

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 939**

51 Int. Cl.:

C12N 11/00 (2006.01)

C12N 11/04 (2006.01)

C12N 11/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2006 E 06848160 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1963500**

54 Título: **Composiciones que comprenden macromoléculas inmovilizadas y orientadas y métodos para su preparación**

30 Prioridad:

23.12.2005 US 753816 P

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

10.05.2013

73 Titular/es:

**NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
530 Fairview Avenue North, Suite 2000
Seattle, WA 98109 , US**

72 Inventor/es:

**FERREE, SEAN M. y
DUNAWAY, DWAYNE L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 939 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden macromoléculas inmovilizadas y orientadas y métodos para su preparación.

1. Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con los campos de la inmovilización macromolecular y el estiramiento macromolecular.

2. Antecedentes de la invención

10 Las macromoléculas pueden comprender secuencias únicas de monómeros u otros componentes que se pueden utilizar para distinguir rápidamente una macromolécula de otra. Cuando una macromolécula está unida o asociada con otro elemento, ese elemento puede ser identificado por rasgos de la macromolécula. El elemento puede ser cualquier elemento evidente para quien tienen experiencia en la técnica, tal como un sustrato, una superficie, otra molécula, una posición en una matriz o cualquier otro elemento con el que se pueda asociar una macromolécula. Uno puede identificar rápidamente el elemento al identificar la macromolécula.

15 De los muchos rasgos de las macromoléculas, su estructura proporciona gran parte de su diversidad. En general, su estructura primaria, es decir, la secuencia de sus monómeros u otros componentes, permite distinguir una macromolécula de otra macromolécula. Sin embargo, muchas macromoléculas, si no la mayoría, comprenden además niveles de estructura, tal como una estructura secundaria, terciaria o incluso cuaternaria, que puede dificultar realmente la capacidad de un experto para identificar la estructura primaria de la macromolécula. Para ilustrar esto, una sola macromolécula que comprende una secuencia primaria de rasgos A, B, C, D, E y F puede ser fácilmente identificada si se pueden reconocer los rasgos uno detrás de otro a lo largo de la secuencia primaria. Sin embargo, si esa macromolécula estuviera enrollada, retorcida o plegada en una estructura tridimensional, como es a menudo el caso de las macromoléculas presentes en la naturaleza en disolución, podría ser que los rasgos no fueran fácilmente identificables en su secuencia apropiada. Podría ser que quien tiene experiencia en la técnica no fuera capaz de distinguir una macromolécula que tiene la estructura primaria A, B, F, C, E y D de la estructura primaria A, B, C, D, E y F a causa de la estructura secundaria o terciaria o cuaternaria.

25 Las personas con experiencia han desarrollado técnicas para cardar la estructura primaria de una macromolécula tridimensional. Para ciertas macromoléculas, por ejemplo, polinucleótidos y polipéptidos, las técnicas químicas para identificar la secuencia primaria de sus rasgos resultarán familiares a quienes tienen experiencia. Además, se han desarrollado unas cuantas técnicas para extender o estirar o combinar macromoléculas, para reducir la complejidad de sus estructuras y facilitar de ese modo la elucidación de la estructura primaria. En estas técnicas ha estado generalmente implicada la aplicación de cierta fuerza capaz de extender la macromolécula. En ciertas técnicas ha estado además implicada la fijación no selectiva de la macromolécula en un estado extendido, tal como, por ejemplo, al secar la macromolécula sobre una superficie.

35 Los métodos y composiciones que faciliten la identificación de la estructura primaria de una macromolécula potenciarán además su utilidad en los campos del reconocimiento macromolecular y el etiquetado macromolecular y en otros campos.

Chiou y Lee, *J. Micromech. Microeng.* 15: 109-117 (2005), describen el estiramiento de una molécula de DNA con un extremo enlazado a un glóbulo magnético y el otro extremo enlazado a una superficie de oro.

