificarse diferencialmente por composiciones diferentes. Así, en una clase de realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto un sustrato con una primera composición que se asocia selectivamente con el primer componente de la superficie y acoplar la molécula de interés a la primera composición para acoplar selectivamente la molécula de interés al primer componente de la superficie, y poner en contacto el sustrato con una segunda composición que se asocia selectivamente con el segundo componente de la superficie (antes o después del acoplamiento de la molécula de interés o deposición de la primera composición).

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una ilustración esquemática de un Guiaondas en modo cero (ZMW) en aplicación.

60 La Figura 2 proporciona una ilustración esquemática de un proceso de activación de superficies de la invención dirigido por la luz.

La Figura 3 proporciona una ilustración esquemática de un proceso para proporcionar superficies activas en porciones ópticamente relevantes de confinamientos ópticos como ZMWs.

65 La Figura 4 proporciona una gráfica simulada del nivel de activación de superficie en función de la distancia desde la superficie inferior de un ZMW en dos etapas de activación separadas.

- La Figura 5 proporciona una ilustración esquemática de una estrategia alternativa de activación por la luz que utiliza un proceso de dos pasos de activación.
- 5 La Figura 6 proporciona una ilustración esquemática de un proceso limitado por difusión para proporcionar superficies activas dentro de estructuras confinadas.
- La Figura 7 proporciona una ilustración de proceso para proporcionar una capa de enmascaramiento impresa sobre superficies no relevantes de sustratos.
- 10 La Figura 8 ilustra esquemáticamente un proceso de fotodisociación para eliminar grupos activos de porciones no relevantes de superficies de sustrato.
- La Figura 9 ilustra un proceso basado en partículas excluidas por tamaño para eliminar moléculas de interés en porciones no relevantes de superficies de sustrato.
- 15 La Figura 10 ilustra la inmovilización selectiva de moléculas de interés utilizando un sistema excitado eléctricamente.
- La Figura 11 ilustra esquemáticamente un proceso para retirada de moléculas de superficies no relevantes de sustratos que utiliza una matriz de arrastre seguido por una técnica de levantamiento.
- 20 La Figura 12 ilustra los efectos de procesos de inmovilización selectiva de la invención y particularmente la utilización de un proceso de partículas excluidas por tamaño.
- La Figura 13 ilustra esquemáticamente un proceso para localización selectiva de moléculas utilizando un proceso exclusivo alternativo.
- 25 La Figura 14 ilustra esquemáticamente un proceso ilustrativo para localización selectiva de moléculas utilizando un proceso exclusivo en el cual un componente de desactivación de acción específica retira la molécula de interés del sustrato.
- 30 La Figura 15 ilustra esquemáticamente un proceso ilustrativo para localización selectiva de moléculas utilizando un proceso exclusivo en el cual un componente de desactivación de acción específica separa un resto de acoplamiento del sustrato.
- 35 La Figura 16 ilustra esquemáticamente la inmovilización selectiva de moléculas de interés por aprovechamiento de las características superficiales diferentes de distintos materiales en sustratos híbridos como ZMWs y pasivación con un copolímero PE-PEG.
- La Figura 17 ilustra esquemáticamente la formación de una multicapa de polielectrólito.
- 40 La Figura 18 ilustra esquemáticamente la inmovilización selectiva de moléculas de interés por aprovechamiento de las características superficiales diferentes de distintos materiales en sustratos híbridos como ZMWs y pasivación con una multicapa de polielectrólito.
- 45 La Figura 19 ilustra la fijación de análogos de nucleótidos a una superficie tratada con multicapa de polielectrólito frente a una superficie tratada con plasma-PDMS (tratada no polarizada).
- La Figura 20 ilustra la fijación de una polimerasa a una superficie tratada con multicapa de polielectrólito frente a una superficie de aluminio sin tratar.
- 50 La Figura 21 ilustra los efectos de procesos de inmovilización selectiva de la invención y particularmente la utilización de un proceso de silanización selectiva y pasivación con multicapa de polielectrólito.
- La Figura 22 ilustra los efectos de procesos de inmovilización selectiva de la invención y particularmente la utilización de un proceso de silanización selectiva y pasivación con multicapa de polielectrólito.
- 55 La Figura 23 ilustra la fijación de perlas fluorescentes recubiertas de neutravidina a un ZMW tratado con fosfonato frente a un ZMW sin tratar.
- 60 La Figura 24 ilustra la fijación de análogos de nucleótidos a un ZMW tratado con fosfonato frente a un ZMW sin tratar.
- Las figuras esquemáticas no están dibujadas necesariamente a escala.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Descripción General de la Invención

La presente invención está dirigida generalmente a métodos y procesos para proporcionar moléculas deseadas en localizaciones o áreas preseleccionadas sobre un sustrato o dentro de un volumen fijado, y artículos fabricados por dichos métodos o procesos, y particularmente, en concentraciones bajas deseadas o como moléculas individuales, dentro de un confinamiento óptico. En aspectos particularmente preferidos, la invención está dirigida a métodos para localizar moléculas individuales dentro de un espacio o volumen particular, de tal modo que la individualidad espacial de la molécula puede ser aprovechada, v.g. químicamente, ópticamente, eléctricamente, o por métodos análogos. La invención proporciona también los sustratos, dispositivos, receptáculos y análogos, v.g., los confinamientos ópticos, producidos por estos procesos. Si bien los procesos de la invención pueden practicarse en líneas generales para proporcionar moléculas individuales dentro de cualquiera de una diversidad de tipos deseados dados de espacio o volumen, en aspectos particularmente preferidos, los procesos se utilizan para depositar o inmovilizar selectivamente una molécula deseada, tal como una enzima, dentro de la porción ópticamente accesible de un confinamiento óptico, y en particular, un guiaondas en modo cero (ZMW).

En general, los confinamientos ópticos se utilizan para proporcionar radiación electromagnética a o desviar dicha radiación sólo de espacios o volúmenes muy pequeños. Tales confinamientos ópticos pueden comprender confinamientos estructurales, v.g. pocillos, rebajos, conductos, o análogos, o pueden comprender procesos ópticos en asociación con otros componentes, a fin de proporcionar iluminación a o desviar la radiación emitida sólo de volúmenes muy pequeños. Ejemplos de tales confinamientos ópticos incluyen sistemas que utilizan, v.g., sistemas ópticos basados en reflexión total interna (TIR) en los cuales la luz se dirige a través de un sustrato transparente en un ángulo que produce reflexión total interna dentro del sustrato. A pesar de la TIR, cierta fracción pequeña de la luz penetrará más allá de la superficie externa del sustrato y decaerá rápidamente en función de la distancia desde la superficie del sustrato, dando como resultado iluminación de volúmenes muy pequeños en la superficie. Análogamente, pueden emplearse estructuras ZMW que utilizan un núcleo estrecho, v.g., de 10 a 100 nm, dispuestos a través de una capa de revestimiento en la cual el núcleo está dimensionado de tal manera que se impide que la radiación electromagnética deseada se vea impedida de propagarse a través del núcleo. Como resultado, la radiación atravesará el núcleo solamente en una distancia muy corta desde la abertura del núcleo, y por consiguiente iluminará sólo un volumen muy pequeño en el interior del núcleo. Se contemplan una diversidad de otras técnicas de confinamiento óptico, que incluyen, v.g., intensificación de campo por puntas metálicas agudas, confinamiento en nanotubos, confinamiento en hendidura estrecha, confinamiento por transferencia de energía resonante en campo próximo, confinamiento de apertura en campo próximo, confinamiento óptico limitado por difracción, y confinamiento de agotamiento de emisión estimulada, así como todos los restantes confinamientos descritos en los documentos US. Núms. de Serie 10/944.106 y 09/572.530, en tramitación, y en la Patente U.S. No. 6.917.726.

Los guiaondas en modo cero (ZMWs) se caracterizan generalmente por la existencia de un núcleo rodeado por un revestimiento, donde el núcleo está dimensionado de tal modo que impide la propagación a través del núcleo de una cantidad sustancial de radiación electromagnética que está por encima de una frecuencia límite. Como resultado, cuando se ilumina con luz de una frecuencia inferior a la frecuencia límite, la luz penetrará sólo una distancia corta en el interior del núcleo, iluminando eficazmente sólo una pequeña fracción del volumen del núcleo. De acuerdo con la presente invención, el núcleo comprende una cavidad vacía o preferiblemente llena de fluido rodeada por la capa de revestimiento. Este núcleo proporciona una forma o volumen en el cual puede tener lugar una reacción química, bioquímica, y/o biológica que se caracteriza por tener un volumen extremadamente pequeño, y en algunos casos suficiente para incluir únicamente una sola molécula o conjunto de moléculas reaccionantes. ZMWs, su fabricación, estructura, y uso en operaciones analíticas se describen en detalle en la patente U.S. No. 6.917.726 y en Levene, et al., Science 299 (5607):609-764 (2003).

En el contexto de los análisis químicos o bioquímicos dentro de ZMWs así como en otros confinamientos ópticos, es claramente deseable asegurarse de que las reacciones de interés están teniendo lugar dentro de las porciones ópticamente investigadas del confinamiento, en un mínimo, y preferiblemente de tal modo que está ocurriendo solamente una reacción simple dentro de una porción investigada de un confinamiento individual. En líneas generales, pueden utilizarse varios métodos para proporcionar moléculas individuales dentro del volumen de observación. Una diversidad de éstos se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/240.662, también en tramitación, presentada el 30 de septiembre de 2005, que describe, entre otras cosas, superficies modificadas que están diseñadas para inmovilizar moléculas individuales en la superficie con una densidad deseada, de tal modo que aproximadamente una, dos, tres o algún otro número seleccionado de moléculas podría esperarse que cayeran dentro de un volumen de observación dado. Típicamente, tales métodos utilizan técnicas de dilución para proporcionar densidades relativamente bajas de grupos de acoplamiento en una superficie, sea por dilución de tales grupos en la superficie o dilución de grupos de acoplamiento intermedios o finales que interaccionan con las moléculas de interés, o combinaciones de éstas.

En algunos casos, puede ser adicionalmente deseable que las reacciones de interés se reduzcan o incluso se eliminen de otras regiones fuera del volumen de observación, v.g., sobre el sustrato global que aloja los ZMWs, la capa de revestimiento, etc, tanto dentro como fuera del volumen de observación. En particular, las reacciones que están fuera del campo de investigación pueden, sin embargo, impactar en la reacción de interés o la monitorización de

dicha reacción, por afectar a la cinética de reacción debido al agotamiento de los reactivos, aumento de la concentración de los productos, contribución a niveles de ruido de fondo de la señal, v.g., por la generación de productos o consumo de sustancias reaccionantes, que pueden interferir con la reacción investigada o que proporcionan niveles detectables excesivos de producto de fondo que se difunden al interior y al exterior del volumen de investigación del guiaondas. De acuerdo con ello, la deposición y/o inmovilización selectiva y preferencial de los componentes de reacción dentro del volumen de observación son ventajas particulares de la invención. Éstas son practicables generalmente tanto como alternativa a y, preferiblemente, además de los métodos de deposición de baja densidad a los que se ha hecho referencia anteriormente. En el contexto de lo anterior, las moléculas de interés pueden describirse como estando localizadas preferentemente en una región particular, o localizadas sustancialmente en una región dada. Se apreciará que el uso del término preferentemente tiene por objeto indicar que la molécula está localizada a una localización dada en una concentración o densidad superficial que excede de la de otras localizaciones en las cuales aquélla no está localizada preferencialmente. Así pues, la inmovilización preferencial de una molécula dada en una primera región significará que la molécula está presente en dicha región en una densidad o concentración mayor que en otras regiones. La densidad en tales regiones puede ser tanto como 20% mayor, 30% mayor, 50% mayor, 100% mayor, o superior a 200%, hasta 1000% o más de la concentración o densidad en otras regiones, y en algunos casos 100 veces mayor, 1000 veces mayor o más. Un significado similar es aplicable en general a las indicaciones de que una molécula dada está localizada de modo sustancialmente exclusivo en una región dada.

En el caso de, por ejemplo, los ZMWs utilizados para análisis enzimático de moléculas individuales, puede ser deseable proporcionar una sola molécula enzimática dentro del volumen de iluminación de un guiaondas, y preferiblemente por encima de la superficie del fondo o base del guiaondas. Como se ha indicado arriba, puede ser por consiguiente deseable adicionalmente asegurarse de que moléculas de enzima adicionales no están presentes sobre superficies distintas de la superficie del fondo, v.g., las paredes del núcleo y/o las superficies de la capa de revestimiento que no forman parte del núcleo, y análogas.

Una aplicación particularmente valiosa de los sustratos producidos por el proceso de la invención es en los procesos denominados "aplicaciones de secuenciación de una sola molécula". A modo de ejemplo, un complejo de un ácido nucleico molde, una secuencia iniciadora y una enzima polimerasa pueden monitorizarse, sobre la base de una sola molécula, para observar la incorporación de cada nucleótido adicional durante la síntesis dependiente del molde de la cadena naciente. Por identificación de cada base añadida, puede identificarse la base complementaria en el molde, e interpretar así la información de secuencia para dicho molde. En el contexto de los ZMWs, puede proporcionarse un complejo individual polimerasa/molde/iniciador dentro del volumen de observación del ZMW. A medida que cada uno de cuatro nucleótidos o análogos de nucleótidos marcados (v.g., fluorescentes) se incorpora en la cadena que se está sintetizando, la presencia prolongada del marcador en dichos nucleótidos o análogos de nucleótidos podrá ser observada por un sistema de detección óptica asociado. Tales procesos de secuenciación y sistemas de detección se describen en, v.g., la Solicitud de Patente U.S. Publicada No. 2003/0044.781 y la Solicitud de Patente U.S. No 11/201.768, en tramitación, presentada el 11 de agosto de 2005. Se considera que tales aplicaciones de secuenciación de moléculas individuales se verán beneficiadas por los métodos descritos en esta memoria, por la inmovilización seleccionada de polimerasas, moldes o iniciadores o complejos de cualquiera o la totalidad de éstos, preferentemente dentro de regiones seleccionadas de un sustrato, y/o sustancialmente no en otras porciones del sustrato.

En general, la provisión selectiva de una molécula de interés en una localización dada, v.g., en el volumen de iluminación dentro de un ZMW, puede realizarse utilizando procesos aditivos o sustractivos. Por proceso aditivo, se entiende generalmente que la molécula individual se coloca o se deposita en la localización deseada y no en otro lugar. En contraste, los procesos sustractivos denotan la deposición de la molécula de interés más ubicuamente y de modo no selectivo, v.g., sobre una superficie de sustrato entera, seguido por la eliminación seleccionada de la molécula de interés de las localizaciones no deseadas. Si bien estas descripciones resultan convenientes para describir diversos procesos, se apreciará que el resultado de un proceso puede ser indistinguible del resultado del otro proceso. Se apreciará también que muchos procesos pueden incluir pasos que pueden describirse como aditivos, sustractivos, o de ambos tipos. Aunque se describe generalmente en términos de localización de enzimas u otros grupos macromoleculares, para los propósitos de la presente invención, la molécula de interés puede ser cualquiera de una diversidad de moléculas funcionales diferentes para las cuales se desea proporcionar individualidad espacial o localización mejorada. Tales grupos incluyen moléculas activas, tales como moléculas catalíticas como enzimas, pero incluyen también moléculas con funcionalidad más pasiva, v.g., grupos no catalíticos, tales como grupos de fijación o acoplamiento, grupos hidrófobos o hidrófilos, grupos de mejora estructural, v.g., para promoción de la adhesión, grupos activables o desactivables, o análogos. Los grupos de fijación o acoplamiento pueden incluir grupos de acoplamiento de moléculas pequeñas o pueden incluir grupos de acoplamiento macromoleculares, v.g., anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, pares de fijación específicos, tales como avidina/biotina, péptidos de fijación, lectinas, ácidos nucleicos complementarios, o cualquiera de una diversidad de otros grupos de fijación. Las moléculas catalíticamente activas incluirán típicamente cualquier molécula catalíticamente activa para la cual se desea individualidad espacial, v.g., con objeto de aprovechamiento en análisis de moléculas simples, o análogos.

En al menos un aspecto, la presente invención está dirigida a proporcionar aislamiento intensificado de regiones discretas de reacción y/u observación. Esto no es solamente para proporcionar aislamiento óptico entre tales regiones, sino también para proporcionar aislamiento químico y/o ambiental de tales regiones. En un sentido general,

esto se realiza proporcionando una barrera o zona entre las regiones de reacción y/u observación que impide sustancialmente que sustancias reaccionantes y/o productos existentes fuera de una zona de reacción particular y que los mismos entren por difusión e interfieran potencialmente con la reacción que tiene lugar en ella, o con la observación de dicha reacción. En cuanto al suministro del aislamiento requerido, puede concentrarse la atención en uno o ambos de los aspectos siguientes: (1) proporcionar suficiente separación/aislamiento entre regiones próximas de reacción/observación; y (2) eliminar cualesquiera componentes que puedan interferir potencialmente en los espacios comprendidos entre dichas regiones próximas, v.g., eliminando por aclaramiento cualesquiera sustancias reaccionantes, productos y/o enzimas de dichos espacios, y creando un tipo de "zona desmilitarizada" entre las regiones de observación.

La expresión "proporcionar aislamiento mejorado" se refiere en general al aporte de una barrera de cierto tipo entre las regiones de observación. En general, tales barreras pueden incluir simplemente una distancia suficiente en un sistema fluido de tal modo que las sustancias reaccionantes y los productos no pueden difundirse desde una reacción a una región de observación particular, tanto si la reacción tiene lugar en una región de observación próxima como si está localizada en cualquier otro lugar. Es posible proporcionar dicha distancia a través de un sustrato planar, o bien puede aumentarse la distancia de difusión eficaz proporcionando una superficie estructurada o contorneada sobre el sustrato. Por ejemplo, en aspectos particularmente preferidos, es posible proporcionar regiones discretas de reacción/observación dentro de pocillos de dimensiones nanométricas para aumentar eficazmente la distancia entre tales regiones, así como tratar o producir de cualquier otro modo dichos sustratos, a fin de reducir o eliminar la probabilidad de que cualesquiera sustancias reaccionantes y/o productos puedan existir o se generen en el espacio o las regiones comprendidas entre las regiones seleccionadas, v.g., superficies distintas de aquéllas que se encuentran en o cerca de la superficie del fondo de los pocillos de dimensiones nanométricas.

II. Procesos Aditivos

Como se ha indicado arriba, en al menos un aspecto, se emplea un proceso aditivo para proporcionar las moléculas inmovilizadas deseadas de la invención. Los procesos aditivos están basados típicamente en la provisión selectiva de grupos de fijación o acoplamiento en la localización deseada, seguida por la deposición de las moléculas de interés. Esta deposición puede, de nuevo, ser el resultado de procesos aditivos o sustractivos.

En al menos un primer aspecto, los procesos aditivos de la invención incluyen típicamente la deposición de un grupo de acoplamiento sobre la superficie del sustrato que fija selectivamente la molécula de interés sólo dentro de la región deseada en la superficie, v.g., dentro del área de observación de un confinamiento óptico tal como un ZMW. El acoplamiento de grupos funcionales, con inclusión de grupos funcionales activables, a superficies puede llevarse a cabo generalmente por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el contexto de los sustratos basados en sílice, v.g., vidrio, cuarzo, sílice fundida, silicio, o análogos, pueden utilizarse químicas de silanos bien caracterizadas para acoplar otros grupos a la superficie. Tales otros grupos pueden incluir grupos funcionales, grupos activables, y/o moléculas enlazadoras a cualquiera de los anteriores, o bien las moléculas de interés reales que están destinadas a ser utilizadas en la aplicación final de la superficie. En el contexto de otros tipos de sustrato, v.g., materiales polímeros, metales o análogos, pueden emplearse otros procesos, v.g., la utilización de superficies híbridas de polímero que tienen grupos funcionales acoplados a las mismas o que se extienden desde la superficie del polímero utilizando, v.g., copolímeros con grupos funcionales acoplados a ellos, grupos asociativos de metales, a saber, formadores de quelatos, tioles, o análogos.

En al menos un primer aspecto de la invención, el aporte de acoplamiento de una molécula de interés sólo dentro de un área o región deseada se realiza típicamente proporcionando un grupo de acoplamiento activable acoplado a la superficie del sustrato global que es activada selectivamente sólo dentro de la región deseada, o por utilización de un grupo de acoplamiento selectivamente desactivable y desactivación selectiva del mismo en todas las regiones excepto en la región deseada. El aporte selectivo de grupos de acoplamiento activos únicamente donde se desea permite la deposición y acoplamiento selectivos de la molécula de interés sustancialmente sólo en las regiones deseadas. Para facilidad de exposición, se hace referencia en esta memoria a la porción de una superficie o sustrato en la cual se desea proporcionar selectivamente moléculas de interés para una aplicación dada como las "regiones deseadas", mientras que se hace referencia a las regiones que quedan fuera de estas regiones como las regiones no deseadas. Tales regiones deseadas y no deseadas pueden incluir superficies planares o pueden comprender estructuras tridimensionales tales como pocillos, rebajos, irregularidades superficiales, salientes, pilares, fosos, depresiones, canales, capilares, materiales porosos, o análogos.

Una diversidad de grupos de acoplamiento activables diferentes pueden utilizarse en asociación con este aspecto de la invención. Típicamente, tales grupos incluyen grupos de acoplamiento que están obturados o bloqueados con un grupo selectivamente eliminable. Éstos incluyen grupos que se alteran térmicamente, v.g. grupos protectores termolábiles, grupos alterados químicamente, v.g. grupos protectores lábiles en medio ácido o básico, y grupos fotoalterables, v.g. grupos protectores fotoescindibles o fotoeliminables.

La desactivación de grupos de acoplamiento, v.g., en regiones no deseadas, puede comprender el uso de grupos que pueden ser desactivados directamente de modo selectivo, v.g., por el uso de métodos químicos, térmicos, o de química fotoinducida, que obturan o dan como resultado la eliminación de grupos funcionales, a saber, por reticulación fotoinducida, fotodisociación, o procesos análogos. Alternativamente, y en ciertos aspectos preferidos, tales

métodos de desactivación utilizan activación selectiva del grupo de acoplamiento en las regiones no deseadas, seguido por bloqueo u obturación del grupo de acoplamiento activo resultante con un grupo de bloqueo neutro o inerte, v.g., un grupo que es sustancialmente incapaz de acoplarse a la molécula de interés, o una molécula enlazadora intermedia, en condiciones de acoplamiento aplicadas subsiguientemente para acoplar tales grupos a las regiones deseadas. Este grupo de bloqueo añadido subsiguientemente puede ser irreversible o reversible. Sin embargo, la reversibilidad de dicha obturación, en su caso, implicará típicamente un mecanismo distinto del mecanismo del grupo de acoplamiento activable subyacente, a fin de evitar la reactivación de grupos obturados en las regiones no deseadas, mientras que se activan los grupos activables subyacentes en las regiones deseadas. Por ejemplo, en los casos en que se emplea una estrategia de fotoactivación para activar selectivamente grupos en las regiones deseadas, los grupos de obturación aplicados a las regiones no deseadas serán típicamente no fotoactivables o serán activados de otro modo por cualesquiera condiciones a las que se vea expuesta la superficie durante su aplicación.

A continuación de la obturación de los grupos de acoplamiento en las regiones no deseadas, los grupos de acoplamiento dentro de las regiones deseadas, o área de interés, pueden ser selectivamente activados y acoplados con la molécula de interés. Para facilidad de exposición, tanto si la fotoactivación implica fotodisociación de un grupo de bloqueo, o si la fotoactivación por alteración de una estructura química sin eliminación de un grupo de bloqueo mayor, per se, v.g., da como resultado grupos modificados o adición de otros grupos, se hará referencia generalmente a ello en esta memoria como activación, v.g. fotoactivación.

En al menos un aspecto particularmente preferido, se utilizan grupos de acoplamiento fotoactivables para depositar selectivamente moléculas de interés en regiones deseadas, v.g., utilizando grupos de acoplamiento típicamente activos que están obturados con grupos protectores fotolábiles. Tales mecanismos de acoplamiento fotoactivables son particularmente útiles para sistemas que emplean confinamientos ópticos de tal modo que la luz, tanto para la observación de una reacción última de interés como para activación del grupo de acoplamiento es capaz únicamente de iluminar la región deseada, v.g., aquellas regiones de un ZMW más próximas a la abertura del núcleo a través la cual se ilumina el mismo. En particular, dado que la luz activadora dirigida a un ZMW iluminará solamente un volumen restringido, v.g. el volumen de iluminación, las moléculas de interés se acoplarán con carácter selectivo sustancialmente sólo dentro del volumen de iluminación. Dicho de otro modo, el mismo efecto de confinamiento óptico utilizado para monitorizar únicamente las reacciones dentro del pequeño volumen confinado del volumen de iluminación (que con carácter típico define sustancialmente el volumen de observación en las operaciones analíticas aplicables a las cuales se aplica el ZMW), permite análogamente sólo la activación (y el acoplamiento subsiguiente) dentro del mismo volumen o porción confinado del ZMW. Como se apreciará, por modulación de la radiación activadora puede controlarse ulteriormente el volumen de iluminación durante la activación de modo que sea un volumen más pequeño que el volumen de iluminación durante la aplicación. En particular, por aplicación de una iluminación de menor potencia, utilizando una mayor longitud de onda de la luz de activación que la luz de iluminación/investigación, es posible iluminar, activar y por consiguiente acoplar moléculas de interés solamente a un subconjunto de la superficie que se encontrará últimamente dentro del volumen de iluminación en la aplicación final.

Para algunos de los aspectos específicos de la invención, se prefiere generalmente utilizar un sustrato que proporciona la dirección selectiva de la radiación electromagnética a regiones deseadas, tanto en términos de la aplicación final de dicho sustrato, v.g., en reacciones de investigación químicas, bioquímicas y/o biológicas sobre tales sustratos, y en el aporte de superficies activadas selectivamente para inmovilización selectiva de moléculas de interés en dichas regiones para aprovechamiento durante tales análisis. En suma, se adopta una función básica del sustrato que se utiliza en su aplicación final, y se aprovecha dicha función para mejorar la fabricación y el procesamiento de dicho sustrato para tal aplicación. En el contexto del direccionamiento de la radiación, un sustrato que se utiliza para enfocar la radiación en regiones deseadas para investigación de reacciones dentro de dichas regiones, se procesa utilizando las mismas propiedades de direccionamiento de la radiación para funcionalizar selectivamente tales regiones deseadas.