Ferree y Blanch, *Biophysical Journal* 87: 468-75 (2004), utilizan DNA atado por un extremo para examinar la hidrodinámica del estiramiento y la relajación electroforéticas de DNA en una disolución de polímero.

40 Wang et al., *Biophysical Journal* 72: 1335-46 (1997), describen la inmovilización de un extremo de una molécula de DNA sobre la superficie de un portaobjetos y el otro extremo sobre un glóbulo microscópico para determinar relaciones de fuerza-extensión para moléculas de DNA.

3. Sumario de la invención

45 La presente descripción proporciona métodos y composiciones que facilitan la identificación de estructuras primarias de una diversidad de macromoléculas. De acuerdo con la invención, se proporciona un método para extender y selectivamente inmovilizar un polinucleótido, que comprende las operaciones de:

a) inmovilizar una primera porción de dicho polinucleótido sobre una superficie;

b) aplicar a dicho polinucleótido una fuerza capaz de extender dicho polinucleótido; y

50 c) poner una segunda porción de dicho polinucleótido en contacto con una molécula, en donde dicha molécula comprende un primer componente capaz de unirse a la segunda porción de dicho polinucleótido y un segundo componente capaz de unirse selectivamente a dicha superficie, en unas condiciones bajo las cuales dicha molécula se une selectivamente a la segunda porción de dicho polinucleótido y se une selectivamente a dicha superficie, inmovilizándose por ello selectivamente dicho polinucleótido en un estado extendido. Es digno de

mención que se puede inmovilizar selectivamente una macromolécula mientras está totalmente extendida bajo cualquiera que sea la fuerza que se utilice para la extensión. También se describen en esta memoria métodos que facilitan la inmovilización selectiva de macromoléculas extendidas que están orientadas entre sí. En otras palabras, se puede inmovilizar fácilmente una pluralidad de macromoléculas con la misma orientación entre sí.

5 La presente invención proporciona un método para extender y selectivamente inmovilizar un polinucleótido en un estado extendido. En general, se inmoviliza una primera porción de la macromolécula mediante cualquier técnica conocida por quienes tienen experiencia en este campo técnico. La primera porción de la macromolécula puede ser inmovilizada selectiva o no selectivamente. La primera porción puede ser inmovilizada mediante uno o más enlaces covalentes o mediante uno o más enlaces no covalentes. En las secciones posteriores se describen primeras
10 porciones inmovilizadas ejemplares.

Con una primera porción inmovilizada, el polinucleótido puede ser extendido mediante cualquier técnica para extender una macromolécula, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. El polinucleótido puede ser extendido mediante la aplicación de una fuerza capaz de extender el polinucleótido. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para quien tiene experiencia en la técnica para extender el polinucleótido. Las fuerzas ejemplares
15 incluyen la gravedad, fuerza hidrodinámica, fuerza electromagnética y combinaciones de las mismas. En las secciones posteriores se describen técnicas específicas para extender el polinucleótido.

El polinucleótido está en un estado extendido si es reconocido como extendido por quien tiene experiencia en la técnica. El polinucleótido está en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender el polinucleótido o cuando su radio hidrodinámico medio es más del doble del radio hidrodinámico medio del
20 polinucleótido en su estado nativo, según es reconocido por quien tiene experiencia en la técnica.

El método de la invención comprende la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción del polinucleótido mientras está en un estado extendido. Esto puede dar lugar a un polinucleótido inmovilizado que esté extendido entre las porciones primera y segunda. Es digno de mención que, puesto que el polinucleótido es selectivamente inmovilizado mientras está extendido, se puede conservar esa extensión en el polinucleótido
25 inmovilizado. En general, la primera porción y la segunda porción del polinucleótido no son la misma.

La inmovilización selectiva puede ser de acuerdo con cualquier técnica para la inmovilización selectiva de una porción de un polinucleótido, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. La inmovilización selectiva puede ser por medio de, por ejemplo, la formación de uno o más enlaces covalentes o uno o más enlaces no covalentes, o ambos. En las secciones posteriores se describen ejemplos particulares de técnicas para inmovilización selectiva. Se pueden
30 utilizar uno o más pares ligantes para inmovilizar la segunda porción de la macromolécula.

El sustrato de inmovilización puede ser cualquier sustrato que se considere útil para la inmovilización, conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Los sustratos útiles incluyen superficies, membranas, glóbulos, materiales porosos, electrodos, matrices y cualquier otro sustrato evidente para quienes tienen experiencia en la técnica.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden una macromolécula extendida y selectivamente inmovilizada. Las composiciones comprenden generalmente un sustrato y una macromolécula extendida y selectivamente inmovilizada sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Los sustratos ejemplares incluyen los descritos en las secciones posteriores. Al menos dos porciones de la macromolécula están inmovilizadas sobre el sustrato, y la macromolécula está en un estado extendido entre las dos porciones. Al menos una porción de la macromolécula puede estar
40 selectivamente inmovilizada sobre el sustrato. Dos o más porciones de la macromolécula pueden estar selectivamente inmovilizadas sobre el sustrato. La macromolécula puede ser extendida y/o inmovilizada mediante cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia, incluyendo particularmente los métodos de la invención y descripción presentes.

La presente descripción proporciona métodos para inmovilizar selectivamente una macromolécula en un estado orientado. La macromolécula puede ser cualquier macromolécula conocida por quienes tienen experiencia en la técnica, tal como un polímero, un polisacárido, un polinucleótido o un polipéptido. La macromolécula puede ser flexible, o la macromolécula puede ser rígida o semirrígida. En general, se inmoviliza una primera porción de la macromolécula del modo anteriormente descrito. Con una primera porción inmovilizada, la macromolécula puede ser orientada mediante cualquier técnica para extender una macromolécula, evidente para quienes tienen experiencia
50 en este campo técnico. La técnica para orientar la macromolécula no es crítica para los métodos de la descripción. La técnica para orientar la macromolécula, apropiada para la clase de macromolécula, puede ser seleccionada de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en este campo técnico. La macromolécula puede ser orientada mediante la aplicación de una fuerza capaz de orientar la macromolécula. La fuerza puede ser cualquier fuerza evidente para quien tiene experiencia en la técnica para orientar la macromolécula. Las fuerzas ejemplares incluyen la gravedad, fuerza hidrodinámica, fuerza electromagnética y combinaciones de las mismas. En las secciones
55 posteriores se describen técnicas específicas para extender la macromolécula.

La macromolécula está en un estado orientado si es reconocida como orientada por quien tiene experiencia en la técnica. La macromolécula está en un estado orientado cuando está en el campo de una fuerza capaz de orientar la

macromolécula, o la macromolécula está en un estado orientado cuando sus extremos están dispuestos en paralelo, según es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica, con el campo de una fuerza capaz de orientar la macromolécula. Una pluralidad de moléculas están en un estado orientado cuando los extremos de las macromoléculas están dispuestos en paralelo, según es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica.

5 Los métodos para orientar la macromolécula descritos en esta memoria comprenden generalmente la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción de la macromolécula mientras está en un estado orientado. Esto puede dar lugar a una macromolécula inmovilizada que está orientada entre las porciones primera y segunda. Es digno de mención que, puesto que la macromolécula es selectivamente inmovilizada mientras está extendida, se puede conservar esa orientación en la macromolécula inmovilizada. La inmovilización selectiva puede de acuerdo
10 con los métodos anteriormente descritos.