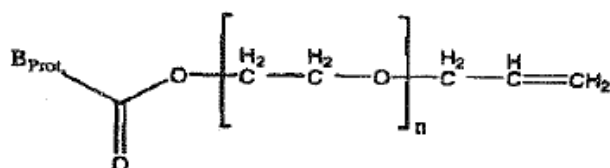
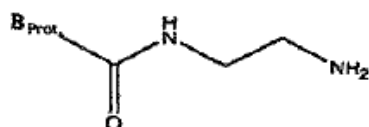
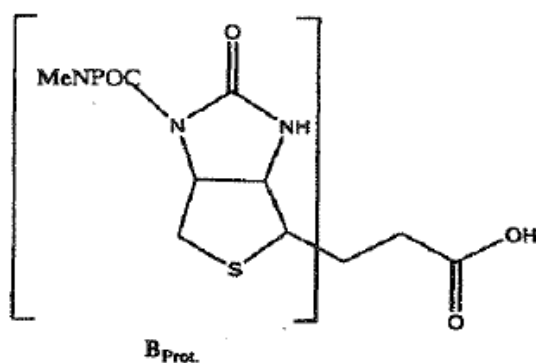
Una diversidad de grupos de acoplamiento diferentes pueden utilizarse en este contexto, dependiendo de la naturaleza de la molécula de interés a depositar subsiguientemente sobre el sustrato y acoplarse al mismo. Por ejemplo, los grupos de acoplamiento pueden incluir restos químicos funcionales, tales como grupos amina, grupos carboxilo, grupos hidroxilo, grupos sulfhidrilo, metales, formadores de quelatos, y análogos. Alternativa o adicionalmente, aquéllos pueden incluir elementos de fijación específicos, tales como biotina, avidina, estreptavidina, neutravidina, lectinas, SNAP-tags™ o sustratos para los mismos (Covalys Biosciences AG; SNAP-tag™ es un polipéptido basado en O6-alkilguanina-DNA-alkiltransferasa de mamífero, y los sustratos SNAP-tag son derivados de bencil-purinas y pirimidinas), péptidos o proteínas asociativos o de fijación, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos o análogos de ácidos nucleicos, o similares.

Adicional o alternativamente, el grupo de acoplamiento puede utilizarse para acoplar un grupo adicional que se utiliza para acoplarse o fijarse a la molécula de interés, que puede, en algunos casos, incluir tanto grupos funcionales químicos como elementos de fijación específicos. A modo de ejemplo, un grupo de acoplamiento fotoactivable, v.g., biotina fotoactivable, puede depositarse sobre una superficie de sustrato y activarse selectivamente en un área dada. Un agente de fijación intermedio, v.g., estreptavidina, puede acoplarse luego al primer grupo de acoplamiento. La molécula de interés, que en este ejemplo particular estaría biotinilada, se acopla luego a la estreptavidina.

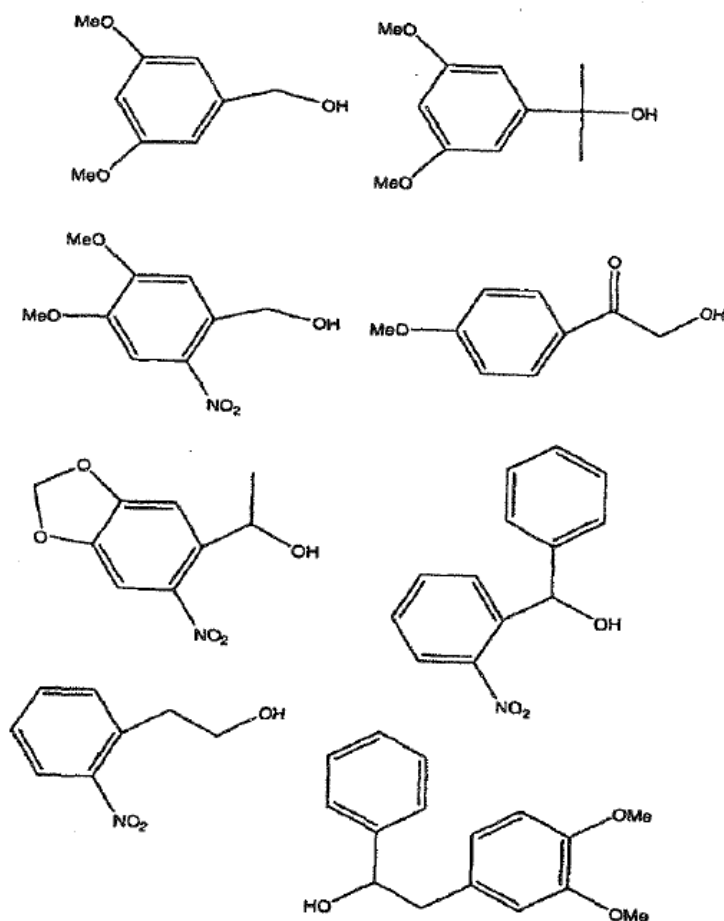
5 Grupos protectores fotolábiles empleados en este aspecto de la invención puede incluir una diversidad de grupos protectores fotoescindibles conocidos, con inclusión, por ejemplo, de nitroveratril, 1-pirenilmetilo, 6-nitroveratriloxycarbonilo, dimetildimetoxibenciloxycarbonilo, 2-nitrobenziloxycarbonilo, metilo, metil-6-nitropiperoniloxycarbonilo, 2-oximetileno-antraquinona, dimetoxibenciloxi-carbonilo, 5-bromo-7-nitroindolinilo, o-hidroxi-alfa-metil-cinamoilo, y mezclas de los mismos, como se describen en las patentes U.S. No. 5.412.087 y 5.143.854.

10 El acoplamiento de los grupos de acoplamiento fotoactivables a las superficies de interés puede realizarse por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los grupos fotoprotectidos o activables pueden incluir un grupo carboxilo que se acopla a través de grupos hidroxilo en la superficie o se fija a la superficie a través de un grupo enlazador, v.g., una molécula PEG. Alternativamente, los grupos amina en los grupos fotoactivables pueden acoplarse a grupos epoxi fijados a la superficie. Alternativamente, los grupos activables preacoplados a moléculas enlazadoras, v.g., grupos PEG, pueden silanarse y fijarse directamente a superficies por procesos conocidos.

15 Ejemplos de los compuestos utilizados en las estrategias de acoplamiento que anteceden, v.g., utilizando biotina protegida con MeNPOC, se ilustran a continuación:



20 Grupos protectores adicionales fotosensibles incluyen grupos útiles para acoplamiento de aminas, tales como trimetilfeniloxycarbonilo (TMPOC), grupos útiles para acoplamiento de ácidos, tales como fenacil-éster (escisión a 300 nm), α -fenacil-éster, Desil-éster (350 nm), Bis(o-nitrofenil)metil-éster (320 nm), 1-pirenilmetiléster (340 nm), N-8-nitro-1,2,3,4-tetrahidroquinolilamida (350 nm), así como ésteres de los compuestos siguientes:



Para aquellos aspectos de la invención que utilizan mayores longitudes de onda para activación o desprotección, podrían utilizarse grupos lábiles apropiados de mayor longitud de onda, tales como 7-hidroxycumarin-4il-metilos bromados, que son fotolábiles a aproximadamente 740 nm. Otros grupos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

Son también útiles grupos fotolábiles de este tipo para acoplamiento a alcoholes, con inclusión, v.g., de algunos de los grupos descritos anteriormente, así como p-nitrobenciloximetil-éter, p-metoxibenciléter, p-nitrobenciléter, mono-, di- o trimetoxitritilos, difenilmetilsilil-éter, sisisil-éter, 3',5'-dimetoxibenzoilcarbonato, metanosulfato, tosilato, y análogos. Éstos y una diversidad de otros grupos fotoescindibles pueden emplearse en asociación con este aspecto de la invención, y se describen, v.g., en el CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology, 2ª edición, y Protective Groups in Organic Synthesis (T.W. Greene y P.C. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999).

Además de, o como alternativa a, el uso de los grupos protectores fotoeliminables relativamente grandes descritos anteriormente, la invención incluye también el uso de grupos fotoactivables, v.g., grupos que se alteran químicamente, de modo distinto que por la eliminación de tales grupos de bloqueo. Por ejemplo, los grupos vinilo o alilo pueden acoplarse a superficies e iluminarse y acoplarse simultáneamente con grupos a acoplar apropiados que llevan, v.g., grupos sulfhidrilo, tales como biotina que tiene un grupo sulfhidrilo acoplado a ella, sea directamente o a través de una molécula enlazadora, que reacciona con el grupo vinilo o alilo activado para acoplarse a la superficie. Alternativamente, otros grupos, como nitroarilazidas pueden emplearse como los grupos de acoplamiento fotoactivables. Una gran diversidad de otros compuestos fotoactivables pueden utilizarse análogamente, con inclusión, v.g., de grupos nitroespiropirano (véase Blonder et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119:10467-10478, y Blonder et al., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119:11747-11757).

En un aspecto, se emplea un fotoiniciador, v.g., un fotoiniciador de longitud de onda larga, tal como Irgacure 784 (bis-(eta 5-2,4-ciclopentadien-1-il)bis[2,6-difluoro-3-(1H-pirrol-1-il)fenil]titanio; Ciba Specialty Chemicals) que puede iniciar reacciones de radicales libres a longitudes de onda tan largas como 530 nm. Tales fotoiniciadores de longitud de onda larga tienen una diversidad de aplicaciones. Por ejemplo, puede recubrirse una superficie (v.g., una superficie de óxido metálico) con vinil-alquil-fosfonato. La exposición de una región deseada de la superficie a un láser de 530 nm en presencia de Irgacure de 384 y biotin-PEG-SH da como resultado la formación de biotin-PEG-alquil-

fosfonato en dicha región. La biotina puede emplearse subsiguientemente para inmovilizar una molécula de interés a la región deseada.

5 En aspectos afines, el componente fotoactivable puede proporcionarse en solución y activarse en un punto próximo a la región de la superficie en la que se desea la localización. Por ejemplo, puede injertarse un componente activable de fijación u otra molécula de interés sobre una superficie activa de silano. Un ejemplo de un sistema de este tipo incluye compuestos fotoactivables de psoraleno-biotina (disponibles, v.g., de Ambion, Inc.), que son activables bajo luz ultravioleta para acoplamiento con una superficie silanada, v.g., una superficie modificada con trimetoxisilano.

10 Aquellos aspectos de la invención que incluyen un proceso aditivo utilizando una activación selectiva de la superficie abarcan generalmente cierto número de estrategias diferentes para activación selectiva en las localizaciones deseadas. Dichas estrategias pueden incluir un paso de activación simple, un proceso de pasos de activación múltiples, un proceso de pasos múltiples que incluye a la vez pasos o procesos de activación y desactivación, o análogas. Para facilidad de exposición, tales procesos de pasos múltiples se describen con referencia a procesos de fotoactivación y/o fotodesactivación, aunque se apreciará que pueden emplearse análogamente otros procesos no excitados por la luz.

20 En al menos un primer aspecto, relativamente simple, la activación selectiva de grupos de acoplamiento fotoactivables en la región deseada implica un paso simple de direccionamiento de la radiación activadora en la región deseada y acoplamiento de la molécula de interés a los grupos de acoplamiento activados que están dispuestos sobre ella. Como se ha indicado, en el caso de los confinamientos ópticos en los que es deseable localizar la molécula de interés, v.g., una enzima, dentro del volumen de iluminación, la activación de un solo paso fotoexcitada debería dar como resultado el acoplamiento sustancialmente sólo dentro del volumen de iluminación. Adicionalmente, como se ha indicado con anterioridad, por modulación de la radiación de activación, puede enfocarse ulteriormente la activación, y por tanto el acoplamiento de grupos de interés, en un subconjunto del volumen de iluminación que se investiga durante la aplicación final, v.g., en la determinación de una secuencia de ácido nucleico utilizando una enzima polimerasa inmovilizada.

30 La estructura básica funcional de una estructura ZMW se ilustra esquemáticamente en la Figura 1. Como se muestra, se proporciona una estructura de ZMW 100 que incluye una capa de revestimiento 102 depositada sobre una capa de sustrato transparente 104. Se dispone un núcleo 106 a través de la capa de revestimiento para dejar al descubierto por debajo la capa transparente 104. El núcleo está dimensionado para proporcionar confinamiento óptico por prevención de la propagación de la radiación electromagnética que cae por debajo de una frecuencia límite a través del núcleo. En lugar de ello, la luz penetra solamente una distancia corta en el núcleo, iluminando un volumen relativamente pequeño, que se indica como limitado por la línea de trazos 108. Mediante el aporte de las sustancias reaccionantes de interés dentro del volumen de observación, v.g., la enzima 110 y el sustrato 112, puede observarse selectivamente su operación sin interferencia de las sustancias reaccionantes, v.g., sustratos 114 que se encuentran fuera del volumen de observación, v.g., por encima de la línea 108.

40 Como se ha indicado con anterioridad, es generalmente deseable que en la realización de análisis moleculares, v.g., análisis de enzimas, la molécula de interés se proporcione preferentemente dentro del volumen de iluminación u observación. De acuerdo con ello, una estrategia de activación simple, como se aplica a ZMWs, se ilustra esquemáticamente en la Figura 2, con referencia a la Figura 1. Como se muestra, la estructura ZMW 100 puede tratarse primeramente para proporcionar una superficie activable, v.g., representada como la línea de trazo continuo 202. Como se muestra, el paso de tratamiento no es selectivo, en el sentido de que proporciona dicha superficie activable a lo largo de toda la superficie de la estructura, con inclusión de la capa de revestimiento 102. Los grupos activables que se encuentran dentro del volumen de iluminación, v.g., como el limitado por la línea de trazos 108, se someten luego a activación (como se indica por la línea de trazos 104). En el contexto de una estructura ZMW, esto implica típicamente exponer los grupos activables a radiación activadora a través del sustrato transparente 104, como se indica por las flechas onduladas 206. Como se apreciará, la radiación de activación decae suficientemente más allá del volumen de iluminación, y como tal, activa sustancialmente sólo los grupos situados en su interior, v.g., los situados por debajo de la línea de trazos 208. Las moléculas de interés, v.g., enzimas, o grupos de acoplamiento enzimáticos específicos, se acoplan luego a los grupos activados dentro del volumen de observación, y en ningún otro lugar sobre la superficie. Se apreciará que la referencia al volumen de iluminación como poseedor de un borde bien definido está simplificada para facilidad de la exposición, y que la decadencia de la iluminación a través del núcleo de ZMW no es tan brusca. Como resultado, podría esperarse que la iluminación y, en consecuencia, el nivel de fotoactivación de la superficie por dicha iluminación disminuyeran de una manera proporcional a la distancia creciente desde el extremo iluminado del núcleo del guiaondas. La tasa de disminución de la radiación y los niveles de activación pueden decrecer a tasas diferentes, dependiendo de la naturaleza de los procesos de activación, v.g., de si existe saturación en cualquier punto, y de si los procesos de activación son procesos fotónicos simples o múltiples.

65 En un proceso alternativo, puede emplearse un paso de activación adicional para seleccionar ulteriormente la región a la que pueden acoplarse las moléculas de interés. En particular, en un paso de activación dado dentro de un confinamiento óptico, v.g., un ZMW, la iluminación como se muestra en las Figuras 1 y 2 dará generalmente como resultado un espectro de activación dentro del confinamiento, estando presentes más grupos activados donde la iluminación es máxima, v.g., en la superficie inferior del guiaondas. A medida que decrece la iluminación con la pe-

netración ulterior en el guiaondas, el nivel de activación o la eficiencia de activación decrecerán dependiendo de las características del grupo activable, la intensidad de la iluminación y la cantidad de tiempo de exposición. Esto dará como resultado una probabilidad decreciente de activación de los grupos en las porciones de la región de iluminación donde la penetración de la luz disminuye y por consiguiente, es menor la iluminación. Por obturación posterior de estos grupos activados con un segundo grupo fotoeliminable y repetición del paso de activación, la probabilidad de que los grupos presentes sean activados lejos de la iluminación alta se ve limitada análogamente, pero se aplica ahora a un número menor de grupos. Esto se ilustra ulteriormente con el ejemplo siguiente: si se tiene una distribución uniforme de grupos fotoactivables en una estructura ZMW que son activables con una primera longitud de onda de luz, a una distancia particular del fondo del guiaondas, se activan la mitad de todos los grupos activables presentes. Si los grupos activos se obturan luego con un segundo grupo fotoactivable que se activa a una longitud de onda diferente, la activación de dichos grupos activará sólo nuevamente la mitad de los grupos activables presentes a la distancia particular, o una cuarta parte de los grupos originalmente activables. El resultado, cuando se aplica a todo el espectro de activación, es un área de activación/acoplamiento enfocada de modo más estrecho, que se aproxima al fondo de la estructura del guiaondas.

Una ilustración esquemática de un método de activación doble se proporciona en la Figura 3. De acuerdo con el método de activación doble, una estructura de guiaondas 300, por ejemplo, se proporciona con un recubrimiento superficial de grupos fotoactivables aplicados uniformemente en toda la superficie (representados en el Panel I como rombos negros 302). Un primer paso de activación (Panel II) se utiliza para activar los grupos activables dentro de un guiaondas (representado como rombos abiertos 304) mediante, v.g., direccionamiento de una luz de activación a través de la superficie del fondo 306 del guiaondas 300. En lugar de acoplar la molécula de interés a dichos grupos activados, puede utilizarse un segundo grupo activable (representado como círculos negros 308 en el Panel III), que es activado por una longitud de onda de luz diferente, para obturar los grupos activados 304. Un paso de activación subsiguiente (Panel IV) activa luego un subconjunto de los grupos recién obturados (representados como círculos abiertos 310), y la molécula de interés (no representada) se acopla entonces a estos grupos recién activados. La Figura 4 proporciona una gráfica de activación superficial simulada ilustrativamente (concentración de grupos superficiales activados) en función de la distancia desde la superficie del fondo de un ZMW, a la vez para un paso de activación primero y segundo. Como se muestra, podría esperarse que un primer paso de activación produjera un perfil de activación que disminuye en asociación con una tasa de decadencia de la luz activadora lejos de la superficie del fondo de un ZMW. Después de la obturación con un segundo grupo fotoeliminable, y reactivación a una longitud de onda diferente, sería de esperar un perfil de decadencia similar, pero basado solamente en los grupos previamente activados. Como resultado, los grupos activados se enfocarían más en la superficie del fondo del guiaondas que con sólo un paso de activación simple. Si bien se ha descrito en términos de dos pasos, se apreciará que podrían realizarse más pasos para enfocar ulteriormente la región de activación en la superficie.

Como se utiliza en esta memoria, a no ser que se indique otra cosa por el contexto específico, la obturación se refiere en general al acoplamiento de un grupo adicional a un grupo reactivo por lo demás de tal modo que el compuesto resultante no es activo para acoplamiento aplicado ulteriormente u otras reacciones de interés. Tales moléculas de obturación comprenden típicamente grupos que se acoplarán al grupo de acoplamiento expuesto, pero que son por lo demás naturales para la reacción deseada, y variarán dependiendo de la naturaleza de los grupos a obturar. Los mismos pueden incluir grupos silano neutros para obturación de grupos silanol de la superficie, o pueden incluir otros materiales no reactivos, v.g., materiales orgánicos no reactivos, v.g., alcoholes, grupos alquilo, grupos alqueni- lo, o análogos. Tales grupos de obturación pueden ser moléculas pequeñas o pueden incluir estructuras polímeras o macromoleculares mayores, tales como polietilenglicoles (PEGs), o análogas. Químicas de obturación se practican extensamente en procesos de modificación, derivatización y pasivación de superficies que se exponen, v.g., en *Immobilized Biomolecules in Analysis: A Practical Approach* (Cass and Ligler Eds.) Oxford University Press, 1998, y *Hermansonn et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, Inc. 1992.

En otro enfoque de pasos múltiples, pueden emplearse pasos iterativos de activación y desactivación para enfocar el acoplamiento de la molécula de interés. Como se ha indicado previamente, los grupos fotoactivables pueden emplearse de acuerdo con los esquemas de desactivación arriba descritos, v.g., donde áreas distintas del área deseada se activan y se obturan o bloquean, seguido por activación dentro del área de interés y acoplamiento de la molécula de interés. Este método puede resultar más útil para aplicaciones basadas en ZMWs. En particular, por una iluminación desde el extremo abierto del guiaondas, se activarán típicamente, y se obturarán subsiguientemente grupos activables no sólo en la superficie superior de la capa de revestimiento, sino también cierta porción de los grupos activables sobre las paredes del núcleo del guiaondas. La activación subsiguiente desde el fondo o el extremo cerrado del núcleo será capaz entonces solamente de activar aquellos grupos activables que no han sido protegidos todavía. En la medida en que la radiación de activación penetra más de la mitad de la longitud del núcleo, esto dará como resultado una mayor selección de activación para deposición en o hacia el fondo de ZMW. Un método de este tipo se ilustra esquemáticamente en la Figura 5.

En particular, sobre un sustrato que tenga confinamientos ópticos, tal como ZMW 500, dispuestos sobre él, puede proporcionarse una superficie uniforme que incluye grupos de acoplamiento fotoactivables (rombos llenos 502) en toda la superficie, v.g., dentro y fuera del confinamiento (Paso I). En un paso subsiguiente (Paso II), la superficie se expone a radiación de activación desde un lado superior, v.g., el lado situado fuera del área en la que se desea inmovilizar las moléculas de interés. Los grupos activados (rombos abiertos 504) se desactivan luego (Paso III) por

obturación de los mismos con otro grupo protector (círculos llenos 506), v.g., un grupo protector no eliminable. Subsiguientemente, los ZMWs se iluminan desde el fondo, de tal modo que el volumen de iluminación incluye las regiones deseadas y los grupos de acoplamiento en dicha región se activan (Paso IV, rombos abiertos 508). Las moléculas de interés se acoplan luego a estos grupos activados. Por control de la iluminación de activación inicial, es posible controlar eficazmente la cantidad de grupos activables que se obturan antes del paso de activación posterior. En particular, por utilización de radiación de activación, o una geometría de guiaondas u otras condiciones de exposición que permitan que la radiación de activación se propague eficazmente más de la mitad del camino a través del núcleo del guiaondas, en el primer paso de activación, es posible obturar eficazmente más de la mitad de los grupos activables en el primer paso de activación y protección. Dirigiendo luego la radiación de activación desde el lado del fondo, sustancialmente la totalidad de los grupos activables restantes, que sustancialmente están dispuestos en su mayoría hacia el fondo del núcleo y que no habrían sido activados y obturados en el primer paso, pueden activarse ahora y estar disponibles para acoplamiento a las moléculas de interés. Como se apreciará, los diversos enfoques arriba descritos pueden combinarse para mejorar ulteriormente la selectividad.

En un proceso alternativo esquemáticamente similar a los métodos de fotoactivación arriba descritos, pueden emplearse procesos de ataque UV profundo en la generación de una superficie activa en regiones deseadas, v.g., en la superficie del fondo de un ZMW. En particular, una exposición UV profunda, v.g., iluminación a menos de 200 nm, es decir, utilizando láseres UV intensos, lámparas UV intensas, v.g., una lámpara Xeradex excimer, a vacío ha sido utilizada para degradar selectivamente materiales orgánicos o inorgánicos fijados a la superficie, dado que dicha exposición UV es capaz de romper directamente los enlaces químicos, v.g., sin ayuda de los radicales oxígeno que pueden formarse durante el proceso, que pueden contribuir a un ataque excesivo. Por realización de dicha exposición a vacío u otras restricciones en cuanto a la capacidad de los radicales oxígeno para entrar en contacto y atacar otras superficies, es posible irradiar y eliminar por consiguiente de modo controlable materiales orgánicos e inorgánicos de las regiones seleccionadas del sustrato.

En el contexto de las superficies de la invención, por ejemplo, puede proporcionarse un sustrato ZMW con una primera capa de bloqueo que es sustancialmente inerte a grupos de acoplamiento adicionales, v.g., es no reactiva con la estrategia de acoplamiento a emplear en la unión eventual de las moléculas de interés a la superficie. Como resultado, los grupos funcionales en la superficie original son bloqueados eficazmente por esta capa de bloqueo. Ejemplos de capas de bloqueo incluyen organosilanos, tales como PEG-silano, reservas UV intensas, u otros organosilanos de cadena larga. La exposición de los guiaondas desde el fondo o lado del sustrato a una radiación UV intensa, degrada luego la capa de bloqueo dentro de los guiaondas y preferentemente en la superficie del fondo del guiaondas.

Durante el proceso de exposición o ataque, puede ser deseable limitar la capacidad para que los radicales oxígeno entren en contacto con otras porciones de la superficie, v.g., fuera del ZMW o fuera de la región de observación hacia el fondo de ZMW. En tales casos, el sistema puede operar a vacío, o alternativa o adicionalmente, puede proporcionarse una capa de sellado sobre el ZMW. Dicha capa de sellado puede comprender una capa rígida, v.g., una pastilla de vidrio o silicio o un material más flexible, tal como una hoja de polímero, v.g., PDMS, PTFE, polipropileno, polietileno, poliestireno, o cualquiera de una diversidad de materiales polímeros que son capaces de sellar las estructuras de guiaondas, preferiblemente sin un desprendimiento excesivo de gas o aporte indeseables por cualquier otra razón de residuos químicos a los guiaondas.

A continuación de la exposición, el sustrato se pone en contacto con inmaterial que incluye los grupos funcionales utilizados para acoplar la molécula de interés, que se fija preferentemente a la región no bloqueada, v.g., los grupos silanol expuestos descubiertos por el proceso de 'ataque'. Este material adicional puede incluir solamente grupos funcionalizados o puede incluir una mezcla de grupos funcionalizados e inertes a fin de controlar la densidad de grupos funcionales, y por consiguiente moléculas de interés dentro de la estructura del guiaondas. Tales grupos funcionalizados pueden ser especies químicas reactivas y/o restos de fijación específicos, tales como avidina, biotina, o análogos.

Una vez que la densidad apropiada de grupos de acoplamiento se ha depositado en las regiones deseadas, v.g., en la superficie del fondo de la estructura del guiaondas, la molécula de interés puede acoplarse a los grupos de acoplamiento, v.g., a través del grupo reactivo o a través de un grupo biotina o avidina añadido u otra pareja de fijación específica al grupo de acoplamiento o que está enlazado al grupo de acoplamiento.

En otro proceso similar a los métodos de fotoactivación arriba descritos, se emplean fotoiniciadores ligados o injertados. Son particularmente interesantes los foto-iniferters tales como ditiocarbamatos (DTC) que inician y controlan la polimerización radical de acrilatos, alquenos o la adición radical terminal de un reactivo de obturación con un ligando para inmovilización específica de la molécula de interés. La región (o regiones) deseada(s) de una superficie recubierta con el fotoiniciador se ilumina para iniciar la reacción únicamente en dicha región. Por ejemplo, un sustrato de silicio hidroxilado puede tratarse con un foto-iniferter tal como N,N-(diethylamino)ditiocarbamoilbencil(trimetoxi)-silano (SBDC), que forma una monocapa autoensamblada sobre la superficie del sustrato. Se suministra luego una solución de metacrilato de metilo, y la irradiación UV de la región deseada de la superficie inicia la polimerización para formar un pincel de polímero de PMMA ligado superficialmente (v.g., que incluye un grupo de acoplamiento) únicamente en dicha región.

Otro método de inmovilización selectiva de moléculas de interés en regiones deseadas sobre superficies sustrato implica la modelización selectiva de materiales con características diferentes en diferentes regiones y que se basa en las características de diferenciación de las superficies en el proceso de inmovilización selectiva. En los sustratos ZMW ilustrativos descritos en esta memoria (así como en otros tipos de sustrato híbridos, v.g., sensores basados en metales o semiconductores que dependen de moléculas de interés asociadas a la superficie, v.g., ChemFETS), tales superficies híbridas modelizadas existen ya. En particular, los sustratos ZMW comprenden típicamente una capa metálica de revestimiento, v.g., aluminio que incluye típicamente una capa superficial de óxido de aluminio, depositada sobre una capa basada en sílice, v.g. SiO_2 , con una abertura dispuesta a través de la capa de revestimiento encima de la capa de SiO_2 . La estructura resultante de los guías de onda incluye paredes de metal u óxido metálico, v.g., Al_2O_3 con una base de SiO_2 . La superficie de óxido de aluminio está cargada típicamente con una carga positiva relativamente alta en soluciones acuosas, mientras que la superficie de SiO_2 lleva una carga negativa sustancial. Dichos diferenciales de carga pueden emplearse fácilmente para localizar e inmovilizar selectivamente moléculas de interés en una superficie con relación a la otra.

A modo de ejemplo, las enzimas DNA-polimerasa poseen típicamente un nivel relativamente alto de residuos superficiales cargados positivamente. Como resultado, una polimerasa será repelida por regla general por la capa metálica de revestimiento cargada positivamente, en tanto que será atraída y se adsorberá a la superficie de vidrio cargada negativamente en la base de una estructura de guías de onda. Los grupos de acoplamiento pueden depositarse análogamente, y acoplarse posteriormente la polimerasa (u otra molécula de interés) a los grupos de acoplamiento. Es posible modificar fácilmente la atracción/repulsión relativa de las diferentes superficies por ajuste de la naturaleza del medio para alterar la carga de la enzima, v.g., concentración iónica, pH, aditivos, etc, por modificación de cada superficie a fin de aumentar o reducir el componente carga en la superficie o por (des)carga eléctrica del metal, o por modificación de la enzima, reactivo de acoplamiento, u otra molécula de interés para ajustar su nivel de carga superficial, v.g., por mutación de la enzima o por acoplamiento de los grupos cargados, v.g., poliones como polilisina, poliarginina, o análogos. En un aspecto, después de la deposición de la polimerasa (u otro grupo o molécula de interés) sobre la superficie cargada negativamente, la superficie con carga positiva se pasiva recubriendo la misma con un agente tal como seroalbúmina bovina (v.g., BSA acetilada), poliglutamato, un polielectrolito, una multicapa de polielectrolitos, un copolímero polielectrolito-PEG, un fosfonato, o un fosfato, como se expone con mayor detalle más adelante. Dicha pasivación puede, por ejemplo, prevenir la fijación inespecífica de análogos de nucleótidos a las paredes metálicas cargadas positivamente de un núcleo de ZMW durante aplicaciones de secuenciación de ácido nucleico monomolecular. En un aspecto afín, la pasivación se realiza antes de la deposición de la polimerasa (u otro grupo o molécula de interés), y facilita opcionalmente la deposición selectiva, v.g., por bloqueo de la fijación de polimerasa a las paredes.

Como se ha indicado arriba, la carga superficial de un material puede, en algunas realizaciones, ser una característica activa ajustable que puede abordarse, v.g., por ajuste del pH y/o por polarización externa de la superficie. Por ejemplo, puede impurificarse óxido de estaño (un material transparente) para hacerlo conductor, y su carga superficial (polarización) puede modularse a un valor deseado.

Pueden emplearse análogamente otras químicas selectivas de superficies. Por ejemplo, composiciones de diferentes fosfolípidos han demostrado la capacidad, en presencia y ausencia de calcio, para formar niveles diferentes de bicapas fosfolípicas soportadas sobre superficies de óxidos metálicos y superficies basadas en dióxido de silicio. Por selección de la composición del lípido y la presencia o ausencia de calcio, es posible direccionar la deposición de moléculas, sea como grupos de bloqueo o de acoplamiento, sobre los diferentes tipos de superficie. Por ejemplo, puede seleccionarse un fosfolípido que tiene una selectividad de fijación alta para superficies de óxido metálico y utilizarse el mismo para bloquear la porción metálica de la superficie. Alternativamente, puede utilizarse un fosfolípido con un grupo de acoplamiento apropiado que tiene alta selectividad de fijación para el sustrato de vidrio subyacente, y acoplar así selectivamente grupos adicionales al sustrato transparente. Ejemplos de estas composiciones selectivas de fosfolípido se describen, v.g., en Rossetti, et al., *Langmuir*, 2005; 21 (14):6443-50. Resumidamente, vesículas de fosfolípido que contienen entre 50% y 20% de DOPS (dioleoil-fosfatidil-serina) en DOPC (dioleoil-fosfatidil-colina), añadidas a una superficie híbrida $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ exhiben formación selectiva de la bicapa lipídica sobre la superficie de SiO_2 en ausencia de calcio, en tanto que la presencia de calcio permite también la formación de la bicapa sobre la superficie de TiO_2 .

Como se apreciará, es posible emplear la bicapa fosfolípica selectiva de vidrio (u otra composición selectiva de superficie) como los grupos de acoplamiento, o puede utilizarse la misma como una capa de enmascaramiento para una deposición subsiguiente de capa de bloqueo sobre la capa metálica. Esto podría ir seguido luego por la eliminación de la bicapa lipídica del sustrato de vidrio seguido por acoplamiento de las moléculas de interés.

Alternativamente, referencias físicas/químicas entre las diferentes superficies pueden someterse a fijación diferencial basada en químicas específicamente selectivas. Por ejemplo, pueden emplearse grupos específicos que se asocian con grupos metálicos particulares para localizar selectivamente moléculas a una superficie con relación a la otra, v.g., químicas oro/tiol, etc.

Como otro ejemplo, los silanos (v.g., reactivos metoxi-silano) forman enlace estables con superficies de sílice por formación de enlaces Si-O-Si, pero no modifican significativamente la superficies de aluminio u óxido de aluminio en condiciones de reacción seleccionadas adecuadamente (v.g., la fase vapor favorece la modificación de las superficies de sílice, como lo hacen ciertas condiciones en solución). Los silanos, por ejemplo, silanos modificados con grupos de acoplamiento para fijación de enzimas u otras moléculas de interés (v.g., biotina-PEG-silanos tales como los descritos en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/240.662), pueden utilizarse así para modelizar selectivamente sustratos híbridos tales como ZMWs que contienen superficies de sílice. Medidas de elipsometría y de ángulo de contacto sobre superficies de Si modificadas previamente con Al_2O_3 muestran niveles indetectables de deposición del reactivo silano. Además, la neutravidina marcada fluorescentemente no se fija específicamente a portaobjetos de sílice fundida modificados con Al_2O_3 después de deposición de biotina-PEG-silano en los portaobjetos, mientras que, en contraste, la modificación con biotina-PEG-silano de portaobjetos de sílice fundida (no modificados con Al_2O_3) da como resultado una especificidad muy alta de fijación de neutravidina por el ligando biotina. Dichos resultados demuestran la factibilidad de modificar únicamente el fondo de sílice fundida de un ZMW o dispositivo similar con poca o ninguna modificación de las paredes de aluminio o la superficie superior del dispositivo, utilizando reactivos de metoxisilano.

Como otro ejemplo, las superficies cargadas negativamente pueden modificarse de modo selectivo por adsorción de copolímeros que contienen bloques de polielectrólitos positivos y bloques PEG-ilados (o bloques anti-ensuciamiento similares). Los bloques policatiónicos se fijan a regiones del dispositivo que son electronegativas, y los componentes PEG proporcionan una superficie no reactiva para excluir la fijación inespecífica. Copolímeros ilustrativos polielectrólito-PEG incluyen PLL-PEG-(poli(L-lisina)-poli-etilenglicol)). Los grupos PEG, o un subconjunto de los mismos, pueden incluir un grupo de acoplamiento tal como biotina o los otros grupos descritos en esta memoria (véase, v.g., la publicación de la Solicitud de Patente U.S. 2002/0128.234 "Multifunctional Polymeric Surface Coatings in Analytic and Sensor Devices" por Hubbell et al., Huang et al. (2002) "Biotin-Derivatized Poly(L-lysine)-g-Poly(ethylene glycol): A Novel Polymeric Interface for Bioaffinity Sensing" Langmuir 18(1): 220-230). Así, por ejemplo, las superficies de SiO_2 de un ZMW pueden recubrirse con PLL-PEG-biotina, y puede acoplarse luego polimerasa biotinilada al fondo del ZMW por fijación de avidina o estreptavidina a la PLL-PEG-biotina.

En un aspecto, la inmovilización selectiva de la molécula de interés sobre un tipo de material en un sustrato híbrido (v.g., un ZMW) se complementa o facilita por modificación del otro tipo de material. Por ejemplo, para un ZMW que deba utilizarse en una aplicación tal como una secuenciación de ácido nucleico monomolecular, es deseable inmovilizar selectivamente la polimerasa a la superficie de sílice del fondo del ZMW, y es deseable también pasivar las paredes metálicas y la superficie superior del dispositivo (antes o después de la inmovilización de la polimerasa). Las superficies de aluminio u óxido de aluminio del ZMW sin modificar que, como se ha indicado arriba, tienden a cargarse positivamente en solución acuosa, pueden demostrar una fijación inespecífica indeseable de proteínas (tales como neutravidina o estreptavidina y polimerasa), análogos de nucleótidos (v.g., por los grupos fosfato de los análogos), y tintes (v.g., tintes con grupos ácido sulfónico o ácido carboxílico). Como se ha indicado arriba, tales interacciones electrostáticas indeseables pueden minimizarse por fijación de agentes de pasivación a la superficie; ejemplos adicionales de agentes de pasivación incluyen, pero sin carácter limitante, polielectrólitos aniónicos tales como poli(estirenosulfonato) y poli(ácido acrílico) y macromoléculas tales como heparina y arginina.

En algunos casos, sin embargo, la adsorción de polielectrólitos aniónicos a una superficie cargada positivamente puede dar como resultado una compensación excesiva de la carga neta de la superficie, donde la adsorción del polianión da como resultado un cambio en la carga superficial neta de positiva a negativa. Este cambio minimiza en principio la adsorción inespecífica de análogos nucleotídicos u otros compuestos cargados negativamente a la superficie, pero tiene la desventaja de que muchas proteínas (v.g., las polimerasas) tienen afinidad para las superficies electronegativas. Así, una superficie electronegativa producida por dicha sobrecompensación puede dar como resultado niveles indeseablemente altos de fijación inespecífica de la polimerasa. Este problema puede abordarse por utilización de condiciones de inmovilización con alto contenido de sal; sin embargo, el régimen alto en sal puede causar hinchamiento de la capa de polielectrólito así como pérdida parcial de polielectrólitos. Además, el recubrimiento de las superficies con polielectrólitos es un proceso dinámico, y es posible que la polimerasa pueda formar eventualmente complejos estables bloqueantes de la actividad con los polielectrólitos.

Opcionalmente, en lugar de pasivar la superficie cargada positivamente por adsorción de polielectrólitos aniónicos, las superficies cargadas positivamente pueden pasivarse por fijación de estructuras de copolímeros que contengan bloques de polielectrólitos (negativos) y bloques PEGilados. Los bloques de polielectrólitos del copolímero adsorben o anclan las macromoléculas a regiones del dispositivo que son electropositivas (v.g., las áreas de aluminio u óxido de aluminio de un ZMW), y los componentes de PEG proporcionan un cojín no iónico que evita la fijación a la superficie o la complejación de la polimerasa con los bloques de polielectrólitos. Los copolímeros polielectrólito(PE)-PEG pueden, por ejemplo, ser copolímeros dibloque (PEG-PE) o multibloque (v.g., PE-PEG-PE o PEG-PE-PEG), así como polímeros ramificados, polímeros peine, o polímeros semejantes a dendronas). Unos cuantos copolímeros lineales y ramificados ilustrativos se representan esquemáticamente en la Figura 16, Panel VI. Resultará evidente que, si bien los copolímeros ilustrativos descritos en esta memoria emplean PEG, es aplicable cualquier cadena principal anti-ensuciamiento, por ejemplo, polipirrolidona, alcohol polivinílico, dextranos, y poliacrilamidas. Véase, v.g., la publicación de la Solicitud de Patente U.S. 2002/0128234, Voros et al. (2003) "Polymer Cushions to Analyze

Genes and Proteins" *BioWorld* 2:16-17, Huang et al. (2002) *Langmuir* 18(1): 220-230, y Zoulalian et al. (2006) *J. Phys. Chem. B* 10(51):25603-25605.

La modificación ortogonal de un sustrato híbrido con dos composiciones que tienen selectividades diferentes para características superficiales diferentes se ilustra esquemáticamente en la Figura 16. Como se muestra en el Panel I, ZMW 1600 incluye un núcleo 1602 dispuesto a través de una capa de revestimiento de aluminio 1604 hasta un sustrato de sílice transparente 1606. El núcleo de aluminio tiene una capa delgada de óxido de aluminio 1605 en su superficie. Como se muestra en el Panel II, la superficie del fondo del ZMW está modificada selectivamente con una mezcla de biotina-PEG-silano 1620 y PEG-silano 1622 (v.g., en una ratio seleccionada para proporcionar una densidad deseada de grupos de acoplamiento de biotina, y por tanto finalmente de moléculas de interés, en la superficie, opcionalmente, una por núcleo). Como se ilustra en el Panel III, las paredes y las superficies superiores del dispositivo se modifican luego selectivamente con copolímero polianión-PEG 1630. Como se muestra en la vista expandida en el Panel V, el copolímero 1630 incluye bloques de polianión (A) 1631 y bloques de PEG (B) 1632. (Es digno de mención que la modificación de las superficies de aluminio se realiza opcionalmente antes, más bien que después, de la modificación de la superficie de sílice.) Se fija luego polimerasa biotinilada 1608 por neutravidina 1609 al grupo de acoplamiento biotina en el biotin-PEG-silano 1620, como se muestra en el Panel IV.

En un aspecto, las composiciones utilizadas para pasivar la superficie a la que no se fija la molécula de interés (v.g., la superficie de aluminio) pueden tener también una densidad seleccionada de restos que añaden funcionalidad a la superficie. Por ejemplo, en los copolímeros PE-PEG arriba descritos, pueden fijarse restos de extinción de la fluorescencia 1640 a los extremos funcionales de los bloques PEG (Figura 16, Panel V). Como otro ejemplo, pueden utilizarse esquemas de ligando ortogonales para fijar las proteínas que trabajan en tándem con las polimerasas u otras moléculas de interés; v.g., en realizaciones en las cuales se utiliza biotina para inmovilizar la polimerasa 1608, el grupo funcional 1640 puede ser un grupo SNAP, HA, GST, o grupo de acoplamiento similar distinto de biotina, a fin de fijar una segunda proteína modificada convenientemente. Estas segundas proteínas pueden utilizarse para romper cadenas de DNA recién sintetizadas, ayudar a la eliminación de productos de reacción de la solución, ayudar a llevar las sustancias reaccionantes a la región de reacción, ayudar a la regeneración de extinguidores de tripletes, o condiciones análogas.

Como otro ejemplo, la superficie del sustrato híbrido en la cual no está inmovilizada la molécula de interés puede pasivarse utilizando una multicapa de polielectrólito. Las multicapas de polielectrólito se forman convenientemente por deposición sucesiva de capas alternantes de polielectrólitos de carga opuesta. Véase, v.g., Decher (1997) *Science* 277:1232. La formación de una multicapa de polielectrólito se ilustra esquemáticamente en la Figura 17. Como se muestra en los Paneles I y II, en el paso1 el sustrato cargado positivamente 1705 se pone en contacto con un polianión 1732, que se adsorbe a la superficie del sustrato. El exceso de polianión se elimina por lavado en el paso2. En el paso3, una capa de policación 1734 se deposita sobre la capa de polianión 1732 formada en el paso1; el exceso de policación se elimina por lavado en el paso4. Los Pasos 1-2 y/o 3-4 se repiten en caso deseado, para depositar capas alternantes de polielectrólitos con carga opuesta y formar multicapas de esencialmente cualquier espesor deseado y carga superficial resultante (negativa cuando se deposita finalmente el polianión, o positiva cuando se deposita finalmente el policación). El Panel III ilustra un policación ilustrativo poli(etilenimina) y un polianión ilustrativo poli(ácido acrílico), que se emplean opcionalmente para formar multicapas de polielectrólito.

Opcionalmente, la capa final en una multicapa de polielectrólito comprende un copolímero polielectrólito-PEG, por ejemplo, un copolímero tal como los arriba descritos que contienen bloques de polielectrólito (positivos o negativos, dependiendo de la carga de la capa precedente en la multicapa) y bloques PEGilados. Simplemente como un ejemplo, una capa de poli(ácido acrílico) en una multicapa de polielectrólito puede ir seguida por una capa de PLL-PEG o poliglutamato-PEG, para proporcionar un acabado de PEG. Resultará evidente que, si bien los copolímeros ilustrativos descritos en esta memoria emplean PEG, es aplicable cualquier cadena principal anti-ensuciamiento, por ejemplo, polipirrolidona, alcohol polivinílico, dextranos, y poli(acrilamidas).

Una derivatización diferencial de la superficie de un sustrato híbrido con dos composiciones que tienen selectividades diferentes para características de superficie diferentes y formación de una multicapa de polielectrólito se ilustra esquemáticamente en la Figura 18. Como se muestra en el Panel I, el ZMW 1800 incluye un núcleo 1802 dispuesto a través de la capa de revestimiento de aluminio 1804 hasta la capa de sílice fundida transparente 1806. Las paredes de aluminio tienen una capa delgada de óxido de aluminio 1805 en su superficie. Como se muestra en el Panel II, la superficie del fondo del ZMW está modificada selectivamente con una mezcla de biotina-PEG-silano 1820 y PEG-silano 1822. Como se ilustra en el Panel III, la multicapa de polielectrólito 1830 se deposita luego sobre las paredes y las superficies superiores del dispositivo. La multicapa de polielectrólito puede depositarse como se ilustra en la Figura 17, por ejemplo; una capa de polianión (v.g., poli(ácido acrílico)) se deposita sobre la capa de óxido de aluminio cargada positivamente 1805, seguida por una capa de policación (v.g., poli(etilenimina)), luego otra capa de polianión, etc. Para secuenciación de moléculas simples o aplicaciones similares, la capa final de la multicapa de polielectrólito es típicamente una capa polianiónica, tal que la superficie de la multicapa de polielectrólito está cargada negativamente para repeler los análogos de nucleótidos (u opcionalmente un copolímero polielectrólito-PEG o similar, nuevamente para proporcionar una superficie con baja fijación a los análogos). Como se muestra en el Panel IV, la polimerasa biotinilada 1808 es fijada luego por la neutravidina 1809 al grupo de acoplamiento de biotina sobre biotina-PEG-silano 1820. Dicho aprovechamiento de las diferencias en propiedades de superficie de los materiales

que constituyen un ZMW, v.g., silanización específica al fondo de vidrio y pasivación de los lados y las superficies superiores de óxido de aluminio con multicapas de polielectrólito para prevenir la fijación inespecífica, puede limitar la ocupación por la polimerasa al fondo del ZMW, evitando la ocupación por la polimerasa en las superficies de las paredes laterales y las superficies superiores, mientras que limita la fijación inespecífica de análogos de nucleótidos o similares.

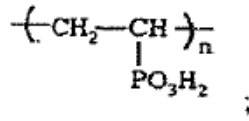
Como otro ejemplo adicional de las maneras por las cuales pueden modificarse diferencialmente los diferentes materiales en un sustrato híbrido basándose en sus características de superficie diferentes, pueden emplearse compuestos fosfato y ácido fosfónico (al igual que otros compuestos que exhiban quimisorción superficial específica y/o formación de monocapa autoensamblada). Los restos fosfato o ácido fosfónico se fijan fuertemente a los óxidos metálicos (v.g., óxido de aluminio, óxido de titanio, óxido de zirconio, óxido de tántalo, óxido de niobio, óxido de hierro, y óxido de estaño) pero no se fijan fuertemente al óxido de silicio. Así, los compuestos que comprenden al menos un grupo fosfato ($-OP(O)(OH)_2$), sea protonizado, parcial o completamente desprotonizado, y/o parcial o completamente neutralizado) o grupo ácido fosfónico ($-P(O)(OH)_2$), sea protonizado, parcial o completamente desprotonizado, y/o parcial o completamente neutralizado) pueden utilizarse para modificar selectivamente las superficies de óxido de aluminio de un ZMW o sustrato híbrido similar.

Por ejemplo, una superficie de óxido metálico puede modificarse con un alquil-fosfato o un alquil-fosfonato. (Los términos ácido fosfónico y fosfonato se utilizan de modo intercambiable en esta memoria.) Alquil-fosfatos y alquil-fosfonatos ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, un alquil-fosfato o alquil-fosfonato en el cual el grupo alquilo es un grupo alquilo insustituido de cadena lineal (v.g., un grupo alquilo de cadena lineal que tiene de 1 a 26 carbonos, v.g., de 8 a 20 carbonos, v.g., de 12 a 18 carbonos). Alquil-fosfatos y alquil-fosfonatos ilustrativos adicionales incluyen alquil-fosfonatos y alquil-fosfatos funcionalizados o sustituidos, por ejemplo, X-alquil-fosfonatos y X-alquil-fosfatos funcionalizados en los cuales X es un grupo terminal que comprende o está constituido por un grupo vinilo (CH_2), metilo (CH_3), amina (NH_2), alcohol (CH_2OH), epóxido, acrilato, metacrilato, tiol, carboxilato, éster activo (NHS-éster), maleimida, haluro, fosfonato, o fosfato, o un grupo oligómero de etilenglicol (EG) (EG4, EG6, EG8) o polietilenglicol (PEG), foto-iniciador (v.g., foto-iniferters tales como ditiocarbamatos (DTC)), grupo fotoenjaulado ('photocaged'), o grupo fotorreactivo (v.g., psoraleno). El espaciador de cadena alquílica en la molécula de X-alquil-fosfonato o X-alquil-fosfato es un ligante hidrófobo que tiene opcionalmente 1 a 26 unidades metileno (CH_2) repetidas, preferiblemente de 8 a 20, y más preferiblemente de 12 a 18. La cadena alquilo puede contener uno o más (hasta todos) los grupos fluorados y/o puede ser en su lugar una cadena hidrocarbonada con uno o más enlaces dobles o triples a lo largo de la cadena. La capa de X-alquil-fosfato o X-alquil-fosfonato puede utilizarse ulteriormente como sustrato para anclaje de otros ligandos o componentes del apilamiento superficial, tales como una multicapa de polielectrólito o multicapa producida por quimisorción. Los alquil-fosfatos/fosfonatos pueden formar una monocapa autoensamblada, estable y resistente a los disolventes que puede proteger el material subyacente (v.g., aluminio) contra la corrosión, etc; el papel del ligante alquilo en las estructuras anteriores es mejorar la estabilidad lateral de la monocapa producida por quimisorción en ambientes acuosos. En realizaciones en las cuales el compuesto fosfonato o fosfato incluye una cadena de hidrocarburo insaturada, el o los enlaces dobles o triples pueden servir como restos de reticulación lateral para estabilizar una monocapa autoensamblada que comprende el compuesto.

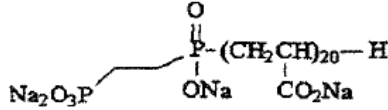
Alquil-fosfatos y alquil-fosfonatos ilustrativos específicos incluyen, pero sin carácter limitante, ácido octil-fosfónico, ácido decil-fosfónico, ácido dodecil-fosfónico, ácido hexadecil-fosfónico, ácido octadecil-fosfónico, ácido docosil-fosfónico (es decir, ácido fosfónico C22), ácido hidroxi-dodecil-fosfónico ($HO(CH_2)_{12}P(O)(OH)_2$), ácido hidroxi-undecenil-fosfónico, ácido decanodilbis(fosfónico), dodecilsfosfato, e hidroxi-dodecilsfosfato. Medidas de elipsometría y/o del ángulo de contacto indican que ácido octil-fosfónico, ácido octadecil-fosfónico, ácido hidroxi-dodecil-fosfónico, y ácido dodecil-fosfónico exhiben especificidad para superficies de aluminio/óxido de aluminio con relación a las superficies Si/SiO_2 . La modificación de óxidos metálicos con tales fosfatos y fosfonatos ha sido descrita, v.g., en Langmuir (2001) 17:3428, Chem. Mater. (2004) 16:5670; J. Phys. Chem. B (2005) 109:1441, Langmuir (2006) 22:6469, Langmuir (2006) 22:9254, Langmuir (2006) 22:3988, J. Phys. Chem. B (2003) 107:11726, J. Phys. Chem. B (2003) 107:5877, Langmuir (2001) 17:462, 7. Phys. Chem. B (2006) 110:25603, Langmuir (2002) 18:3957, Langmuir (2002) 18:3537, y Langmuir (2001) 17:4014.

Las superficies de óxido metálico pueden modificarse análogamente con polifosfatos o polifosfonatos. La quimisorción, v.g., de polifosfonatos difiere de la descripción previa de la adsorción de polielectrólito en que los ligandos (restos de ácido fosfónico) forman un complejo químico con el sustrato total (v.g., alúmina, óxido de circonio, u óxido de titanio). Dicha interacción es más fuerte y menos reversible al intercambio de sal que las simples interacciones electrostáticas. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, PEG-fosfonatos tales como los descritos en Zoualian et al: (2006) "Functionalization of titanium oxide surfaces by means of poly(alkyl-phosphonates)" J. Phys. Chem. B 110(51):25603-25605 o copolímeros PEG-polivinil(fosfonato). (En general, se contemplan en esta memoria copolímeros que incluyen restos quimisorbentes más PEG u otros restos anti-ensuciamiento.)

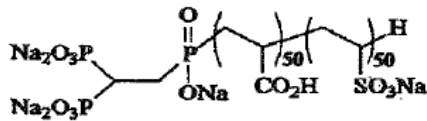
Otros fosfonatos adecuados incluyen fosfonatos polímeros de peso molecular alto tales como ácido polivinilfosfónico (PVPA)



fosfonatos obturados terminalmente tales como



y



(disponibles comercialmente de Rhodia como Aquarite® EC4020 y Aquarite® ESL, respectivamente); y

5

copolímeros tales como copolímero ácido vinil-fosfónico-ácido acrílico



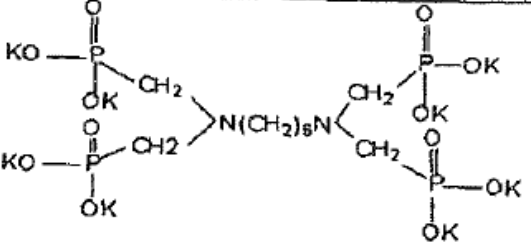
(disponible comercialmente de Rhodia como Albritect™ CP30).

10 Fosfonatos adecuados incluyen también fosfonatos de peso molecular bajo tales como ácido 2-carboxietil-fosfónico (conocido también como ácido 3-fosfonopropiónico; disponible comercialmente de Rhodia como Albritect™ PM2) y los compuestos enumerados en la Tabla 1 (disponibles comercialmente como compuestos Dequest® de Solutia, Inc., St. Louis Missouri). Los compuestos fosfonato pueden suministrarse en forma de sales (v.g., sales de sodio, potasio, litio, o amonio) o, preferiblemente, como ácidos libres.