La presente descripción también proporciona una composición que comprende una macromolécula orientada y selectivamente inmovilizada. Las composiciones comprenden generalmente un sustrato y una macromolécula orientada y selectivamente inmovilizada sobre el sustrato. El sustrato puede ser cualquier sustrato conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Los sustratos ejemplares incluyen los descritos en las secciones
15 posteriores. Al menos dos porciones de la macromolécula están inmovilizadas sobre el sustrato, y la macromolécula está en un estado orientado entre las dos porciones. Al menos una porción de la macromolécula está selectivamente inmovilizada sobre el sustrato, o ambas porciones de la macromolécula están selectivamente inmovilizadas sobre el sustrato. La macromolécula puede ser orientada y/o inmovilizada mediante cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia, incluyendo particularmente los métodos de la presente descripción.

20 El método de la invención y los métodos y composiciones de la presente descripción se pueden utilizar con cualquier finalidad evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. Por ejemplo, la macromolécula inmovilizada y extendida y/o orientada puede ser utilizada como una etiqueta para un sustrato sobre el cual se inmoviliza la macromolécula. Se puede identificar la secuencia primaria de la macromolécula inmovilizada y extendida y/o orientada, mediante cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia. Resulta ventajoso que la
25 inmovilización de la macromolécula extendida y/o orientada puede facilitar dichas técnicas. Se puede utilizar la macromolécula inmovilizada y extendida y/o orientada para dirigir la fabricación de nanovías, por ejemplo, para crear nanohilos o nanocircuitos. En las secciones posteriores se describen otros usos para las macromoléculas inmovilizadas y extendidas y/o orientadas.

4. Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1A proporciona una ilustración de una macromolécula que comprende una primera porción F1 inmovilizada.

La Figura 1B proporciona una ilustración de una macromolécula extendida en un campo eléctrico y que comprende una primera porción F1 inmovilizada y una segunda porción F2 inmovilizada, en donde F2 está inmovilizada a través de un complejo con la molécula F3.

35 La Figura 2A proporciona una ilustración de un complejo de tres miembros para la inmovilización de una macromolécula extendida.

La Figura 2B proporciona una ilustración de un complejo de dos miembros para la inmovilización de una macromolécula extendida.

40 La Figura 2C proporciona una ilustración de un complejo incompleto para la inmovilización de una macromolécula extendida.

La Figura 3A proporciona una ilustración de una macromolécula que comprende una primera porción F1 inmovilizada.

La Figura 3B proporciona una ilustración de una macromolécula extendida, inmovilizada por una primera porción F1 y por una segunda porción a través de complejos con F2.

45 La Figura 3C proporciona una ilustración de una macromolécula que comprende una primera porción inmovilizada en una superficie de avidina a través de biotina.

La Figura 3D proporciona una ilustración de una macromolécula extendida, inmovilizada por una primera porción y por una segunda porción a través de la unión selectiva de biotina a una superficie de avidina.

La Figura 4A ilustra la inmovilización de un extremo de una molécula de DNA en un dispositivo para microfluidos.

50 La Figura 4B ilustra la extensión del DNA en un campo eléctrico.

La Figura 4C ilustra la inmovilización selectiva de un segundo extremo de la molécula de DNA extendida.

La Figura 5 proporciona una imagen de macromoléculas extendidas, selectivamente inmovilizadas mediante los métodos de la presente invención.

La Figura 6A proporciona un nanoinformador en que están etiquetados sitios alternos.

La Figura 6B representa un nanoinformador en que están etiquetados todos los sitios.

- 5 La Figura 7A ilustra un nanoinformador dual con un código nanoinformador de 16 posiciones, utilizando dos componentes nanoinformadores de 8 posiciones.

La Figura 7B ilustra un nanoinformador dual con un código nanoinformador de 9 posiciones.

La Figura 7C ilustra un nanoinformador dual con un código nanoinformador de 8 posiciones, usando una sonda fantasma y un componente nanoinformador de 8 posiciones.

- 10 La Figura 8A proporciona una ilustración esquemática del experimento mostrado en las Figuras 6B y 6C, donde la estrella representa la biotina que se utilizó para fijar el complejo por un extremo a la superficie antes del estiramiento.