15

Tabla 1. Compuestos ilustrativos de ácido fosfónico:

Nombre Químico	Estructura
Ácido tri (metileno fosfónico)	
Ácido 1-hidroxietilideno-1,1-diosfónico	
Ácido hexametileno diamina tetra (metileno fosfónico)	
Ácido dietilenotriamina penta (metileno fosfónico)	
Ácido etileno diamina tetra (metileno fosfónico)	
Ácido bis(hexametileno triamina penta (metileno fosfónico)	
Ácido aminometileno fosfónico	

Ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico	
Monoetanolamina difosfonato	

Unos cuantos usos ilustrativos de fosfonatos y fosfatos se dan a continuación, con respecto al tratamiento de un ZMW en el que una molécula de interés tal como una polimerasa debe inmovilizarse selectivamente en la superficie de sílice inferior de los núcleos de guiaondas ZMW. Será evidente que son aplicables consideraciones similares al tratamiento de otros sustratos híbridos. Como ejemplo, puede tratarse un chip de ZMW con un fosfonato para pasivar la superficie de óxido de aluminio del ZMW, y puede inmovilizarse luego una polimerasa cargada positivamente por fijación selectiva a la superficie de sílice cargada negativamente. Análogamente, el chip de ZMW puede tratarse con un fosfonato, un reactivo de captura que se puede utilizar para inmovilización subsiguiente de la polimerasa (v.g., neutravidina) puede inmovilizarse por fijación a la superficie de sílice, y después de ello puede inmovilizarse la polimerasa por fijación al agente de captura. En estos ejemplos, el fosfonato pasiva la superficie de óxido de aluminio, proporcionando polarización (v.g., por bloqueo del óxido de aluminio) y proporcionando una superficie con fijación inespecífica baja de análogos de nucleótidos, etc. En ejemplos afines, después de la inmovilización de la polimerasa o el agente de captura, se forma una multicapa de polielectrólito sobre las superficies de óxido de aluminio para pasivarlas. Pueden emplearse también fosfonatos y fosfatos en combinación con compuestos que modifican selectivamente las superficies de sílice del ZMW. Así, por ejemplo, la superficie de óxido de aluminio puede pasivarse y/o bloquearse con un fosfonato, y pueden emplearse luego uno o más reactivos de silano para modificar la superficie de la sílice (o viceversa, precediendo la modificación de la superficie de sílice a la deposición del fosfonato).

En una clase de realizaciones, el compuesto de fosfato o fosfonato sirve como la primera capa sobre la cual se construye una multicapa de polielectrólito sobre la superficie, v.g., por deposición sucesiva de polielectrólitos con carga opuesta como se ha descrito arriba. En una clase de realizaciones afines, se forma sobre la superficie una multicapa producida por quimisorción. La multicapa producida por quimisorción puede incluir, v.g., capas alternantes de un reactivo que contiene multi-fosfonato (por ejemplo, un difosfonato, tal como ácido 1,n-alkil-difosfónico, o un polifosfonato, tal como polivinilfosfonato) y ligandos de circonio(IV). El ligando de circonio(IV) para el fosfonato puede proporcionarse aportando un precursor tal como *t*-butóxido de circonio, acetilacetato de circonio, o etóxido de circonio, del cual el fosfonato desplaza el ligando alrededor del circonio. Las multicapas pueden formarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por inmersión alternativa del sustrato o la superficie en una solución del fosfonato y en una solución del precursor de circonio (con un paso intermedio de reasociación térmica), o por inmersión alternativa en una solución del fosfonato con deposición en fase vapor de productos químicos organometálicos (MOCVD) o deposición térmica rápida en fase vapor de productos químicos (RT-CVD) del circonio (con un paso de reasociación en caso necesario). Tales multicapas producidas por quimisorción son robustas, y son similares a las multicapas de polielectrólito pero con la ventaja de tener el equivalente de "reticulaciones" producidas por quimisorción entre las capas adyacentes en lugar de reticulaciones físicas electrostáticas como las multicapas de polielectrólito.

En otro aspecto, pueden emplearse procesos termodinámicos o limitados por difusión en la activación y/o desactivación selectivas de regiones deseadas o no deseadas. En particular, pueden disponerse grupos activos de acoplamiento sobre una superficie de sustrato, con inclusión del interior de estructuras ZMW, y pueden proporcionarse en forma activa. Los mismos se desactivan luego subsiguiente y selectivamente por exposición del sustrato a grupos de obturación o bloqueantes que evitarán cualquier acoplamiento adicional a dichos grupos. Dado que los grupos de acoplamiento que están presentes en las regiones deseadas residen dentro del ZMW, v.g., en la superficie del fondo, la difusión de los agentes protectores o bloqueantes a estos grupos está un tanto limitada. Como resultado, tales grupos de acoplamiento serán menos propensos a quedar bloqueados (probablemente serán los últimos grupos a ser bloqueados), y pueden utilizarse para acoplar las moléculas de interés hacia la superficie del fondo del ZMW. En particular, por control del tiempo de exposición del sustrato como un todo al agente bloqueante, la concentración del agente bloqueante, y otras condiciones de la reacción de protección, v.g., temperatura, etc, es posible controlar el grado en el que los grupos de acoplamiento dentro del guiaondas llegarán a ser bloqueados o protegidos. En este aspecto de la invención, se apreciará que el componente bloqueante no precisa fijarse específicamente a ningún grupo de acoplamiento particular para prevenir el acoplamiento de la molécula de interés. En algunos casos, tales grupos de bloqueo u obturadores pueden evitar dicha fijación por su presencia dentro del guiaondas u otras porciones de la superficie. Esto puede incluir materiales de recubrimiento hidrófobos o hidrófilos que pueden formar una

capa delgada o monocapa sobre la superficie y bloquear así la fijación de la molécula de interés, o que proporcionen una barrera espacial o estérica a la fijación a un grupo de acoplamiento dado sin fijarse realmente al componente de acoplamiento activo de los grupos de acoplamiento.

5 Los aspectos que anteceden de la invención se ilustran esquemáticamente en la Figura 6. Como se muestra, se proporciona una estructura de guíasondas 600 con un recubrimiento uniforme de grupos de acoplamiento 602 dispuestos sobre ella (representados como rombos abiertos). El contacto de la estructura global con los grupos de acoplamiento 604 (representados como círculos cerrados) da como resultado una obturación limitada por difusión dentro de la estructura de las guíasondas y, como consecuencia, deja grupos de acoplamiento más activos (no obturados) 602 hacia la superficie del fondo de la estructura de las guíasondas para acoplamiento de moléculas de interés en un paso de contacto subsiguiente.

15 Como se apreciará, el paso inicial de proporcionar grupos de acoplamiento activos sobre una superficie entera puede evitarse en los casos en que se desea simplemente acoplar grupos directamente a la superficie subyacente, v.g., grupos silanol sobre sustratos de vidrio, o análogamente. En particular, por bloqueo inicial de cualesquiera grupos de acoplamiento activos sobre la superficie durante un periodo relativamente corto, se bloquearán en primer lugar aquellos grupos que están más accesibles, v.g., no en el interior de las regiones del fondo de un ZMW. Una exposición subsiguiente más larga de los grupos de superficie parcialmente bloqueados u obturados a los grupos de acoplamiento que son capaces de fijarse a dichos grupos superficiales producirá tales grupos de acoplamiento inmovilizados sobre las regiones del fondo de las estructuras de las guíasondas. La cantidad de tiempo, concentración, temperatura y otras condiciones de cada paso pueden modificarse para proporcionar condiciones óptimas para cada uno de los pasos de bloqueo y pasos de acoplamiento, y puede determinarse basándose en características fácilmente identificables y experimentación simple.

25 Un enfoque alternativo a proporcionar de modo aditivo moléculas de interés en una localización deseada es por el atrapamiento óptico de la molécula en la localización deseada, v.g., utilizando técnicas de "pinzas" ópticas. En particular, utilizando el campo eléctrico fuertemente intensificado creado por energía láser enfocada dentro de un confinamiento óptico, tal como un ZMW, es posible aumentar la concentración de partículas tales como moléculas de interés, o concentrar su presencia dentro de la región focal de un ZMW y acoplar subsiguientemente la misma a un grupo de fijación localizado dentro de dicha región. La molécula de interés puede proporcionarse acoplada a grupos adicionales, v.g., avidina, estreptavidina, neutravidina, biotina, o partículas tales como perlas, v.g., perlas dispersas de heparina, o análogas, etc, con objeto de proporcionar una partícula suficientemente grande para el atrapamiento. El uso de dichas técnicas ópticas de atrapamiento/intensificación ha sido descrito en detalle respecto a ejercer fuerzas de atrapamiento sobre partículas tan pequeñas como 10 nm. Véase, v.g., Novotny, et al., Phys. Rev. Letts. 35 79(4): 645-648 (julio 1977).

40 Como un proceso alternativo o adicional a los procesos selectivos de activación/desactivación expuestos anteriormente, o más adelante, la presente invención puede incluir opcional o adicionalmente cualquier paso de modelización inicial para proporcionar grupos neutros o inertes en áreas en las que no se desea acoplar las moléculas de interés. Dicha modelización proporciona típicamente una selectividad grosera a la localización, en el sentido de que no se pretende específicamente producir la superficie selectiva final. Por ejemplo, en el contexto de micropocillos o nanopocillos, u otras estructuras proporcionadas en una superficie por lo demás planar, pueden imprimirse, aplicarse o modelizarse de cualquier otro modo grupos inertes sobre la superficie planar superior del sustrato sin deposición de dichos materiales en las nanoestructuras, v.g., ZMWs. Bloqueando en primer lugar las superficies no relevantes con grupos inertes, es posible depositar y acoplar luego grupos activos dentro de las áreas relevantes. De nuevo, en el contexto de una red de ZMW, dependiendo de la densidad de la red, v.g., el porcentaje de sustrato global ocupado por las estructuras de guíasondas, puede bloquearse una cantidad sustancial de superficie no relevante y evitar de este modo el alojamiento de moléculas de interés que podrían interferir en caso contrario con la aplicación final del dispositivo, v.g., por agotamiento del sustrato, formación excesiva de productos, etc.

50 Dicha modelización puede incluir estampación simple de las moléculas inertes sobre una superficie, con lo cual los grupos inertes no penetrarán en las depresiones de dicha superficie, o puede implicar patrones de impresión más complejos utilizando sellos producidos nanolitográficamente para proporcionar una deposición selectiva, impresión por chorro de tinta, o análogos, a fin de depositar selectivamente grupos inertes sobre la superficie total del sustrato. Un ejemplo del proceso de la invención se ilustra esquemáticamente en la Figura 7.

60 Como se muestra, un sustrato 700 que incluye una red de ZMWs 702 dispuesta en su superficie 704 (en el Panel I), se pone en contacto con un sustrato separado 706 que lleva un material imprimible 708 sobre el mismo, que evita el acoplamiento de grupos funcionales activos a la superficie del sustrato 704 (Panel II). Poniendo en contacto la superficie 704 con el material imprimible 708, el material se transfiere a la superficie 704 si bien no penetra en los ZMWs 702 (Paneles III y IV). Como resultado, se bloquea el acoplamiento subsiguiente de moléculas de interés a la superficie superior 704 del sustrato 700. El material imprimible puede incluir cualquiera de una diversidad de materiales diferentes que incluyen, v.g., grupos de asociación inertes en la superficie que capturan simplemente cualesquiera grupos activos en la superficie. Alternativamente, dicho material puede incluir materiales de recubrimiento que impiden la asociación con las moléculas de interés, v.g., materiales hidrófobos o hidrófilos, materiales altamente

cargados que repelen cualquier fijación u otra asociación, o materiales que proporcionan una barrera impenetrable a dichos materiales, v.g., recubrimientos de polímero, reservas, o análogos.

5 Como se apreciará, cualquiera de los procesos que anteceden puede practicarse en asociación con otros procesos descritos en esta memoria para aumentar adicionalmente la selectividad y/o localización de la superficie.

III. Procesos sustractivos

10 Como se ha indicado previamente, en aspectos alternativos, se emplean procesos sustractivos para proporcionar la o las moléculas de interés en las regiones deseadas de un sustrato y a la concentración y/o densidad de moléculas deseada. Como se ha indicado, los procesos sustractivos se caracterizan generalmente y se diferencian de los procesos aditivos arriba descritos, en que los mismos depositan la molécula de interés más ubicuamente, v.g., sobre una superficie de sustrato entera, incluso en las regiones deseadas. Subsiguientemente, se eliminan las moléculas de interés en exceso, v.g., que están localizadas en regiones no deseadas. En tales procesos sustractivos pueden emplearse una diversidad de procesos diferentes.

15 En un ejemplo, puede emplearse un proceso que es aproximadamente el inverso de los procesos fotoactivables arriba descritos. En particular, el acoplamiento de la molécula de interés puede realizarse a lo largo de la superficie del sustrato utilizando un enlazador o grupo de acoplamiento que puede escindirselectivamente. Una diversidad de químicas de enlazadores fotoescindibles se conocen en la técnica e incluyen enlazadores 2-nitro-bencilo (Véase, v.g. Rodebaugh, R.; Fraser-Reid, B.; Geysen, H. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7653-7656), así como varios otros tipos de enlazadores fotoescindibles conocidos, véase v.g., *Org. Lett.*, *2* (15), 2315 -2317, 2000.

20 En el contexto de la presente invención, un grupo de acoplamiento puede aplicarse en términos generales a una superficie de sustrato utilizando un grupo enlazador fotoescindible. La molécula de interés se acopla luego a los grupos de acoplamiento de modo sustancialmente no selectivo. La iluminación selectiva de áreas que están fuera de las regiones deseadas libera luego las moléculas de interés de estas áreas, dejando dichas moléculas sustancialmente acopladas de modo exclusivo dentro de las regiones deseadas. El lavado del sustrato separa luego las moléculas de cualquier interferencia potencial con la aplicación deseada.

25 Este aspecto de la invención se ilustra esquemáticamente en la Figura 8. En particular, se proporcionan grupos de acoplamiento 802 (representados como rombos abiertos) en un recubrimiento uniforme sobre la superficie de la estructura del guiaondas, pero están fijados a dicha superficie a través de grupos enlazadores fotoescindibles 804 (representados como círculos llenos). La superficie que queda fuera del área de interés, v.g., que no está en la superficie del fondo 806 del núcleo de ZMW, se expone luego a la luz (representada como las flechas onduladas 808) para escindir los grupos enlazadores en las regiones no deseadas, donde el acoplamiento no se desea finalmente, dejando aquellos grupos de acoplamiento en las regiones deseadas para acoplamiento subsiguiente, v.g., en la superficie del fondo 806, disponibles para acoplamiento.

30 Otro enfoque sustractivo para la inmovilización selectiva de moléculas de interés, particularmente dentro de pocillos nanoestructurados u otros espacios restringidos, v.g., confinamientos ópticos como ZMWs, utiliza componentes de desactivación, v.g., que desactivan la molécula de interés o componentes que ligan dicha molécula a la superficie, o causan de cualquier otro modo la digestión, desactivación, desprendimiento o eliminación de tales moléculas de la superficie. Para facilidad de exposición, se hace referencia en esta memoria a tales componentes como "componentes de desactivación" con indiferencia de si tales componentes degradan y/o digieren las moléculas de interés, desactivan tales moléculas, v.g., por fijación no reversible a sitios activos u otra modificación de tales moléculas de interés, o análogas, o meramente liberan las mismas de la superficie, v.g., por la escisión de un grupo enlazador o de cualquier otro modo.

35 Tales enfoques pueden depender de la termodinámica para evitar selectivamente la desactivación o eliminación dentro de un ZMW, a medida que la difusión de componentes de desactivación mayores, v.g., enzimas, es decir, proteasas u otros compuestos macromoleculares mayores, o análogos, se difundirán en un guiaondas más lentamente, de modo análogo a la obturación limitada por difusión de los grupos de acoplamiento representados en la Figura 6.

40 Alternativamente, el método puede estar basado en el uso de componentes adicionales para impedir que los componentes de desactivación tengan acceso a las moléculas de interés dentro del espacio restringido, v.g., un ZMW. Un aspecto particularmente preferido de dicha prevención implica el acoplamiento del componente de desactivación a un componente relativamente grande, tal como una perla u otra partícula, o una molécula agregación de moléculas polímeras de gran tamaño o, que son al menos parcialmente incapaces de entrar en el ZMW. A tales componentes mayores se hace referencia generalmente como componentes exclusivos dado que los mismos se clasifican o conforman de modo que estén al menos parcialmente excluidos de rebajos tales como ZMWs en los sustratos. Dado que el componente de desactivación está acoplado al componente exclusivo, el mismo es únicamente capaz o más capaz de acceder a moléculas de interés que las que se ven expuestas por o próximas a la superficie superior del sustrato que incorpora el o los ZMW(s), y son por tanto accesibles al componente de desactivación, y no a aquellas moléculas que están generalmente dentro de las estructuras.

De acuerdo con este aspecto de la invención, el componente de desactivación podría incluir moléculas digestivas, v.g., proteasas, tales como serina-proteasas, a saber, proteinasa K, subtilisina, y análogas, proteasas de treonina, proteasas de ácido aspártico, proteasas de cisteína, metaloproteasas, y ácido glutámico-proteasas, v.g., para digestión, escisión o liberación de moléculas basadas en proteínas o péptidos de interés o componentes enlazadores sea de modo inespecífico o específico, v.g., utilizando una proteasa diana para escindir una molécula enlazadora particular, v.g. una biotina. Alternativamente, tales componentes de desactivación podrían incluir enzimas de digestión de carbohidratos (denominadas también carbohidrasas), tales como celulasas y amilasas, o nucleasas, tales como exo- o endonucleasas, etc, para la digestión o escisión de moléculas enlazadoras basadas en carbohidratos o ácidos nucleicos, o las moléculas de interés. Este aspecto de la invención se ilustra esquemáticamente en la Figura 9.

Como se muestra, se proporciona una red 900 de estructuras de confinamiento, v.g., ZMWs 902 con moléculas de interés 904 depositadas aleatoriamente en toda su superficie, v.g., con inclusión de la superficie de la capa de revestimiento 908 y la capa de sustrato 915 (Paso I). Las partículas grandes, tales como perlas 912, que tienen componentes de desactivación inmovilizados en su superficie (o componentes que desactivan, escinden o alteran de cualquier otro modo las moléculas de interés), se ponen luego en contacto con la red 900. Dado que las perlas 912 son mayores que las aberturas de los guíaondas 902, los componentes de desactivación inmovilizados en las perlas son capaces únicamente de acceder y desactivar, digerir, escindir o desprender las moléculas de interés que están depositadas sobre superficies situadas fuera de las estructuras 902 o que están suficientemente próximas a la abertura de tales estructuras para ser accesibles por los componentes inmovilizados en las perlas 912. Como resultado, las moléculas que se encuentran por encima o cerca de la superficie fuera de las estructuras ZMW se desprenden o se desactivan de cualquier otro modo, quedando únicamente aquellas moléculas que están totalmente dentro del espacio restringido o exclusivo del guíaondas (Paso III). Este aspecto de la invención se ilustra también más adelante.

En aspectos afines, las perlas pueden estar provistas de un componente de fijación o reticulación que se fija o se reticula con o a la molécula de interés. Subsiguientemente, la perla puede retirarse mecánicamente de la superficie llevando consigo al menos una porción de las moléculas de interés.

Pueden utilizarse una diversidad de tipos diferentes de perlas, con inclusión de las perlas utilizadas generalmente en análisis químicos y bioquímicos, v.g., agarosa, acrílicas, de sílice, o perlas de poliacrilamida o análogas, u otros medios/matrices cromatográficos o de inmovilización de enzimas, tales como las matrices F7m o G3m, disponibles de MoBiTec, GmbH (Göttingen, Alemania), perlas magnéticas u otras perlas metálicas. Análogamente, los métodos para enlazar el componente de desactivación a las perlas pueden modificarse para conseguir los resultados deseados. Por ejemplo, pueden utilizarse grupos enlazadores que tienen diversas longitudes a fin de permitir la penetración del componente de desactivación parcialmente en un ZMW u otro espacio restringido. Análogamente, la rigidez de los enlazadores puede ajustarse por la estructura química y/o reticulación de los enlazadores a fin de proporcionar mayor o menor aptitud para que el componente de desactivación pueda entrar en un espacio confinado tal como un ZMW.

En un enfoque alternativo al uso de perlas, pueden utilizarse otros materiales de entramado para soportar el componente de desactivación y proporcionar a dicho componente accesibilidad a la superficie superior del sustrato global, y en algunos casos, un subconjunto de las superficies con rebajos en dicha superficie, v.g., un núcleo de guíaondas. En particular, el componente de entramado podría dar como resultado que el componente de desactivación no vea totalmente excluido de un rebajo dado en la superficie del sustrato, v.g., un núcleo de guíaondas en modo cero. A modo de ejemplo, el componente de desactivación puede proporcionarse ligado o acoplado a un entramado o molécula soportante que o bien está excluido(a) sólo parcialmente del rebajo o lo está únicamente cuando se proporciona en ciertas orientaciones. Por ejemplo, puede utilizarse una molécula lineal rígida o semirrígida, tal como un ácido nucleico bicatenario u otro polímero alargado rígido o semirrígido, que incluye el componente de desactivación, v.g., una proteasa acoplada al mismo en una localización intermedia. La molécula soportante tiene una longitud suficiente para que pueda moverse únicamente en el rebajo si está orientada adecuadamente, v.g., en el sentido de la longitud. Como resultado de la entrada en el rebajo en dirección longitudinal o de estar retenidas en la superficie superior, únicamente se desactivarán aquellas moléculas que se encuentran en la superficie superior o dentro del rebajo pero dentro del alcance del componente de desactivación. A modo de analogía, la molécula soportante y el componente de desactivación intermedio funcionan como un eliminador de hollín de chimenea para eliminar las moléculas de interés de la superficie superior del sustrato y a cierta distancia dentro de los rebajos, como viene dictado, al menos en parte, por el posicionamiento intermedio del componente de desactivación sobre la molécula soportante.

En el caso de una estructura de guíaondas en modo cero relativamente típica de aproximadamente 100 nm de grosor y 70 nm de diámetro, por ejemplo, podría utilizarse un oligonucleótido de DNA bicatenario de 150 nm de longitud con el componente de desactivación, v.g., una proteasa o análogo, fijado al mismo. El posicionamiento y el acoplamiento se realizan por química de acoplamiento covalente a un análogo de nucleótido que ha sido insertado en la secuencia de oligonucleótidos en una localización seleccionada a una distancia dada de uno o varios extremos. Dado que el DNA bicatenario es mecánicamente rígido, la porción central del oligonucleótido al que está fijado el componente de desactivación está alejada del extremo de la molécula soportante. Después de su entrada en un núcleo de guíaondas, únicamente el extremo de la molécula de DNA bicatenario soportante será capaz de alcanzar

el fondo del núcleo, y por tanto el componente de desactivación estará geométricamente restringido lejos del fondo del núcleo, u otro espacio confinado. Así pues, se retirarían las moléculas de interés que se encuentran en la superficie superior o en las paredes laterales de (por ejemplo) un ZMW, en tanto que una molécula de interés que se encuentre en o cerca del fondo del ZMW, v.g., dentro del volumen de iluminación, quedaría retenida. El acoplamiento posicional de los componentes de desactivación a los ácidos nucleicos bicatenarios puede llevarse a cabo por una diversidad de métodos. Por ejemplo, en el caso de las proteínas de acoplamiento, tales como proteasas u otras enzimas, a las moléculas soportantes de ácido nucleico, una proteasa u otra enzima puede ser activada con maleimida por conjugación con un reticulador bifuncional tal como GMBS (disponible de PIERCE). Esta proteína activada con maleimida puede acoplarse directamente a una sola cadena o a la cadena doble del DNA que posee una modificación tiol interna (v.g., una molécula THSS marcada internamente disponible de, v.g., Operon, Inc.). La modificación tiol se protege por medio de un disulfuro que es eliminado durante la conjugación con TCEP (disponible también de PIERCE). Análogamente, un ácido nucleico con un tiol interno puede conjugarse con un reticulador heterobifuncional (v.g., MAL-NHS, maleimida-N-hidroxisuccinimida) y conjugarse luego a una proteasa por una reacción amina-NHS. Pueden emplearse reacciones similares para conjugar DNA modificado con amino a una proteasa con tioles disponibles en o cerca de su superficie.

El proceso que antecede se ilustra esquemáticamente en la Figura 13. Como se muestra, un dispositivo ZMW 1300 incluye un núcleo 1302 dispuesto dentro de una capa de revestimiento 1304, que se extiende de nuevo hasta un sustrato transparente subyacente 1306. Como se muestra en el Panel I, cierto número de moléculas activas de interés, v.g., las moléculas de polimerasa 1308, están adsorbidas o acopladas de cualquier otro modo a la superficie del sustrato global, incluyendo tanto el interior de una región de iluminación deseada (como se indica por la línea de trazos 1310), como la superficie superior 1312 y las superficies de las paredes superiores del núcleo 1302. En el contexto de la invención, y como se muestra en el Panel II, un componente de desactivación, tal como una molécula de proteasa 1314, está acoplada en una localización intermedia a una molécula soportante rígida, lineal o alargada, tal como la molécula de dsDNA 1316. Debido a su tamaño y su rigidez estructural, la molécula soportante 1316 con el componente de desactivación asociado 1314 penetra únicamente en el núcleo 1302 de la estructura del guiaondas 1300 en una orientación frontal, o se extiende a través de la superficie superior 1312 de la estructura global. Como resultado de esto, únicamente las polimerasas que están dispuestas por encima de la superficie superior o dentro del alcance del componente de desactivación, que penetra una distancia parcial en el núcleo del guiaondas se verán potencialmente afectadas por el componente de desactivación. Como tales, las moléculas de polimerasa que se encuentran en o cerca de la superficie del fondo del núcleo del guiaondas, v.g., dentro de la región de iluminación, evitarán la desactivación (Panel III). Como puede apreciarse, el posicionamiento del componente de desactivación y/o la rigidez de la molécula soportante pueden seleccionarse generalmente para ajustar la profundidad dentro de una estructura de núcleo a la cual puede tener lugar la desactivación.

Como se ha indicado arriba, el componente de desactivación es opcionalmente una proteasa tal como Proteinasa K que digiere inespecíficamente la molécula activa o un grupo de acoplamiento etc., eliminándolo con ello de la superficie del sustrato. En otras realizaciones, el componente de desactivación es una proteasa de acción específica (v.g., enteroquinasa, trombina, proteasa TEV, o cualquiera de la diversidad de otras proteasas de acción específica disponibles en la técnica). El uso de una proteasa de acción específica puede evitar la escisión autoproteolítica de la proteasa del componente exclusivo, lo que podría liberar proteasa activa soluble capaz de acceder indeseablemente al volumen de iluminación óptimo confinado de las estructuras.

Una realización ilustrativa que emplea una proteasa de acción específica se ilustra esquemáticamente en la Figura 14. Como se muestra, un dispositivo ZMW 1400 incluye un núcleo 1402 dispuesto dentro de una capa de revestimiento 1404, que se extiende de nuevo hasta una capa transparente subyacente 1406. En este ejemplo, la molécula de polimerasa 1408 está enlazada covalentemente a biotina 1420 a través del enlazador peptídico 1421, que incluye un sitio de reconocimiento de escisión para la proteasa de acción específica 1415. La fijación de la biotina 1420 a la estreptavidina 1409, que está fijada a su vez a la biotina 1422 que está adsorbida o acoplada de cualquier otro modo a la superficie del sustrato, acopla la polimerasa 1408 a la superficie. Como se muestra en el Panel I, cierto número de moléculas activas de interés, v.g., las moléculas de polimerasa 1408, están acopladas a la superficie del sustrato global, incluyendo tanto el interior de una región de iluminación deseada (como se indica por la línea de trazos 1410) como las superficies de las paredes superiores del núcleo 1402 (y opcionalmente también la superficie superior 1412). Como se muestra en el Panel II, la escisión del enlazador 1421 por la proteasa 1415 desprende la polimerasa 1408 de la superficie. La molécula de proteasa de acción específica 1415 está acoplada en una localización intermedia a una molécula soportante rígida, lineal o alargada, tal como la molécula de dsDNA 1416. Como en el caso de las realizaciones arriba descritas, debido a su tamaño y su rigidez estructural, el componente exclusivo 1416 con la proteasa asociada 1415 penetra únicamente en el núcleo 1402 de la estructura 1400 del guiaondas en una orientación frontal, o se extiende a través de la superficie superior 1412 de la estructura global. Como resultado de esto, únicamente las polimerasas que están dispuestas por encima de la superficie superior o dentro del alcance del componente de desactivación que penetra hasta una distancia parcial en el núcleo del guiaondas se ven potencialmente afectadas por el componente de desactivación. Como tales, las moléculas de polimerasa que están dispuestas en o cerca de la superficie inferior del núcleo del guiaondas, v.g., dentro de la región de iluminación, se mantendrán fijadas a la superficie dado que sus enlazadores están inaccesibles a la proteasa y no son escindidos.

Otra realización ilustrativa que emplea una proteasa de acción específica se ilustra esquemáticamente en la Figura 15. Como se muestra, el dispositivo ZMW 1500 incluye un núcleo 1502 dispuesto dentro de la capa de revestimiento 1504 que se extiende hasta la capa transparente subyacente 1506. En este ejemplo, como se ilustra en el Panel I, el grupo de acoplamiento biotina 1522 está acoplado a la superficie del sustrato global por el enlazador peptídico 1521, que incluye un sitio de reconocimiento de escisión para la proteasa de acción específica 1515. La escisión del enlazador 1521 por la proteasa 1515 desprende la biotina 1522 de la superficie. Dado que la proteasa 1515 está acoplada al componente exclusivo DNA bicatenario 1516 como se muestra en el Panel II, la proteasa desprende la biotina 1522 de la superficie en todos los puntos excepto en la porción más baja del núcleo 1502. Como se muestra en el Panel III, la estreptavidina 1509 (o neutravidina, etc.) y la polimerasa 1508 acoplada a la biotina 1520 se depositan luego sobre el sustrato y son retenidas por fijación a la biotina 1522 únicamente en el volumen de iluminación óptimo confinado 1510.

Otro método sustractivo alternativo para la localización selectiva de moléculas de interés implica el uso de la actividad propia de dicha molécula contra ella dentro de las regiones no deseadas. Por ejemplo, en el caso de las enzimas polimerasa de ácido nucleico inmovilizadas, se ha determinado que tales enzimas, cuando incorporan nucleótidos marcados fluorescentemente bajo iluminación excitadora, pueden sufrir desactivación sustancial como resultado de fotodeterioro. De acuerdo con los aspectos sustractivos de la presente invención, por sometimiento de las enzimas en la superficie superior de un sustrato de guíaondas a iluminación prolongada durante la síntesis del ácido nucleico en presencia de nucleótidos o análogos de nucleótidos marcados fluorescentemente, pueden desactivarse eficazmente dichas moléculas. Como en el caso de los enfoques aditivos arriba descritos basados en activación/desactivación, se apreciará que la iluminación causante del deterioro no penetraría hasta la superficie del fondo, o área de interés, del ZMW, y por consiguiente tales enzimas presentes en estas localizaciones se mantendrán activas. La desactivación de polimerasas mediada por fluoróforos se expone con detalle en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/293040, cedida al mismo cesionario y presentada en fecha 2 de diciembre de 2005. Podría esperarse que otros pares enzima/sustrato fluorescente produjeran características similares, v.g., proteínas fijadoras de ATP/ATP marcadas fluorescentemente. Adicionalmente, pueden emplearse otros componentes que generen radicales por irradiación, que deteriorarán aquellas moléculas que están dentro del contacto difusivo. Por iluminación de la superficie superior de una estructura de guíaondas en presencia de tales compuestos, por ejemplo, podrían generarse radicales libres oxígeno u otros, que desactivarán las moléculas de interés dentro del alcance difusivo de tales compuestos. Una diversidad de dichos compuestos se conocen en la técnica e incluyen, v.g., azul de metileno, hipocrellina A, hipocrellina B, hipericina, Diacetato de Rosa Bengala, Merocianina 540, y otros tintes disponibles de, v.g., Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR.).

En otro aspecto de la invención, las características estructurales de un sustrato pueden emplearse activamente en la selección sustractiva de moléculas de interés. En particular, los sustratos que incluyen confinamientos ópticos, tales como ZMWs, incluyen típicamente una capa metálica depositada sobre una capa transparente, v.g., vidrio o cuarzo, a través de la cual se disponen los guíaondas, dejando expuesto el sustrato transparente en la superficie del fondo del guíaondas. De acuerdo con la invención, un sustrato global que incluye moléculas de interés acoplados ambos a la capa metálica y la capa de vidrio puede distribuirse selectivamente, v.g. separando las moléculas de interés de las superficies metálicas, por aplicación de un potencial eléctrico entre la capa metálica y la solución depositada sobre ella, v.g., por el uso de un electrodo en contacto con dicho fluido. Dado que el sustrato subyacente no es eléctricamente conductor, el campo entre la superficie del sustrato y el fluido será sustancialmente menor que el existente entre la capa metálica el fluido. El potencial eléctrico puede emplearse entonces para impulsar selectivamente las moléculas de interés desde la superficie metálica hasta la solución (véase la Figura 10). Esta fuerza impulsora puede seleccionarse y/o controlarse para dar como resultado fuerzas electroforéticas, v.g., que conducen las moléculas cargadas de interés lejos de la superficie en las regiones superficiales no deseadas o que dirigen los grupos de obturación hacia dichas superficies, o alternativa o adicionalmente, cambios en el ambiente local de la superficie metálica, v.g., cambios de pH resultantes de la generación de protones en la superficie metálica, que dan como resultado el desprendimiento de la superficie, v.g., por el uso de enlazadores lábiles en medio ácido, enlaces basados en cargas, v.g., enlaces de hidrógeno, degradación hidrolítica de moléculas de interés en las superficies metálicas por la generación de ambientes localmente agresivos, o análogos.

En otro aspecto, pueden emplearse compuestos enlazadores susceptibles de desprendimiento por vía electroquímica para desprender las moléculas de interés de superficies eléctricamente activas. A modo de ejemplo, moléculas enlazadoras que incluyen acoplamiento electroquímicamente controlable pueden modelizarse sobre la superficie global de un sustrato híbrido (metal/aislante). La aplicación de una corriente a través de la porción metálica de la superficie da como resultado el desprendimiento de la molécula acoplada. Ejemplos de tales enlazadores eléctricamente conmutables incluyen monocapas autoensambladas de biotina unidas a compuestos enlazadores que llevan ésteres quinona-propiónicos, a saber, alcanotiolatos sobre superficies de oro. La aplicación de un potencial al sustrato metálico subyacente da como resultado la reducción de la quinona a hidroquinona, que sufre rápidamente lactonización con el desprendimiento de la molécula ligada, v.g., biotina (véase, v.g., Hodneland, et al., J. Am. Chem. Soc. 2000, 122:4235-4236).

Además del uso de tales métodos en confinamientos ópticos, se apreciará que dichos procesos de selección e inmovilización electroforéticos y/o electroquímicos pueden aplicarse análogamente a otros tipos híbridos de sustrato analítico, con inclusión, v.g., de sensores basados en metales o semiconductores que dependen de moléculas de

interés asociadas a la superficie, v.g., ChemFETS (transistores de efecto de campo químico), y análogos. En particular, el elemento sensor metálico o semiconductor puede emplearse como un electrodo en la repulsión o atracción de grupos diferentes desde o hacia la superficie del sensor a fin de mejorar el acoplamiento.

5 Otros procesos sustractivos pueden emplear métodos de levantamiento en los cuales una superficie activa de cualquier otro modo se recubre con una capa de levantamiento que arrastra las moléculas de interés que se encuentran en la superficie superior del sustrato, y que en algunos casos penetra cierta distancia en un ZMW. El levantamiento de la capa lleva consigo las moléculas de interés arrastradas, permitiendo que las no arrastradas, v.g., aquéllas que se encuentran en la superficie inferior del ZMW, queden retenidas.

10 Esta técnica se ilustra esquemáticamente en la Figura 11. Como se muestra, una distribución uniforme o aleatoria de moléculas de interés 1104 está depositada sobre un sustrato 1100 que incluye regiones seleccionadas en las cuales se desean tales moléculas (Paso I). En el caso de la Figura 11, dichas áreas incluyen confinamientos ópticos semejantes a ZMWs 1102. Una capa de recubrimiento 1106 se deposita luego sobre la superficie como un líquido viscoso, v.g., que tiene una viscosidad de 1 o mayor (Paso II). Debido a su viscosidad relativa y a las dimensiones relativamente pequeñas de los guíaondas 1102, y/o la difusión relativamente lenta del material en un material líquido presente en el núcleo del guíaondas, la capa de recubrimiento 1106 no fluirá típicamente por completo en la estructura del guíaondas. La capa de recubrimiento se deja curar luego típicamente, v.g., por secado al aire, calentamiento o exposición a radiación UV, reticulación química, arrastrando las moléculas de interés dentro de la capa de recubrimiento, v.g., las moléculas de interés 1108. Al retirarse, cualesquiera moléculas de interés arrastradas en la capa de recubrimiento se retiran también, quedando únicamente aquellas moléculas de interés que estaban muy dentro de la estructura del guíaondas, v.g., las moléculas 1110 (Paso III). Aunque el método arriba descrito depende de la capacidad limitada de la capa de recubrimiento para penetrar en la estructura del guíaondas a fin de dejar las moléculas de interés dentro de dichas estructuras, se apreciará que tales métodos pueden aplicarse en ausencia de dichas estructuras restringidas. Por ejemplo, la capa de recubrimiento puede estar modelizada selectivamente en la superficie, v.g., por métodos de cribado o de impresión por chorro de tinta, para arrastrar y retirar las moléculas de interés de regiones seleccionadas.

30 Otro proceso sustractivo de inmovilización selectiva depende generalmente de estrategias de enmascaramiento para asegurar la localización de la molécula de interés en lugar deseado. En particular, dichas estrategias de enmascaramiento utilizan típicamente una capa de enmascaramiento que puede retirarse para eliminar moléculas de interés de localizaciones no deseadas, o que está depositada sobre una población uniformemente distribuida de las moléculas de interés para hacer aquéllas que se encuentran en localizaciones no deseadas inaccesibles para la operación deseada.

35 Otras técnicas más sencillas de fuerza bruta están comprendidas también en ciertos aspectos de la invención, relacionados particularmente con procesos sustractivos. Por ejemplo, pueden utilizarse procesos simples de ablación para eliminar grupos de acoplamiento de superficies expuestas, v.g., superficies situadas sobre o cerca de las superficies superiores de sustratos de redes de guíaondas. Podría esperarse que la eliminación de tales grupos reduzca la cantidad de moléculas de interés que están fijadas a las superficies situadas fuera de la estructura del guíaondas. Tales procesos de ablación incluyen, v.g., técnicas de ablación por láser, técnicas de ablación por fluidos con cizallamiento alto, técnicas de abrasión mecánica, y análogas que eliminarán materiales por contacto o exposición. Por direccionamiento de dichos procesos de ablación a las superficies superiores, es de esperar que poco o nada de las fuerzas de ablación se propague en el interior de las estructuras de guíaondas. Pueden hacerse ajustes adicionales para mejorar ulteriormente la selectividad del proceso. Por ejemplo, utilizando técnicas de ablación láser, podría dirigirse el haz en un ángulo oblicuo a la superficie superior del sustrato, penetrando con ello solamente una distancia mínima en rebajos de ratio de dimensiones altas, v.g., ZMWs. Análogamente, podría modularse la energía de ablación para enfocarla en regiones que no incluyeran las regiones en las cuales se desea el acoplamiento final de moléculas de interés, v.g., enfocarse en regiones de la superficie del sustrato o espacios entre los ZMWs en una red.

50 Una vez que se han proporcionado los grupos de acoplamiento sobre la superficie del sustrato, v.g., de las regiones deseadas tales como en la superficie inferior de un ZMW, las moléculas de interés se acoplan luego a dichos grupos activos. Como se indica en otro lugar de esta memoria, el acoplamiento puede tener lugar por la vía de grupos funcionales químicos, v.g., grupos hidroxilo, grupos amino, grupos epoxi o análogos. Alternativamente, el acoplamiento puede tener lugar mediante parejas de fijación específicas, v.g., donde un miembro de un par de fijación específico es el grupo de acoplamiento fijado a la superficie (o está fijado a un grupo de acoplamiento que está fijado a la superficie), y el otro miembro del par de fijación está unido a o es integral con la molécula de interés. En aspectos particularmente preferidos, dichos pares de fijación específicos se utilizan para acoplar la molécula de interés a la superficie, incluyendo, v.g., el uso de avidina, estreptavidina o neutravidina como un miembro del par de fijación, y biotina como el otro miembro. Adicionalmente, pueden emplearse estrategias de fijación sándwich, v.g., acoplamiento de biotina a la superficie en el área de interés, seguido por enlace con avidina, que está enlazada a su vez a una molécula de biotina acoplada a la molécula de interés. Típicamente, se utiliza un grupo enlazador de silano como el grupo funcional inicial. Este grupo puede proporcionarse en la superficie directamente o, como se ha hecho alusión previamente, diluido con silanos enlazadores similares que son inertes al acoplamiento adicional. En aspectos particularmente preferidos, un silano enlazador que lleva, v.g., un grupo biotina se inmoviliza en el paso inicial, seguido por acoplamiento de una molécula de interés, v.g., una enzima polimerasa, a través de un grupo puente avidina

acoplado con un grupo biotina enlazado a una enzima. Como se apreciará, cualquiera de una diversidad de configuraciones diferentes puede practicarse dentro del contexto de la invención.

En el caso de moléculas de interés que son enzimas o proteínas activas de cualquier otro modo, la orientación de la inmovilización puede ser una característica importante para optimizar la actividad de la enzima. Por ejemplo, en el caso de las DNA-polimerasas, la adsorción aleatoria de las polimerasas a una superficie puede producir sustancialmente menos de 100% de actividad, al menos parcialmente como resultado de que algunas moléculas se orientan de un modo que impide que las mismas exhiben actividad óptima. Así, puede ser deseable disponer una orientación específica de la molécula proporcionando un grupo o grupos de anclaje en la molécula para aumentar la probabilidad de orientación correcta. Tales métodos han sido descritos previamente en la Solicitud de Patente U.S. No. 60/753.446, del mismo propietario, presentada el 22 de diciembre de 2005. Alternativamente, puede proporcionarse la enzima con una molécula de sustrato o símil-sustrato que puede impedir la adsorción de la superficie de una manera que bloquea el sitio activo de la enzima. A modo de ejemplo, se ha determinado que la inmovilización de enzimas polimerasa de ácido nucleico, tales como DNA-polimerasas, en presencia de moléculas molde de ácido nucleico produce una actividad sustancialmente mayor de las polimerasas inmovilizadas en la superficie. Sin que ello signifique quedar ligados a una teoría de operación particular, se cree que la presencia de la molécula molde dentro del sitio activo de la polimerasa impide la inmovilización de la polimerasa de una manera que interfiere con el sitio activo, debido a interferencia estérica o de otro tipo del molde asociado. Si bien pueden utilizarse moléculas molde de ácido nucleico, se pueden utilizar también otras moléculas semejantes a moldes, con inclusión, v.g., de cadenas de polímero LNA, polímeros PNA, u otros análogos de ácido nucleico.

IV. Ejemplos

Ejemplo 1: Grupos Fotoactivables para Inmovilización Selectiva de DNA-Polimerasas

Puede utilizarse un sustrato que incluye una capa sustrato de vidrio con una capa de revestimiento de aluminio depositada sobre la capa de vidrio. Se fabrica una red de núcleos de ZMW en la capa de revestimiento para proporcionar aberturas a través de la capa de revestimiento hasta el sustrato de vidrio. El sustrato global se trata después opcionalmente de modo adicional para proporcionar una capa aislante delgada sobre la capa de revestimiento y los núcleos, v.g., a fin de proporcionar una superficie sustancialmente uniforme. Tales capas incluyen típicamente recubrimientos de SiO₂ aplicados por técnicas de deposición de vapor, que incluyen, v.g., métodos CVD y MVD, así como otros métodos tales como deposición fluida o formación in situ que utilizan, v.g., sistemas de giro sobre vidrio ('spin on glass'). La superficie del sustrato se derivatiza para proporcionar primeramente una población relativamente uniforme de grupos terminados en amino acoplados a la superficie. Por ejemplo, para superficies de vidrio, dicha derivatización emplea típicamente químicas estándar de aminosilanos conocidas en la técnica. Alternativamente, pueden proporcionarse grupos amina sobre una molécula enlazadora que está acoplada a la superficie a través de grupos hidroxilo existentes o superficies derivatizadas de otro modo. Tales grupos de acoplamiento pueden proporcionarse a densidades limitadas a fin de controlar ulteriormente la densidad de las moléculas de interés que se fijaran finalmente a la superficie (véase, v.g., la Solicitud de Patente U.S. No. 11/240.662, presentada el 30 de septiembre de 2005, cedida al mismo cesionario).

Las moléculas de biotina protegidas con un grupo protector fotolábil apropiado, tal como MeNPOC, se acoplan luego a la superficie derivatizada utilizando químicas conocidas, v.g., a través de un grupo epoxi incluido en la molécula de biotina.

A continuación del lavado de la superficie, se dirige una radiación de iluminación apropiada al sustrato a través de la capa de sustrato de vidrio transparente, iluminando y desprotegiendo únicamente los grupos biotina en o cerca de la superficie del fondo del ZMW. Una enzima DNA-polimerasa enlazada a avidina, estreptavidina o neutravidina se pone luego en contacto con el sustrato y se fija selectivamente con la biotina expuesta en el fondo de los guíasondas.

En un segundo proceso ilustrativo, un grupo ácido fotoactivable, v.g., éster α -metilfenacilo acoplado a la superficie, se acopla a la superficie del mismo modo estipulado anteriormente. La iluminación, v.g., a 313 nm, a través del ZMW produce los grupos ácidos en la superficie del fondo de los guíasondas, los cuales se ponen luego en contacto con los grupos amino de la biotina, seguido por acoplamiento a enzimas polimerasa enlazadas a avidina, a fin de proporcionar grupos enzima únicamente en o cerca de la superficie del fondo de los guíasondas.

Ejemplo 2: Digestión Selectiva de las Enzimas DNA-Polimerasa Utilizando Proteasas Fijadas a Perlas

ZMWs que se habían tratado previamente en plasma en presencia de una empaquetadura de PDMS (para proporcionar una capa de imprimación), se proporcionaron con DNA-polimerasa $\Phi 29^{N62D}$ (complejada con un ácido nucleico molde circular) adsorbida superficialmente de modo sustancialmente uniforme sobre toda la superficie de la red, incluso sobre la superficie superior de la capa de revestimiento.

La red se puso luego en contacto con perlas que llevaban Proteinasa-K inmovilizada (Sigma Chemical Co., P0803 o P9290) durante 5 minutos a la temperatura ambiente en Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, β -mercaptoetanol 10 mM, y EDTA 1 mM. El diámetro de las perlas sobrepasaba con mucho el diámetro nominal de los núcleos del guíasondas en la red, impidiendo la entrada a la perla o sus moléculas de proteasa asociadas en los núcleos en cualquier grado sustancial.

La mezcla de la reacción de polimerización que incluía cuatro dNTPs se puso luego en contacto con la red en condiciones adecuadas para la síntesis de DNA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 75 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, MnCl_2 0,7 mM), y se dejó que transcurriera la síntesis durante 30 minutos a 30°C.

5 A continuación de la síntesis, cualquier DNA sintetizado en la red se tiñó con el tinte SybrGold. Se obtuvo luego una imagen de la red utilizando un microscopio estándar de fluorescencia. Las imágenes de la red, así como imágenes del experimento de control negativo, se muestran en la Figura 12. Como se muestra en el control negativo (Fila I), la iluminación lateral desde el fondo (Columna A) muestra la presencia de una cantidad significativa de DNA dentro de las estructuras de los guíaondas, mientras que la iluminación y observación desde el lado superior (Columna B) muestra una capa uniforme de DNA producida en toda la superficie de la red. En la red tratada con proteinasa (Fila II), tanto el lado inferior (Columna A) como el lado superior (Columna B) exhiben un patrón similar de presencia de DNA dentro de guíaondas específicos. Adicionalmente, como puede verse, existe poco DNA presente sobre la superficie superior aparte del existente en el interior de los guíaondas de la red, mostrando una reducción sustancial del alto nivel de síntesis de DNA presente en el experimento de control. Merece ser indicado también que los guíaondas que muestran la presencia de DNA de la superficie superior siguen la pista de los mismos guíaondas que muestran la presencia de DNA de la superficie inferior, lo que indica que la síntesis de DNA está ocurriendo dentro de la estructura del guíaondas, y no fuera del núcleo del guíaondas. Esto indica también que el DNA que se sintetiza dentro de la estructura del guíaondas es de una longitud sustancial, v.g., mayor de 500 bases, potencialmente hasta 1000 o más bases de longitud, dado que abarca las regiones de iluminación en las porciones superior e inferior de una estructura de guíaondas que tiene una región de núcleo de aproximadamente 70 nm de diámetro y 100 nm de grosor.

Se realizaron también experimentos de síntesis de DNA en presencia de análogos de nucleosido-polifosfato marcados, que estaban marcados en el grupo fosfato terminal (véase, v.g., la Solicitud de Patente U.S. No. 2003-0044781 Publicada y Levene, et al., Science (2003) 299:609-764. Estos ensayos indicaban ratios de señal a ruido sustancialmente mejores que las redes de guíaondas que no se habían tratado con proteinasa, demostrando una interferencia notablemente menor procedente de otras fuentes de ruido, v.g., marcadas por productos de la reacción de la polimerasa. Como resultado, parece estar claro que la provisión de moléculas de interés tales como enzimas polimerasa únicamente dentro de una región deseada de un sustrato analítico, es decir una región de observación, puede dar resultados muy beneficiosos en la aplicación a la cual va a destinarse el sustrato.

Ejemplo 3: Inmovilización Selectiva de DNA-Polimerasas por Modificación Diferencial de Superficies

A continuación se expone una serie de experimentos que demuestran la inmovilización selectiva de una DNA-polimerasa sobre la superficie del fondo de ZMWs y pasivación de las superficies restantes del ZMW con una multicapa de polielectrólito. El proceso, que aprovecha la reactividad diferencial de silanos con vidrio y óxido de aluminio, se ilustra esquemáticamente en la Figura 18. La silanización de PEG-biotina es específica para vidrio en las condiciones empleadas, dando por ello como resultado la derivatización química solamente de la superficie del fondo del ZMW. La capa de aluminio se pasiva luego utilizando una multicapa de polielectrólito, en este ejemplo, una multicapa 2,5x de PAA/PEI/PAA/PEI/PAA (donde PAA es poli(ácido acrílico) y PEI es poli(etilendiamina)). La polimerasa marcada con biotina es rechazada por la multicapa de polielectrólito, pero se fija a la superficie biotinilada de PEG por química de avidina, dando con ello como resultado una inmovilización polarizada de la polimerasa a la superficie del fondo del ZMW. Adicionalmente, la multicapa de polielectrólito limita la fijación inespecífica de los análogos de nucleótidos a la capa de aluminio.

45 La inmovilización polarizada de polimerasa en la superficie del fondo de ZMWs se realizó como sigue. Se limpian chips de ZMW en un plasma de oxígeno durante 2 minutos a 2 torr (ajuste a potencia media). La silanización de PEG-biotina se lleva a cabo durante 3 horas a 4°C utilizando una mezcla de PEG-metoxi-silano y biotin-PEG-silano (Polymer Source Inc.) en disolvente 270:1 (p/p) etanol:metanol. Las muestras se lavan con metanol, se tratan por ultrasonidos durante 3 minutos en agua caliente (70°C), y se lavan con agua fría. El procedimiento del polielectrólito consiste en una inmersión consecutiva de los chips durante 5 minutos a la temperatura ambiente en 20 mg/ml de ácido poliacrílico y polietilendiamina (Sigma-Aldrich, pH 7,5 ajustado con HCl), seguido cada paso por enjuagado 3x con agua, en el orden: PAA/PEI/PAA/PEI/PAA. El último lavado es con 5 equivalentes en volumen de agua.

Se comparó la fijación inespecífica de cuatro análogos nucleotídicos a la superficie de inmovilización polarizada (chips de ZMW tratado con la mezcla de PEG-silanos y seguido por formación de multicapa de polielectrólito) y a una superficie de control (un chip tratado con plasma-PDMS) (Figura 19). El tratamiento con plasma-PDMS utilizado sobre el chip de control elimina la polarización porque recubre toda la estructura con una capa uniforme; véase la Solicitud Internacional Número PCT/US 2006/045.429 presentada el 27 de noviembre de 2006. Los chips se incubaron con una mezcla de análogos de nucleótidos marcados fluorescentemente (A488-dA4P, FAM-A532-dG4P, FAM-A594-dT4P, A633-dC4P, todos y cada uno de ellos 5 μM ; véase, v.g., la Solicitud de Patente U.S. 11/645223 para nomenclatura de los análogos), y se sometieron a iluminación con láser. Se adquirieron imágenes durante 1 minuto a una velocidad de la cámara de 100 fps. Se analizaron las razas de fluorescencia por medio de un software de análisis fabricado ex-profeso, utilizando un algoritmo umbral para determinar el número de sucesos de adsorción inespecífica que se muestran en la gráfica para cada análogo separado espectralmente. Como se muestra en la Figura 19, la superficie de inmovilización polarizada es tan satisfactoria para prevenir la fijación inespecífica de los análogos como lo es la superficie plasma-PDMS (que exhibe características de fijación inespecífica satisfactorias).

La fijación de los análogos a una superficie sin tratar no se cuantificó, dado que los análogos se fijan a la superficie sin tratar en tal proporción que no pueden identificarse los pulsos individuales.

La deposición de multicapas de polielectrolito sobre una superficie de aluminio inhibe la fijación inespecífica de la polimerasa, como se ilustra en la Figura 20. Esencialmente no se observa síntesis alguna de DNA en la superficie de aluminio tratada con una multicapa de polielectrolito 2.5x PAA/PEI/PAA/PEI/PAA (Panel I), mientras que se produce DNA en toda la superficie de una superficie de control no tratada con la multicapa de polielectrolito (Panel II). Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo como sigue: se fijó polimerasa 100 nM a neutravidina (presente en exceso a 150 nM) en un tampón BF-300 que contenía Tris-acetato 25 mM, pH 7,5, acetato de potasio 300 mM, 0,05% de Tween 20 y ditiotreitól 5 mM durante 30 minutos a 4°C. La solución se diluyó hasta una concentración eficaz de acetato de potasio de 150 mM por dilución al doble con el mismo tampón que anteriormente pero que carecía de acetato de potasio (BF-0). La mezcla polimerasa/neutravidina se incubó durante 30 minutos a 4°C sobre el chip de ZMW, y se lavó 3x con tampón BF-150 (el mismo tampón que BF-300 pero con inclusión de acetato de potasio 150 mM). Se añadió el molde a 100 nM durante 20 minutos a 4°C, en tampón de reacción (Tris-acetato 50 mM, pH 7,5, acetato de potasio 75 mM, sulfato de amonio 20 mM, 0,05% de Tween 20 y ditiotreitól 5 mM) complementado con EDTA 4 mM. Se retiró la solución molde y se añadió la mezcla de la reacción de extensión, que contenía MnCl₂ 0,7 mM, 10 µM de cada dATP, Alexa Fluor ChromaTide 488-dCTP (Invitrogen), dGTP y dTTP en tampón de reacción. La síntesis de DNA procedió durante 10 minutos a la temperatura ambiente, seguido por 5 lavados con BF-150 complementado con EDTA 1 mM. La incorporación del nucleótido ChromaTide en el DNA se visualizó en un microscopio de fluorescencia con campo ancho (Olympus), utilizando una lente objetivo de fisiología 60x 0,9NA para obtener la imagen del lado superior (solución) de los chips de ZMW, y una lente objetivo 60x 1,2NA para el lado inferior.

El procedimiento de inmovilización polarizada (tratamiento del chip de ZMW con la mezcla de PEG-silanos seguido por formación de la multicapa de polielectrolito) da como resultado la inmovilización selectiva de la polimerasa en el interior de los guíaondas. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo como se describe en el párrafo anterior sobre un chip ZMW de inmovilización polarizada y sobre un chip ZMW de control (recubierto uniformemente, con una capa de plasma-PDMS por debajo seguido por derivatización con PEG-metoxi/biotin-PEG-silano). Las imágenes de la red de ZMW de inmovilización polarizada, así como imágenes de la red de control, se muestran en la Figura 21. Como se muestra en el control (Columna II), la iluminación desde el lado inferior (Fila B) muestra la presencia de una cantidad importante de DNA dentro de las estructuras de guíaondas, mientras que la iluminación desde el lado superior (Fila A) muestra una capa uniforme de DNA producida en toda la superficie de la red. En contraste, para la red ZMW de inmovilización polarizada (Columna I), tanto el lado inferior (Fila B) como el lado superior (Fila A) muestran un patrón similar de presencia de DNA dentro de guíaondas específicos. Adicionalmente, como puede verse, hay poco DNA presente en el lado superior aparte del interior de los guíaondas en la red, mostrando una reducción sustancial respecto al alto nivel de síntesis de DNA presente en el experimento de control. Es también digno de mención que los guíaondas que muestran la presencia de DNA desde la superficie superior siguen la pista de los mismos guíaondas que muestran la presencia de DNA desde la superficie inferior, lo que indica que la síntesis de DNA está ocurriendo dentro de la estructura del guíaondas, y no fuera del núcleo del guíaondas (véase la Figura 22, en la cual se superponen (Panel III) una imagen de la superficie superior de una red de ZMW de inmovilización polarizada (Panel I) y una imagen de la superficie inferior de la misma red (Panel II).

Estos resultados indican que la multicapa de polielectrolito es relativamente no adherente para los análogos de nucleótidos y que la multicapa de polielectrolito pasiva perfectamente contra la fijación de polimerasa a las superficies de aluminio. La química diferencial PEG-biotina-silano, seguida por pasivación de la multicapa de polielectrolito, produce una inmovilización polarizada de la polimerasa con contraste alto.

Ejemplo 4: Inmovilización y Pasivación Selectivas Utilizando un Ácido Fosfónico

La deposición de ácido polivinilfosfónico (PVPA) sobre ZMWs sin tratar da como resultado un ZMW que está pasivado respecto a proteínas inespecíficas (v.g., neutravidina y polimerasa) y la fijación de análogos de nucleótidos a la superficie de aluminio. PVPA es específico para aluminio y no afecta a la superficie de SiO₂ del fondo del ZMW, lo cual puede utilizarse para agente de captura inespecífico o inmovilización por polimerización o derivatización subsiguiente (v.g., por silanización o fijación de compuestos tales como PLL-PEG) para deposición específica de polimerasas.

El tratamiento de un sustrato de material mixto (v.g., película de aluminio de 100 nm sobre vidrio) con PVPA da como resultado inmovilización de un agente de captura de neutravidina preferentemente sobre la porción de SiO₂, en lugar de la porción de aluminio del sustrato, como se ilustra en la Figura 23. En un sustrato no tratado con PVPA, se deposita más neutravidina sobre la porción de aluminio del sustrato (Panel I, fila A) que sobre la porción de SiO₂ (Panel I, fila B). Por el contrario, en un sustrato tratado con PVPA, la neutravidina se inmoviliza preferentemente en la porción de SiO₂ del sustrato (Panel II, fila B), mientras que se adhiere poca neutravidina a la porción de aluminio del sustrato (Panel II, fila A).

Para evaluar la fijación de neutravidina, se limpian los chips de una capa de fotorreserva protectora enjuagándolos primeramente en acetona, seguido por enjuagado en isopropanol y secado con una corriente de nitrógeno. Se limpian los chips en un limpiador de plasma (Harrick) durante 2 minutos a 2 torr (ajuste de potencia media). El trata-

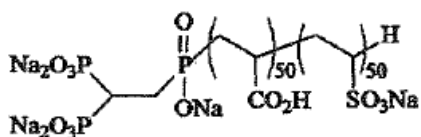
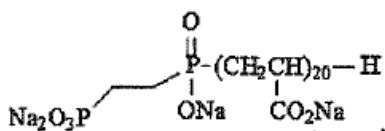
5 miento con PVPA tiene lugar en un bloque térmico ajustado a 90°C, se colocan los chips en el bloque térmico, y se aplica una solución de PVPA a 90°C (peso molecular 24.000, de Polysciences Inc. (Warrington, Pennsylvania), stock a 25% diluido hasta una concentración de solución de trabajo de 2% en agua) sobre el chip durante 2 minutos, seguido por enjuagado con agua. El exceso de agua se elimina por soplado con una corriente de nitrógeno, seguido por tratamiento térmico durante 10 minutos a 80°C en un horno seco. Se diluyen perlas de 40 nm de látex A488-neutravidina (Invitrogen) hasta 0,01% en tampón (MOPS-acetato 50 mM, pH 7,5, acetato de potasio 75 mM, DTT 5 mM) y se incuban con los chips durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Se enjuagan los chips con agua y se obtienen sus imágenes en un microscopio de fluorescencia con campo ancho, utilizando una lente objetivo de fisiología 60x 0,9 NA (Olympus).

10 El tratamiento con PVPA reduce la fijación de los análogos de nucleótidos, como se ilustra en la Figura 24. Los chips de ZMW se trataron con PVPA, y se analizó la fijación inespecífica de los análogos de nucleótidos a los chips como se ha descrito arriba en el Ejemplo 3. Como se muestra en la Figura 24, los análogos exhiben una fijación inespecífica considerable a un ZMW sin tratar (Panel II), en tanto que se observa poca fijación de análogos a un ZMW tratado con PVPA (Panel I).

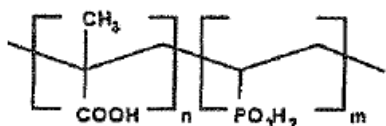
15 Aunque la descripción se ha hecho en cierto detalle para propósitos de ilustración, se apreciará fácilmente que pueden realizarse numerosas variaciones conocidas o apreciadas por los expertos en la técnica dentro del alcance de la presente invención. A no ser que esté clara otra cosa por el contexto o se indique expresamente, cualesquiera valores de concentración estipulados en esta memoria se dan generalmente en términos de valores de mezcla o porcentajes sin relación a ninguna conversión que ocurra durante o después de la adición del componente particular de la mixtura.

REIVINDICACIONES

1. Un método de proporcionar un sustrato que tiene una enzima inmovilizada selectivamente sobre él, comprendiendo el método:
 - proporcionar un sustrato que tiene un primer componente de la superficie que comprende SiO₂ y un segundo componente de la superficie que comprende un metal u óxido metálico;
 - poner en contacto el sustrato con una primera composición que se asocia selectivamente con el primer componente de la superficie, comprendiendo dicha primera composición un silano;
 - acoplar la enzima a la primera composición; y
 - poner en contacto el sustrato con una segunda composición que se asocia selectivamente con el segundo componente de la superficie, comprendiendo dicha segunda composición un compuesto que comprende uno o más grupos ácido fosfónico o fosfato,
2. El método de la reivindicación 1, en el cual el sustrato comprende una capa del segundo componente de la superficie sobre una capa del primer componente de la superficie, y en donde el sustrato comprende un guíaondas en modo cero dispuesto a través de la capa del segundo componente de la superficie hasta la primera capa del componente de la superficie.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual la primera composición comprende un primer grupo de acoplamiento, y en donde el acoplamiento de la enzima a la primera composición comprende acoplamiento de la enzima al primer grupo de acoplamiento.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual el primer grupo de acoplamiento comprende biotina.
5. El método de la reivindicación 1, en el cual la primera composición comprende un biotina-PEG-silano.
6. El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda composición comprende ácido polivinilfosfónico, ácido 2-carboxietil-fosfónico, ácido amino-tri(metilenofosfónico), ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfónico, ácido hexametileno-diaminatetra(metilenofosfónico), ácido dietileno-triamina-penta(metilenofosfónico), ácido etileno-diamina-tetra(metilenofosfónico), ácido bis(hexametileno-triamina-penta(metilenofosfónico)), ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico, difosfonato de monoetanolamina, un alquil-fosfato, un alquil-fosfonato, ácido octil-fosfónico, ácido decil-fosfónico, ácido dodecil-fosfónico, ácido hexadecil-fosfónico, ácido octadecil-fosfónico, ácido docosil-fosfónico, ácido hidroxi-dodecil-fosfónico, ácido hidroxi-undecenil-fosfónico, ácido decanodilbis(fosfónico), dodecilsulfato, hidroxi-dodecilsulfato,



o



7. El método de la reivindicación 1, en el cual la segunda composición comprende un segundo grupo de acoplamiento.
8. El método de la reivindicación 1, en el cual la enzima comprende una polimerasa.
9. El método de la reivindicación 1, en el cual el sustrato se pone en contacto con la segunda composición y se pone a continuación en contacto con la primera composición.
10. Un método que comprende, tras haber producido un sustrato por el método de la reivindicación 2, el paso adicional de emplear el sustrato para un análisis enzimático proporcionando iluminación a y recibiendo radiación electromagnética desde un volumen de observación del guíaondas en modo cero a través de la primera capa del componente de la superficie.

11. Un sistema, que comprende un sustrato producido por el método de la reivindicación 2, en el que el sistema proporciona iluminación a y deriva radiación electromagnética desde un volumen de observación del guíaondas en modo cero a través de la primera capa del componente de la superficie.

5

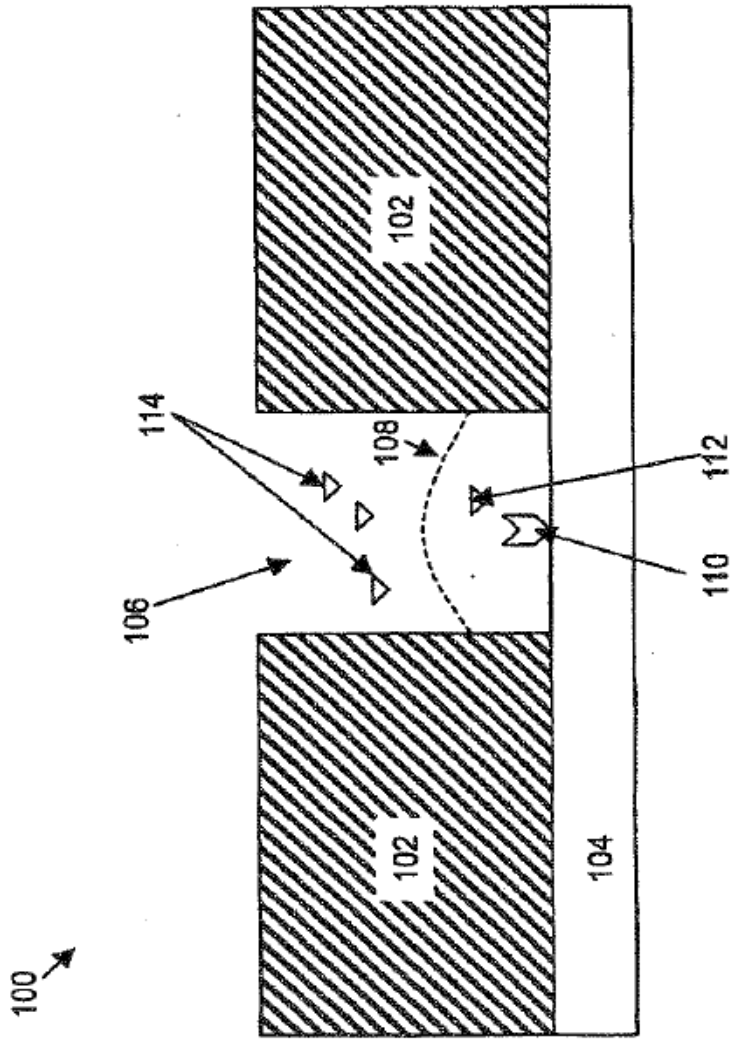


Fig. 1

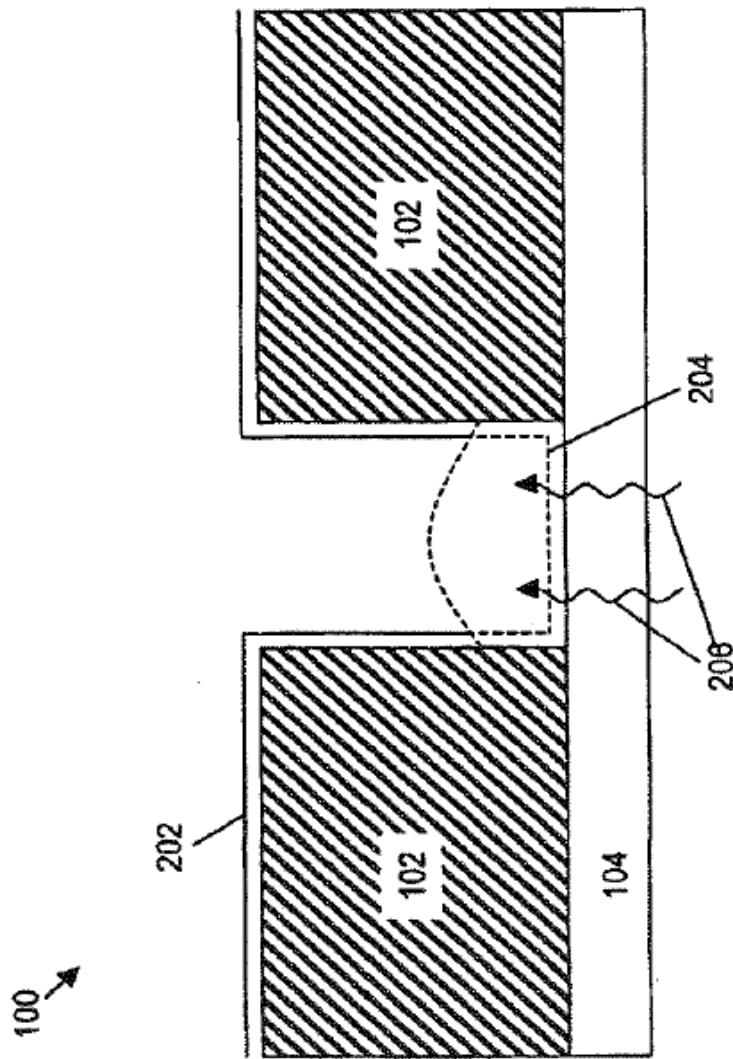


Fig. 2

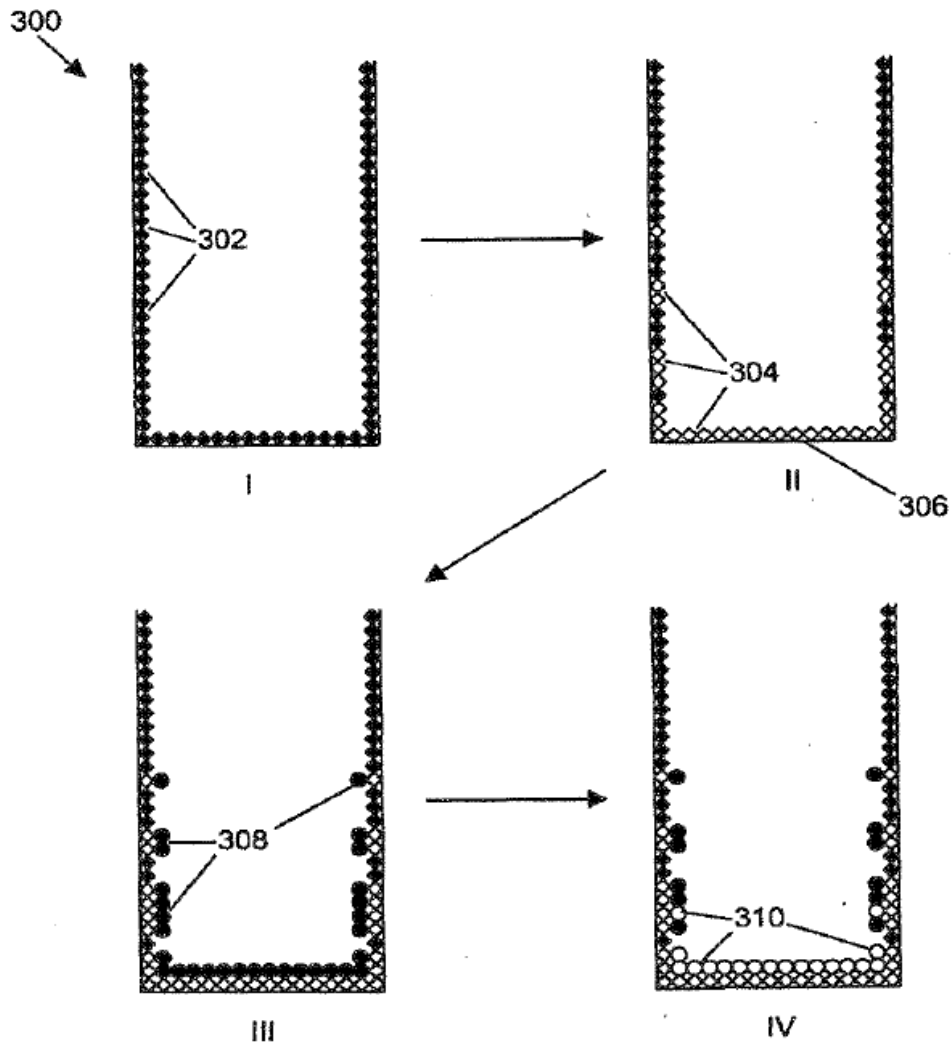


Fig. 3

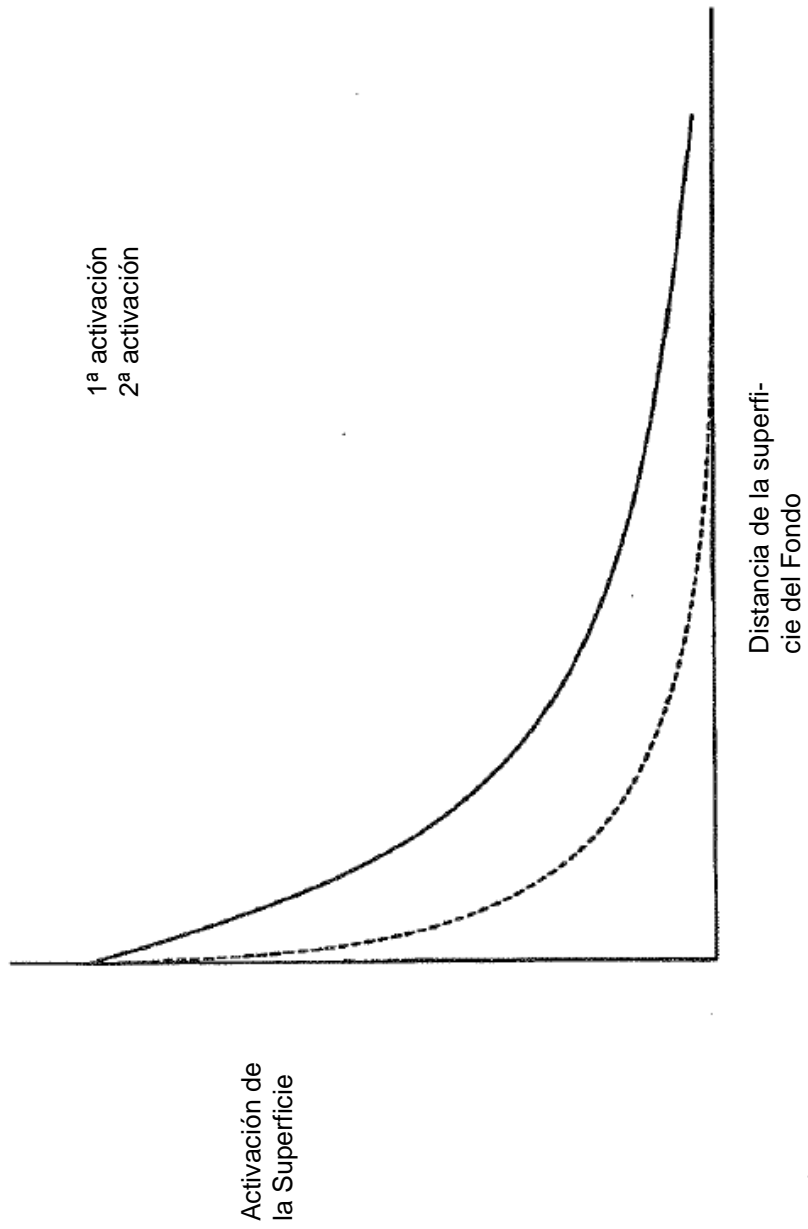


Fig. 4

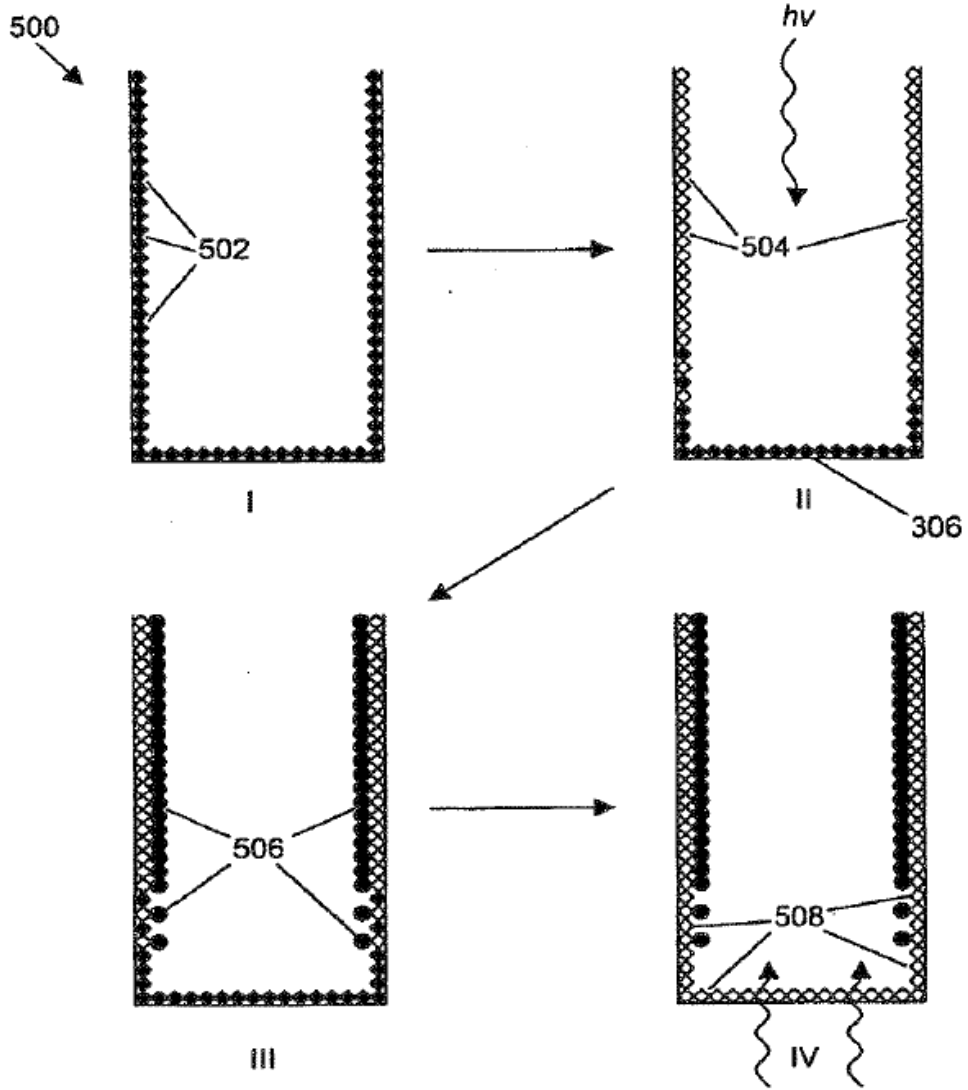


Fig. 5

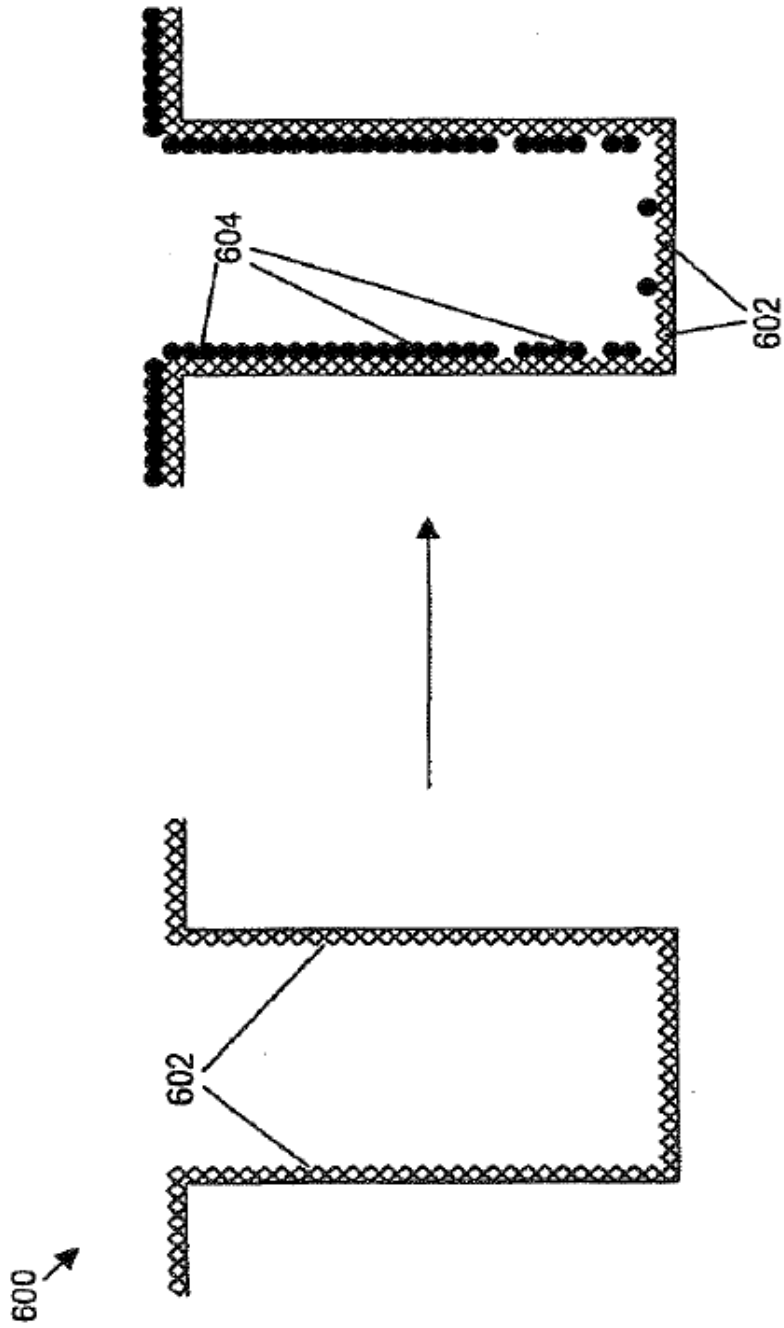


Fig. 6

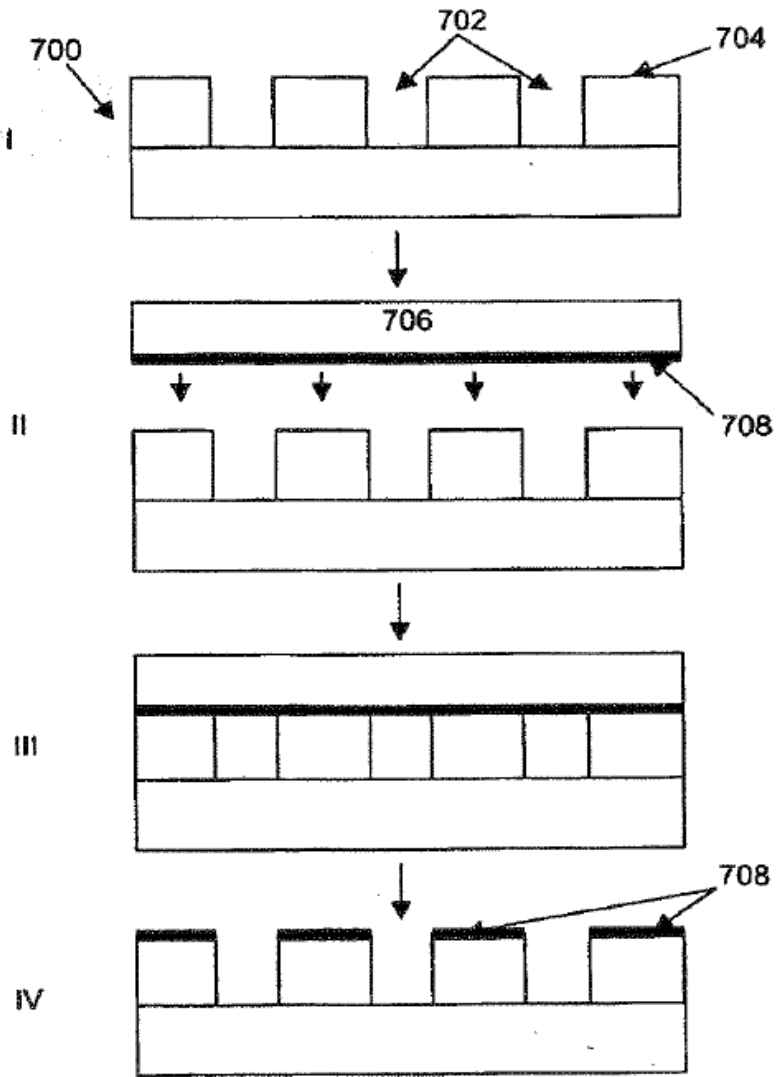


Fig. 7

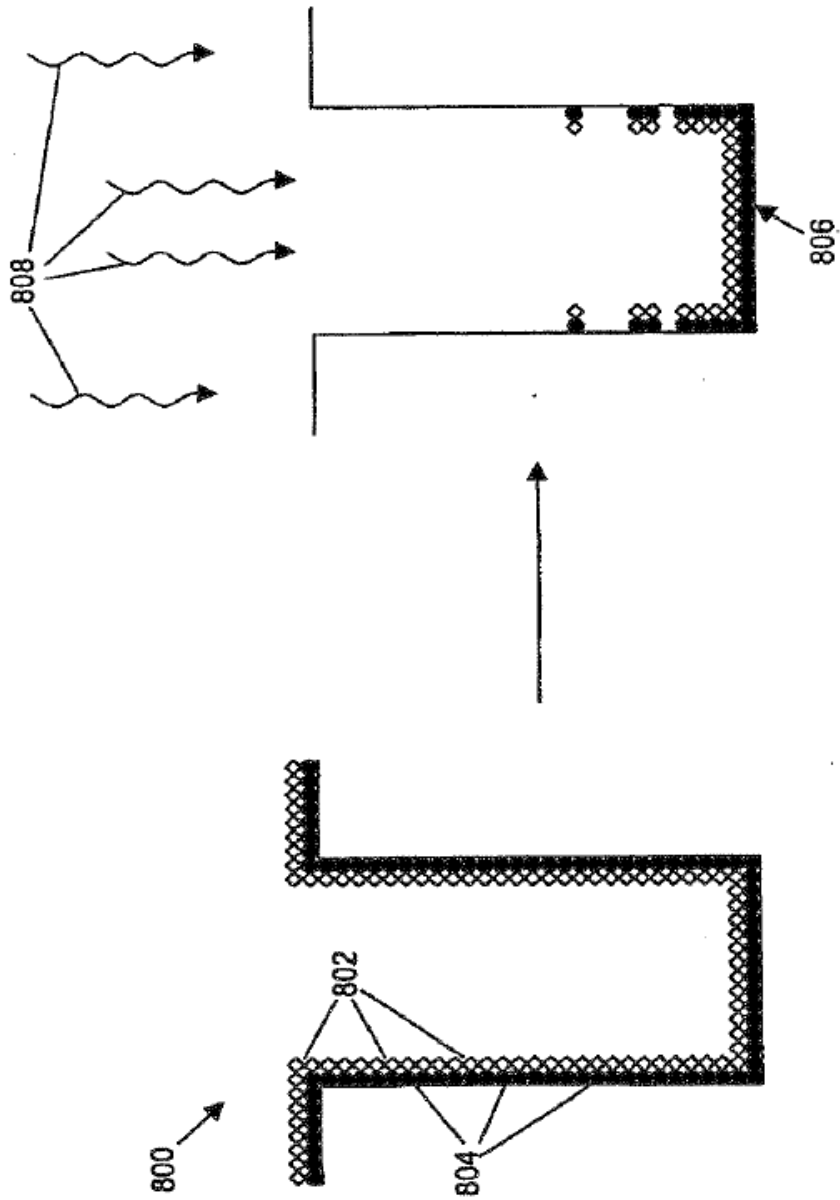


Fig. 8

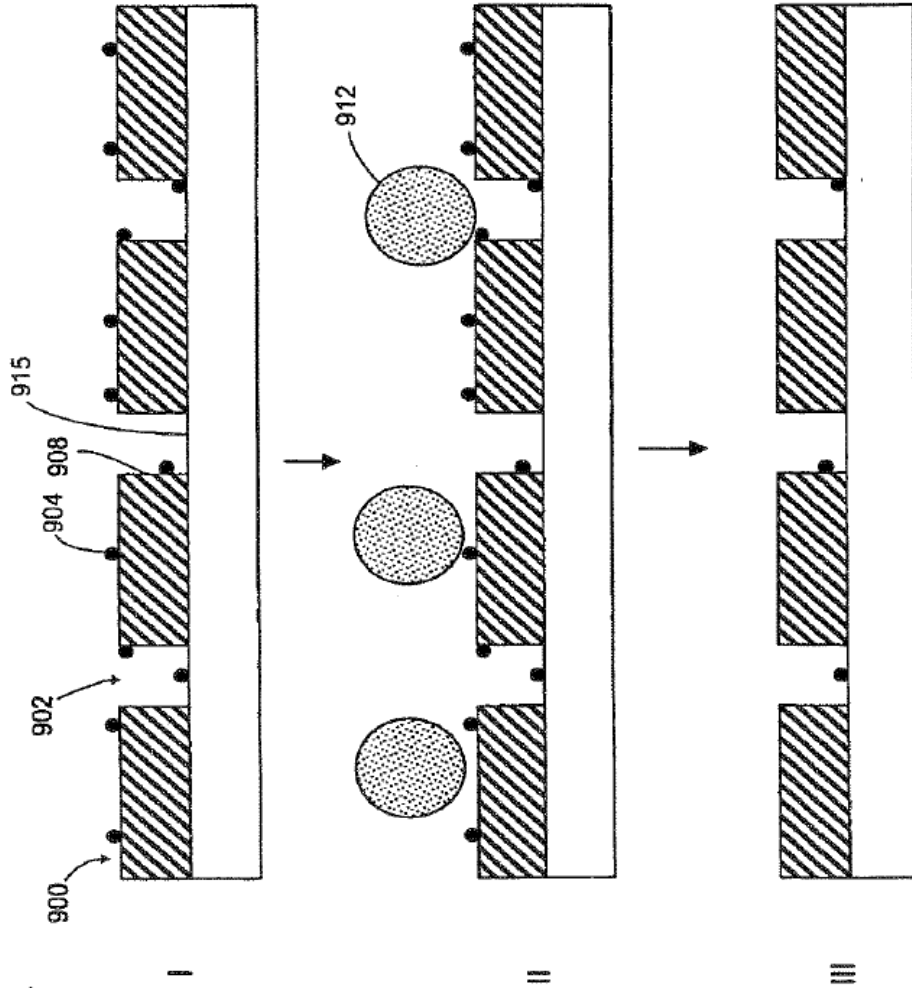


Fig. 9

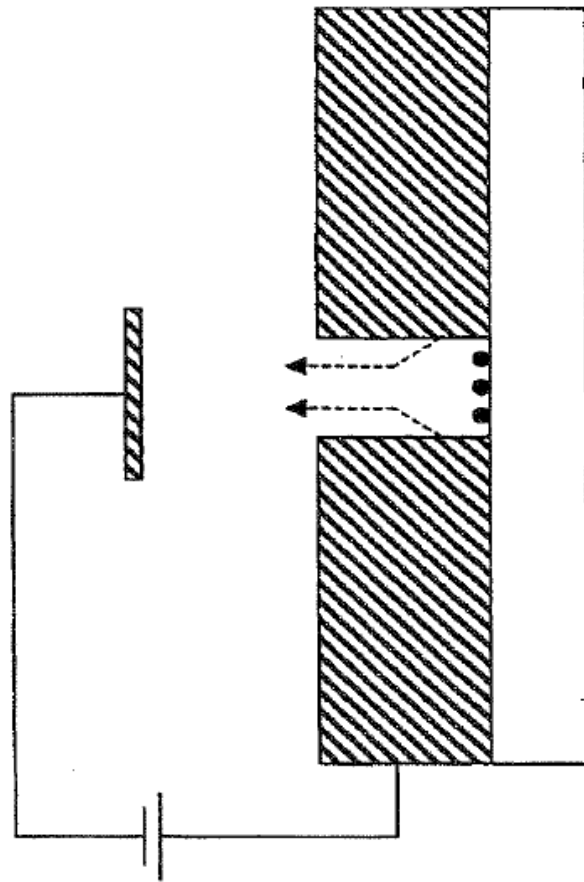


Fig. 10

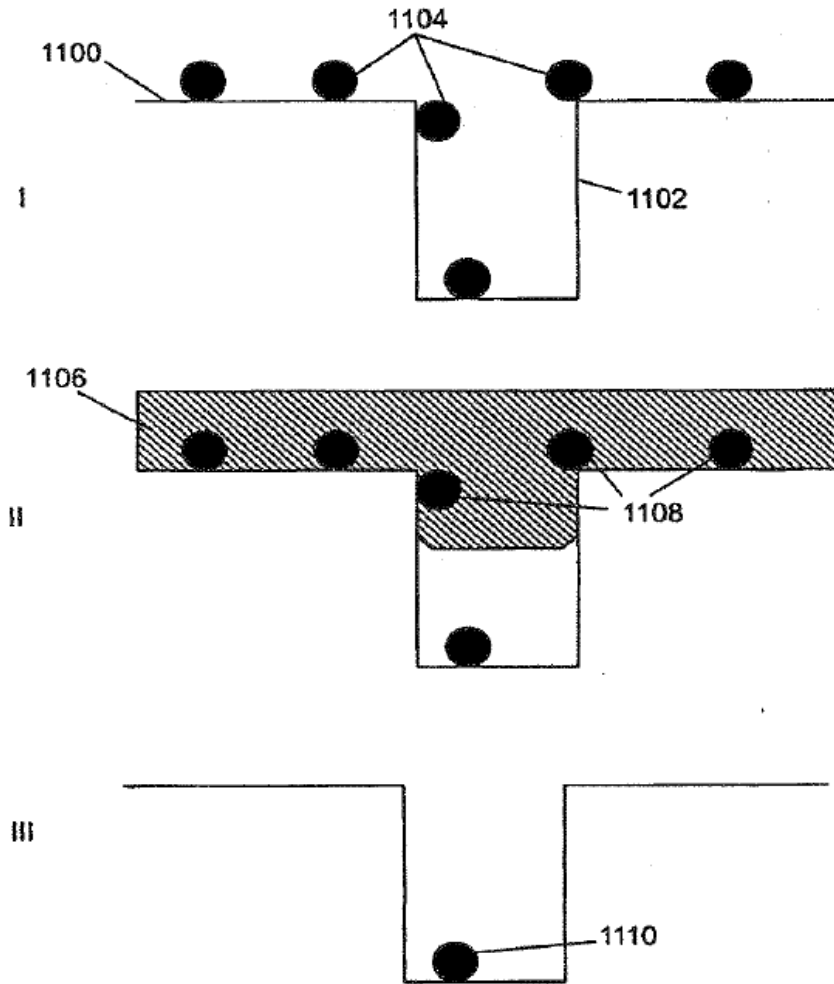


Fig. 11

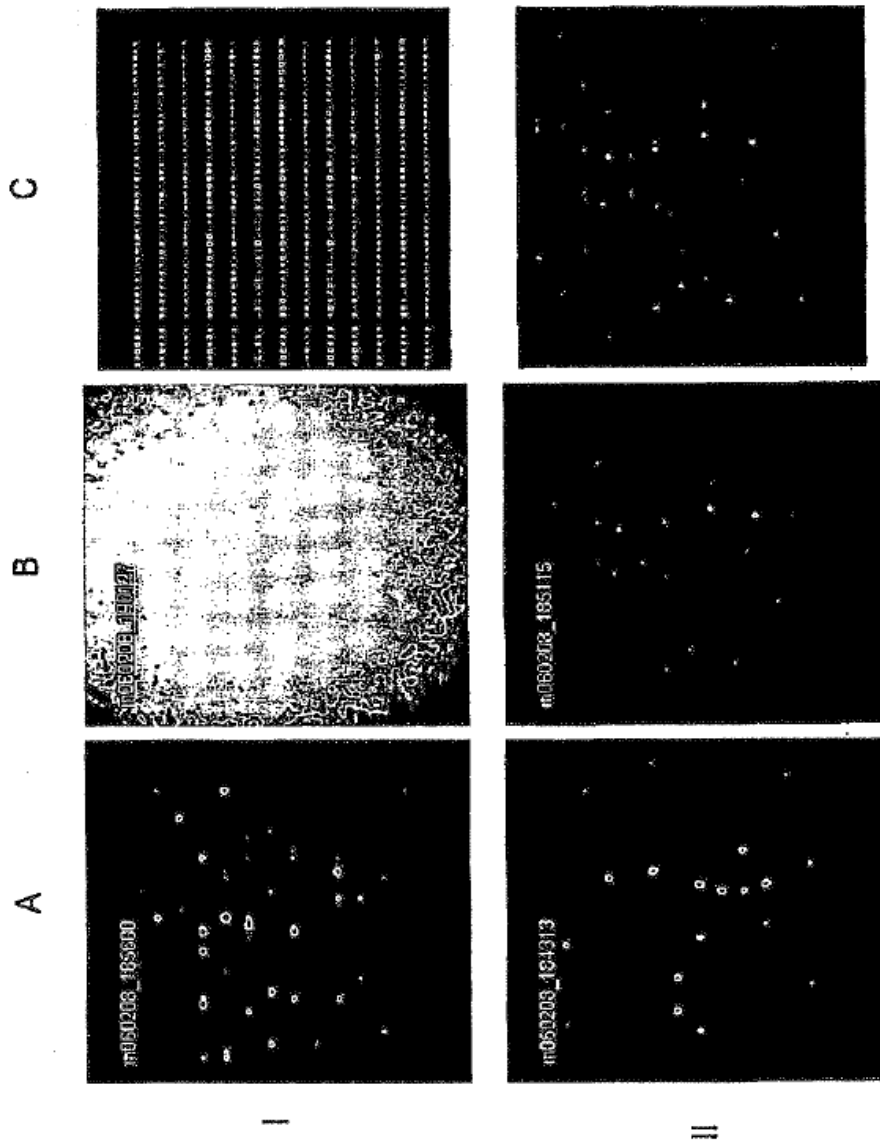


Fig. 12

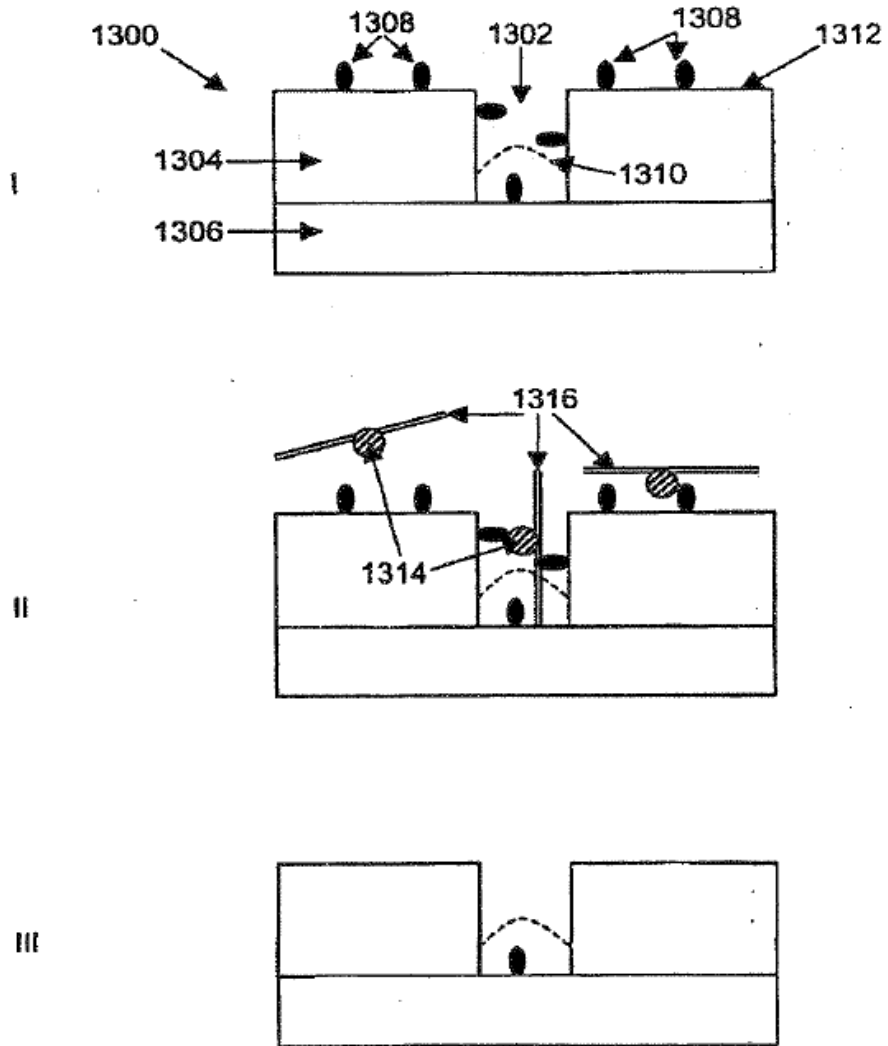


Fig. 13

Fig. 14I

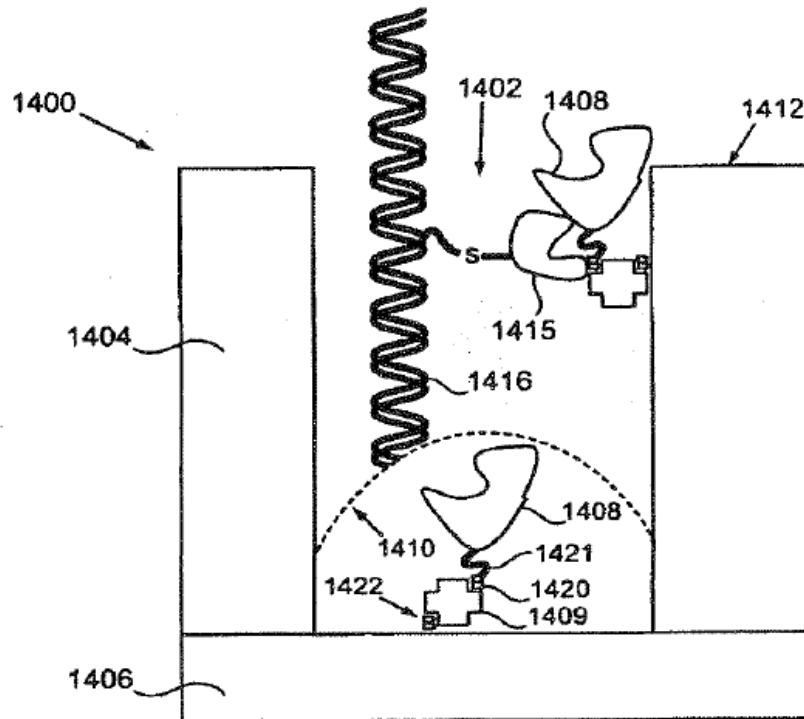


Fig. 14II

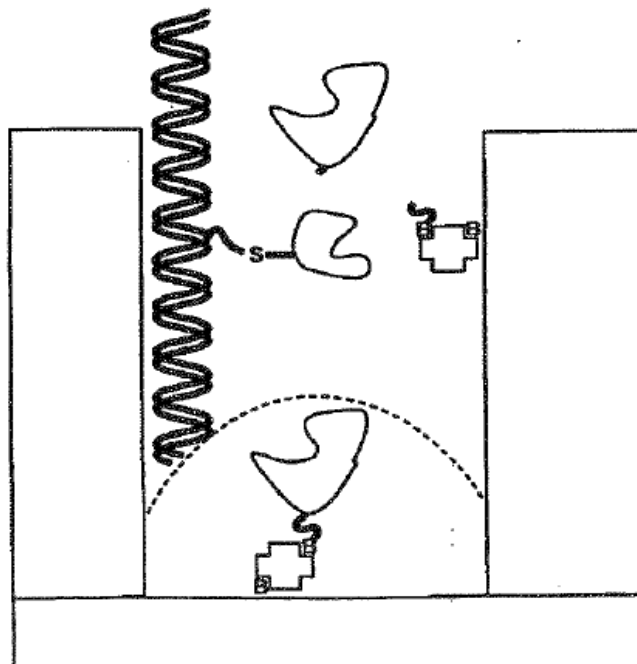


Fig. 15I

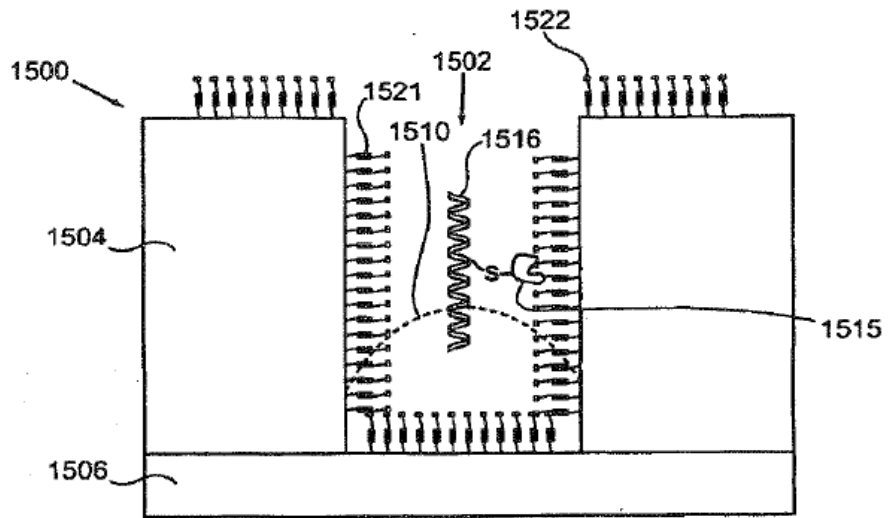


Fig. 15II

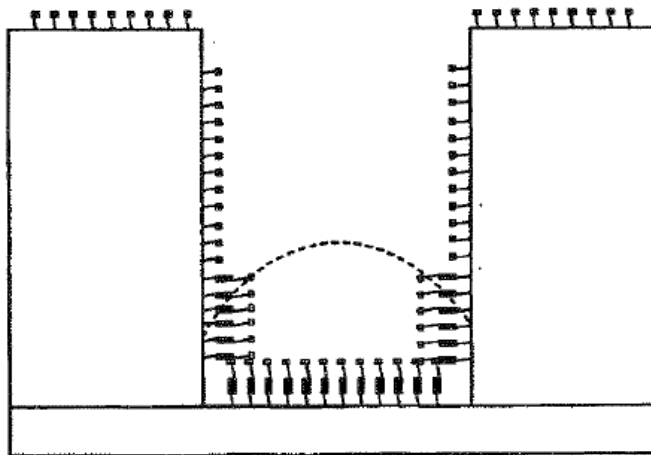
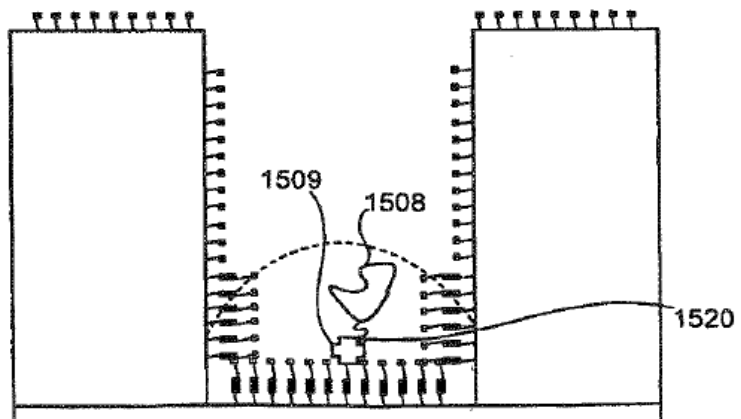


Fig. 15III



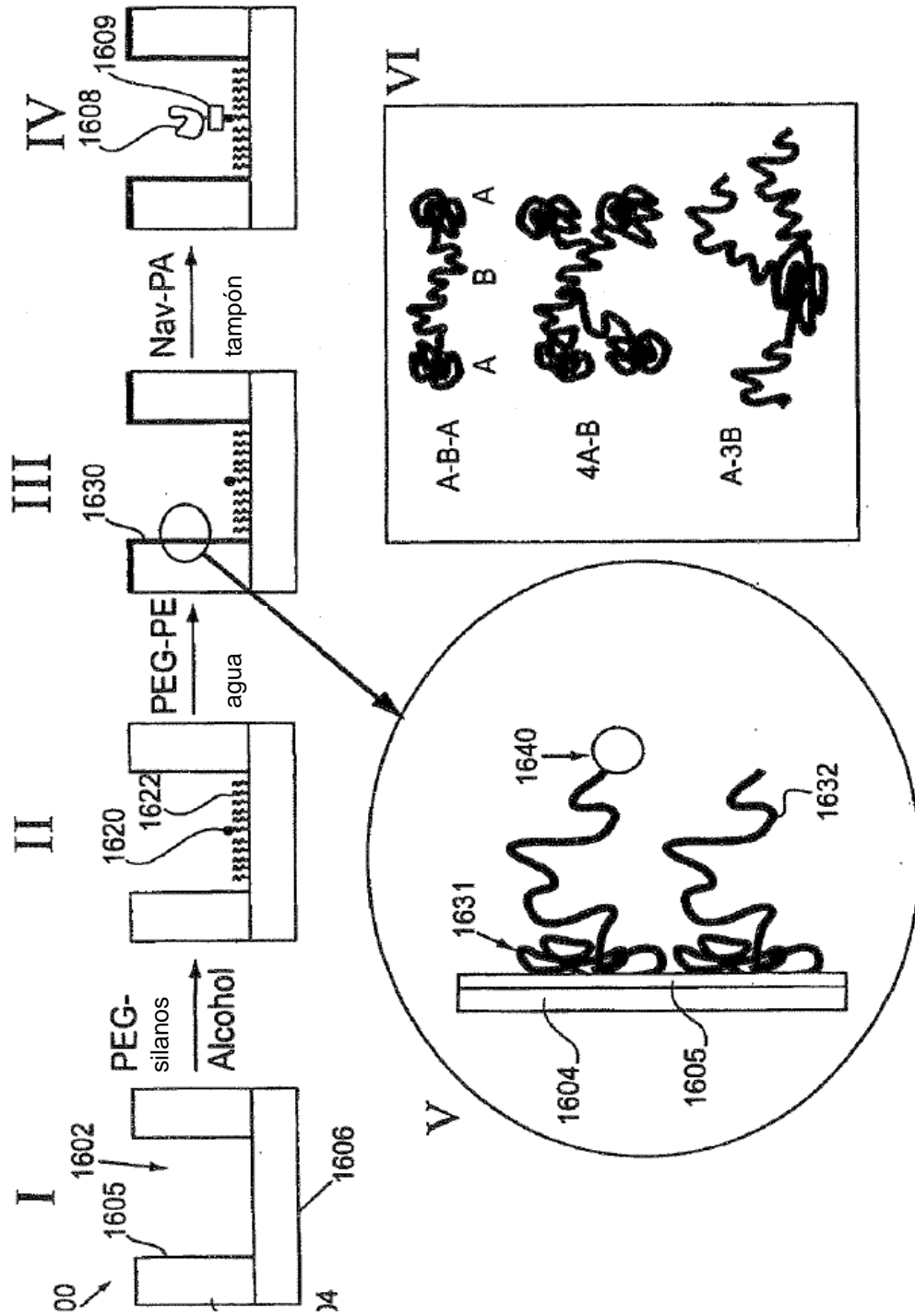


Fig. 16

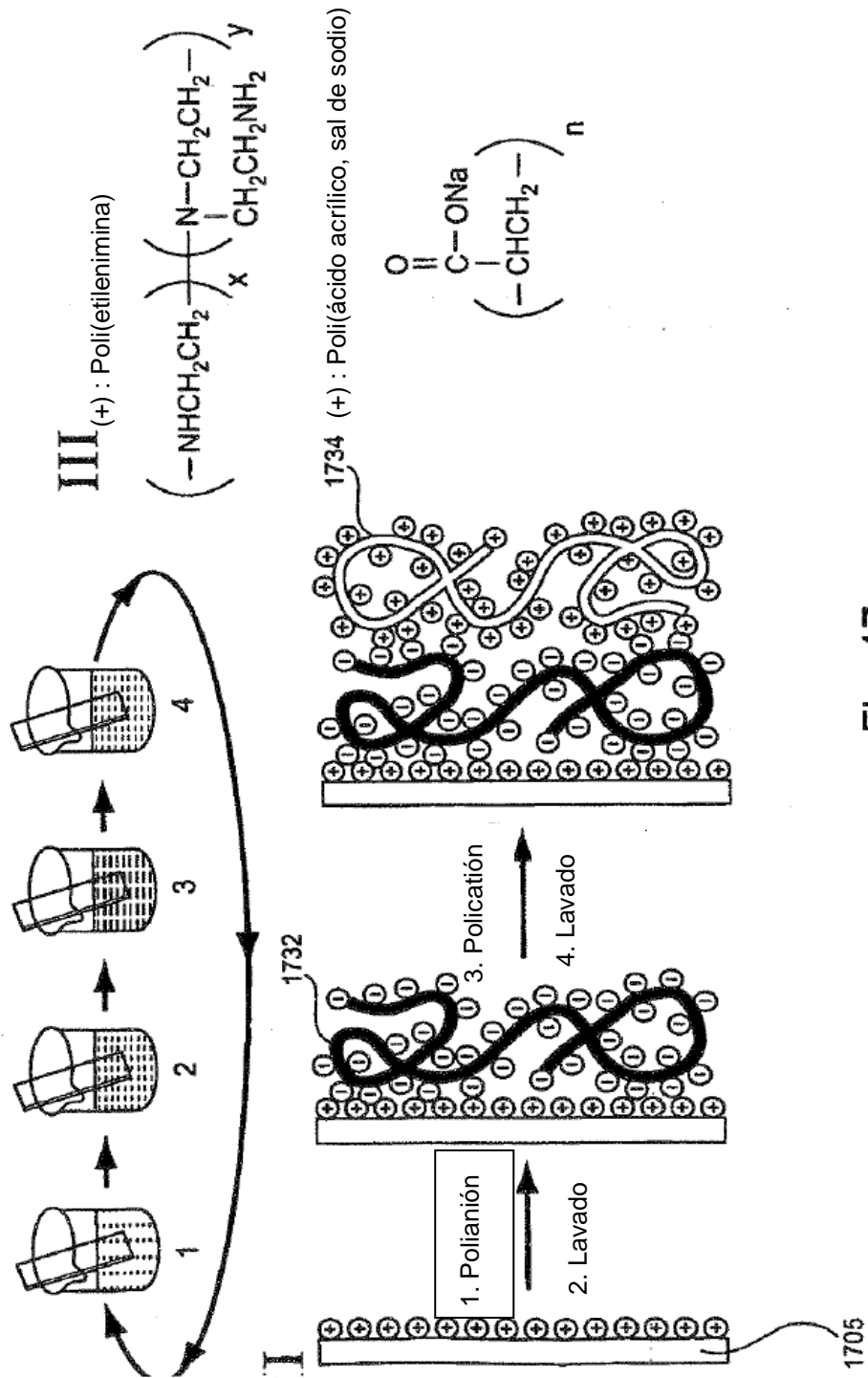


Fig. 17

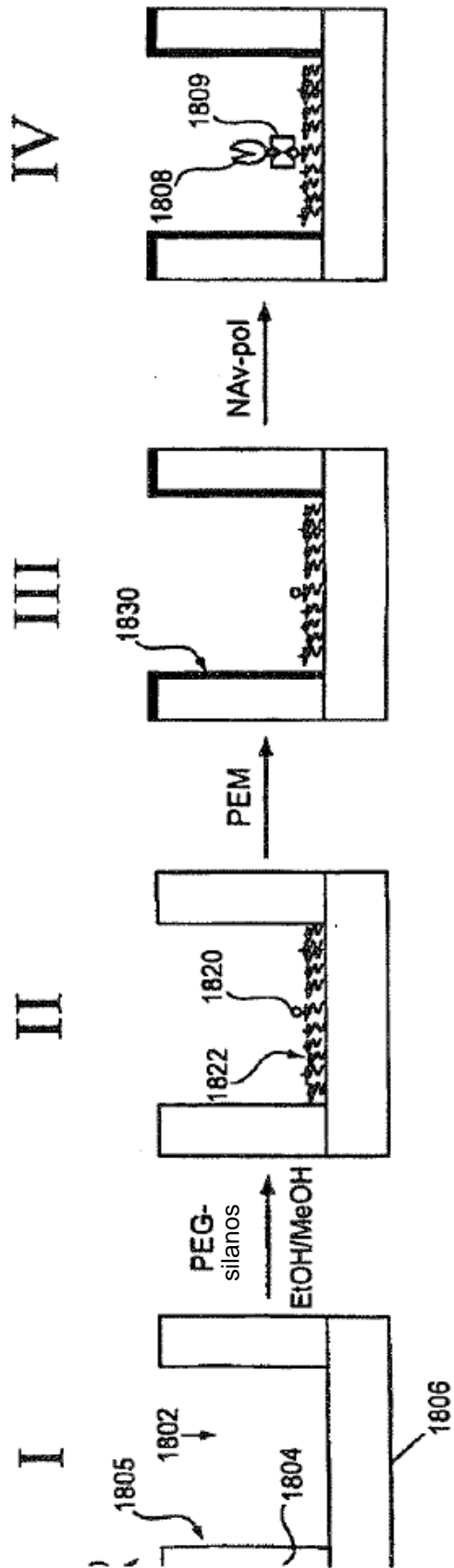


Fig. 18

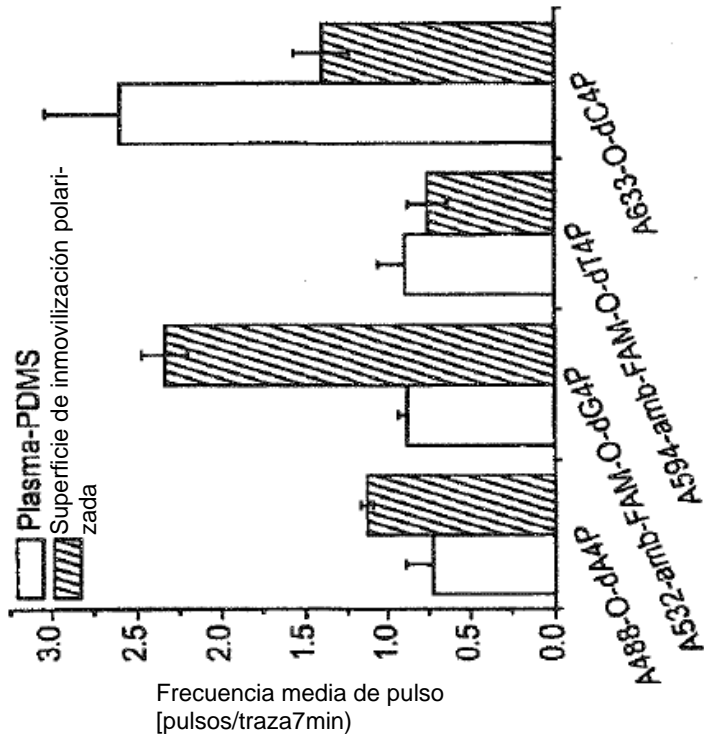


Fig. 19

Fig. 20II

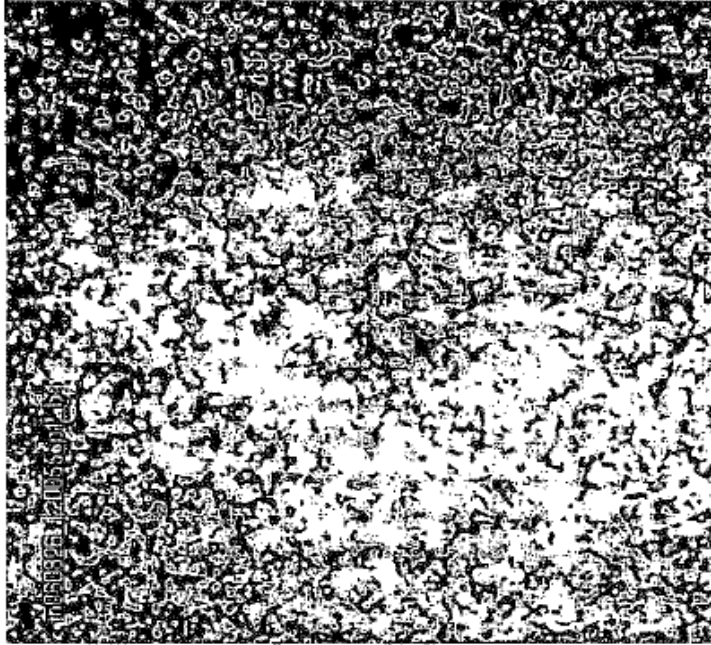
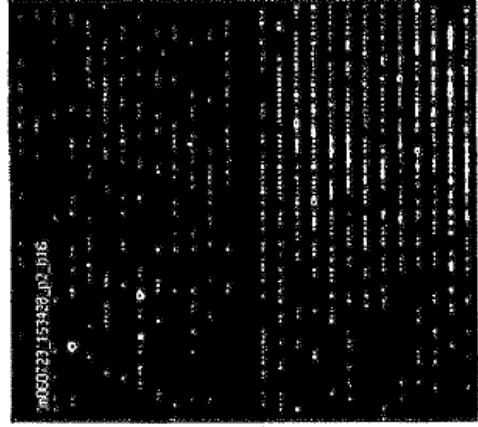
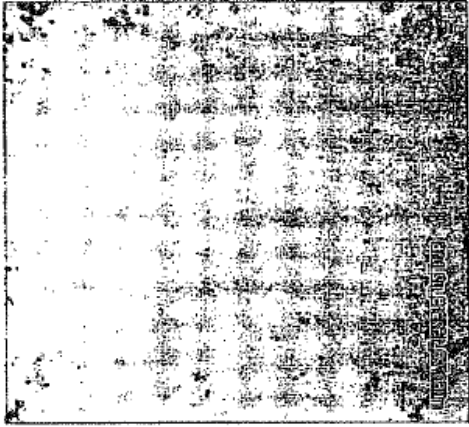


Fig. 20I

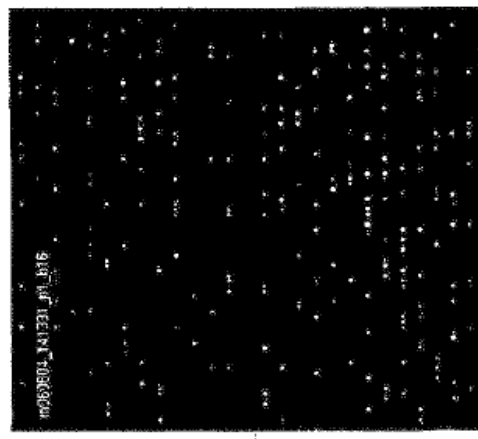
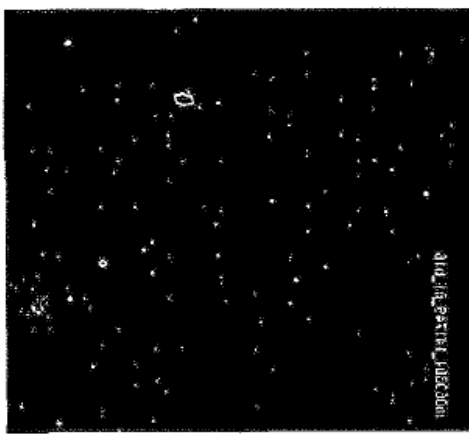


Fig. 21

II

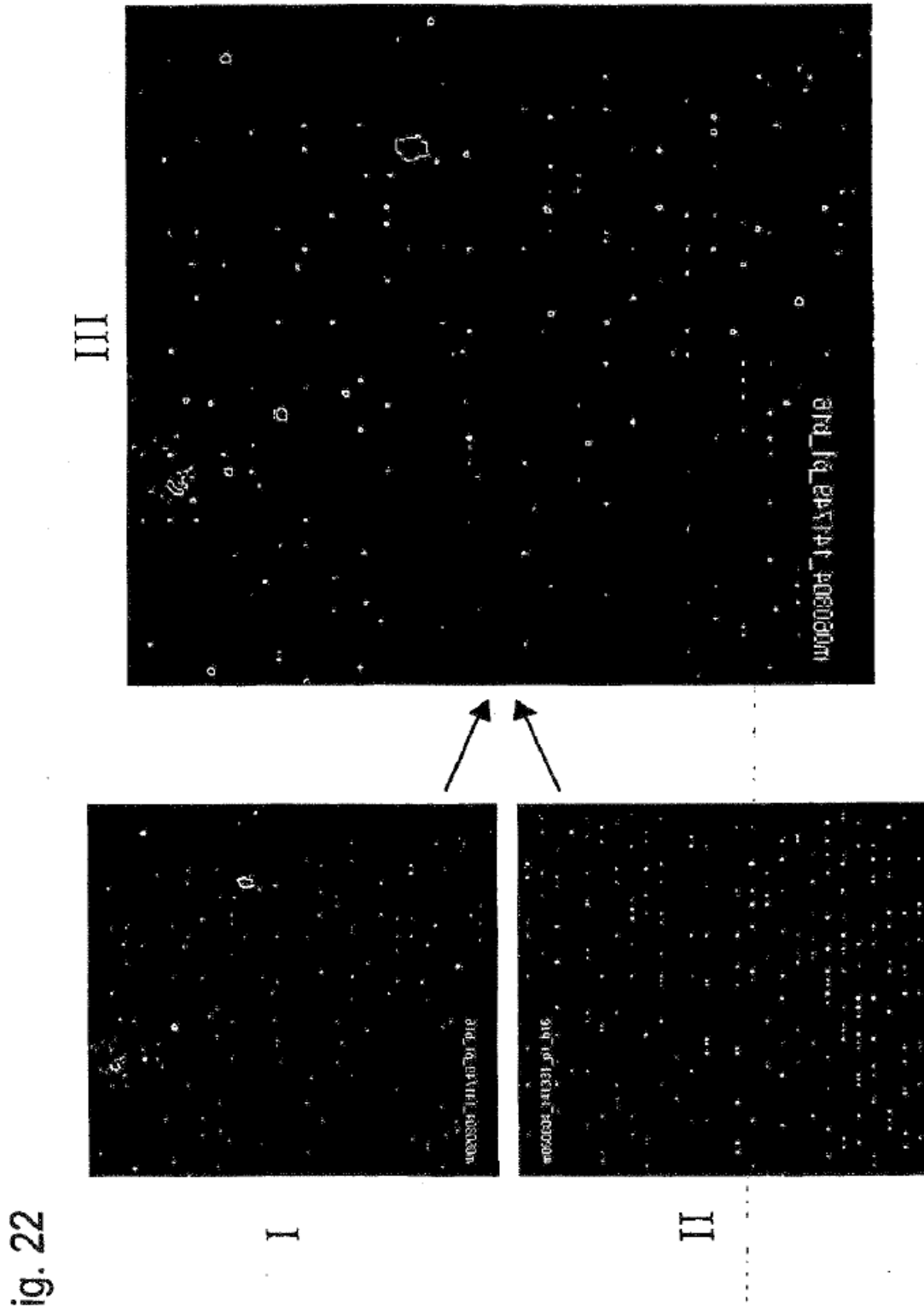


I



A

B



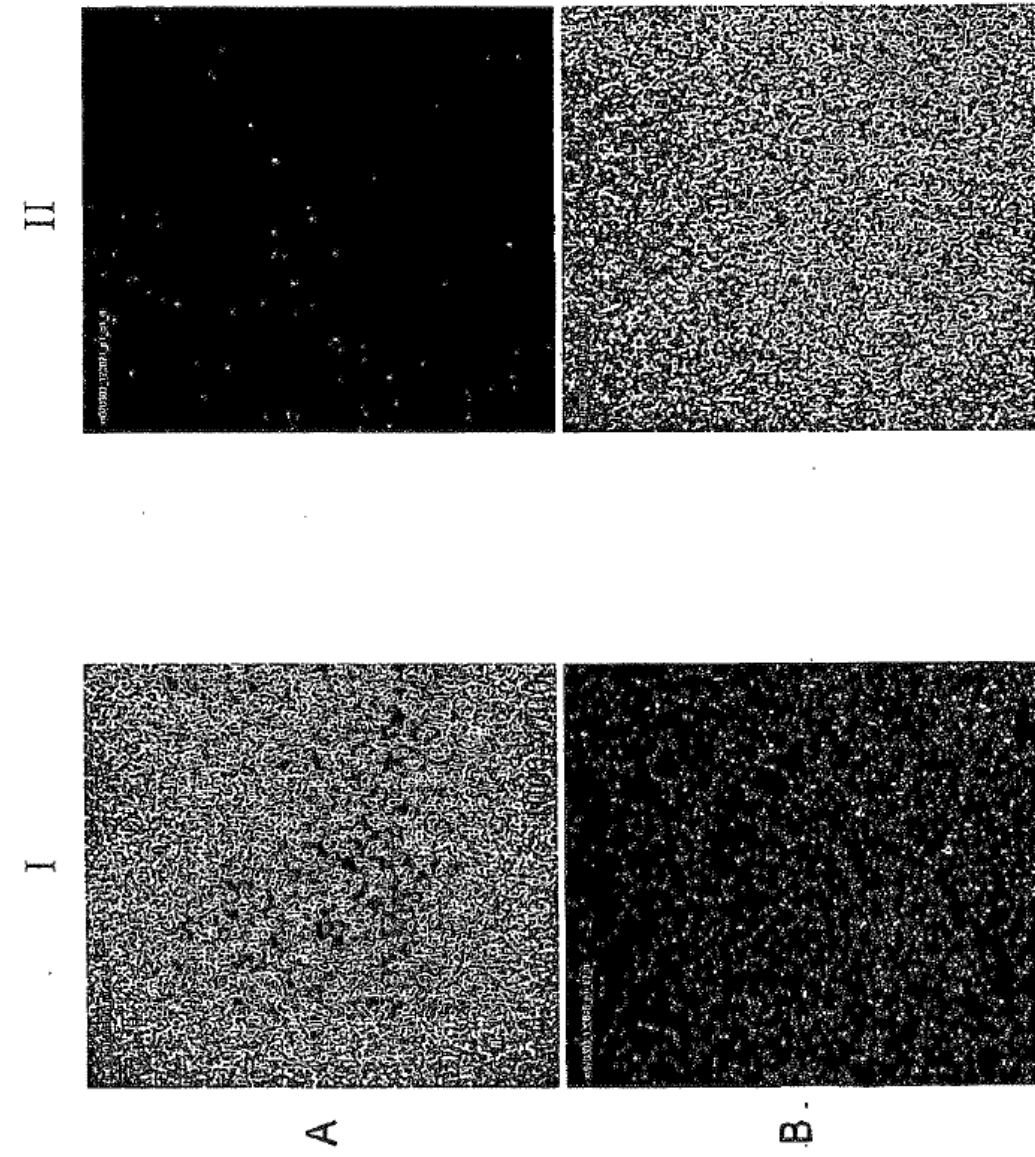


Fig. 23

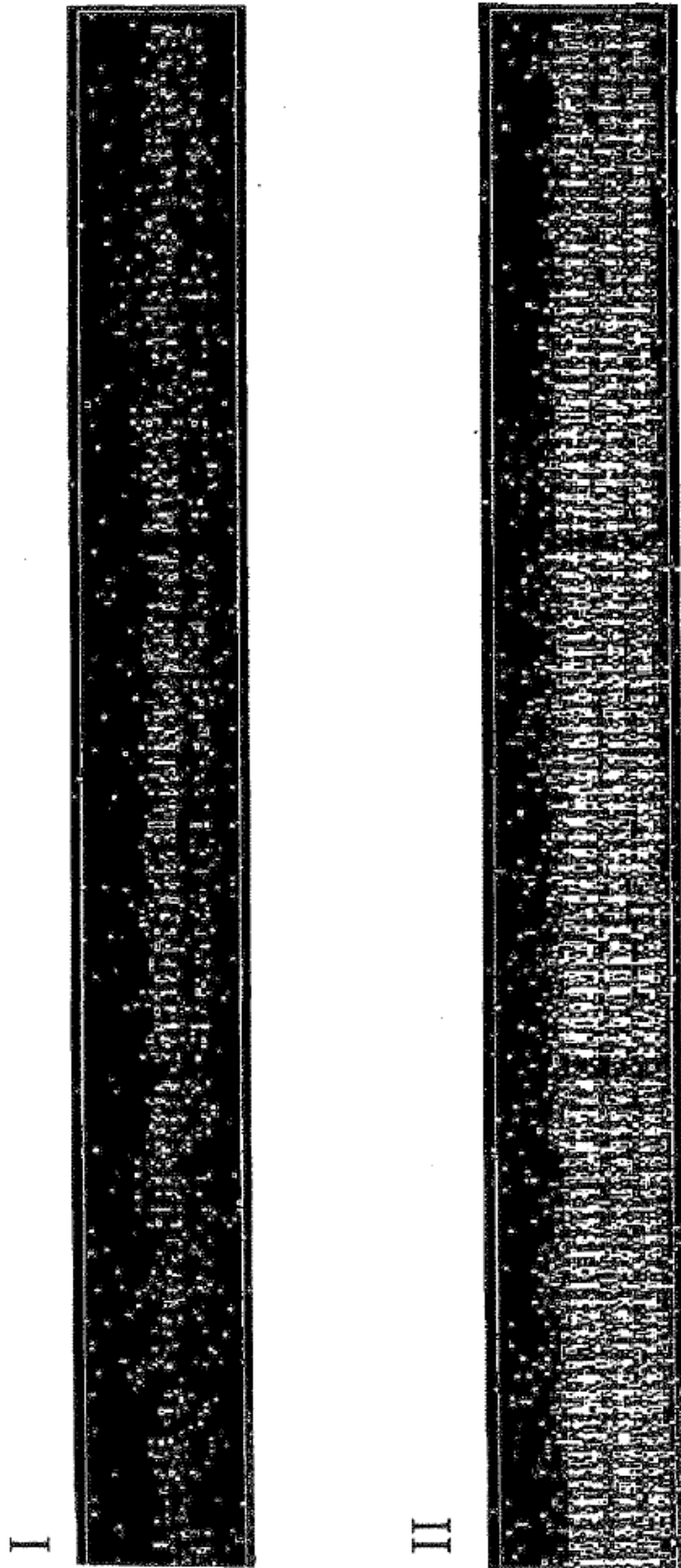


Fig. 24