Las Figuras 8B y 8C proporcionan imágenes de experimentos en que se hibridaron una sonda fantasma S2-A, un nanoinformador etiquetado con S2-B y un DNA diana S2 (Figura 8B) o un RNA diana S2 (Figura 8C).

- 15 La Figura 8D proporciona una imagen de un experimento testigo negativo, en que se hibridaron una sonda fantasma S2-A y un nanoinformador etiquetado con S2-B sin RNA diana S2.

La Figura 8E proporciona un primer plano de unos complejos nanoinformadores de la Figura 8B.

5. Descripción detallada

5.1. Definiciones

- 20 Todas las expresiones usadas en la presente memoria tienen sus significados habituales para los expertos en la técnica a menos que se indique otra cosa. Las expresiones siguientes tendrán los significados siguientes.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión "par ligante" se refiere a unas moléculas o componentes primero y segundo que son capaces de unirse selectivamente entre sí, es decir, unirse entre sí con mayor afinidad que con otros componentes en una composición. La unión entre los miembros del par ligante puede ser covalente o no covalente. Los pares ligantes ejemplares incluyen pares ligantes inmunológicos (por ejemplo, cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un correspondiente anticuerpo o porción o fragmento ligante del mismo, tal como, por ejemplo, digoxigenina y anti-digoxigenina, fluoresceína y anti-fluoresceína, dinitrofenol y anti-dinitrofenol, bromodesoxiuridina y anti-bromodesoxiuridina, e inmunoglobulina de ratón e inmunoglobulina anti-ratón generada en cabra) y pares ligantes no inmunológicos [por ejemplo, biotina-avidina, biotina-estreptavidina, hormona-proteína ligante de hormona, receptor-ligando de receptor (por ejemplo, receptor de acetilcolina-acetilcolina o un compuesto análogo de la misma), IgG-proteína A, lectina-carbohidrato, enzima-cofactor enzimático, enzima-inhibidor enzimático, pares polinucleotídicos complementarios capaces de formar ácidos nucleicos dúplex, y similares]. Por ejemplo, los miembros ligantes inmunorreactivos pueden incluir antígenos, haptenos, aptámeros, anticuerpos (primarios o secundarios), y complejos de los mismos, incluyendo los formados mediante métodos de DNA recombinante o mediante síntesis peptídica. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína recombinante o una(s) mezcla(s) o fragmento(s) de los mismos, así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros ligantes. Otros pares ligantes comunes incluyen, pero no se limitan a, biotina y avidina (o derivados de las mismas), biotina y estreptavidina, carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias (incluyendo secuencias de ácido nucleico para sonda y captura), secuencias peptídicas complementarias incluyendo las formadas mediante métodos recombinantes, moléculas efectoras y receptoras, hormona y proteína ligante de hormona, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, etcétera.

"Unión selectiva" se refiere a cualquier unión preferente de un par de moléculas o componentes entre sí con respecto a otras moléculas o componentes en una composición, que sería reconocida por quien tiene experiencia en la técnica. Un par de moléculas o componentes se unen selectivamente cuando se unen preferentemente entre sí en comparación con otras moléculas o componentes. La unión selectiva puede incluir afinidad o avidez, o ambas cosas, de una molécula o componente por otra molécula o componente. La unión selectiva puede requerir una constante de disociación (K_D) inferior a aproximadamente 1×10^{-5} M o inferior a aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M o 1×10^{-10} M. Por contraste, la unión no selectiva puede tener una afinidad significativamente inferior, por ejemplo, una K_D superior a 1×10^{-3} M.

50 "Estado extendido" se refiere a una macromolécula en un estado que sería reconocido como extendido por quien tiene experiencia en la técnica. Una macromolécula puede estar en un estado extendido cuando está extendida con respecto a su conformación nativa en disolución, o una macromolécula puede estar en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender la macromolécula. Se puede determinar cuantitativamente un

estado extendido de una macromolécula. Quienes tienen experiencia en la técnica reconocerán a R como el vector de extremo a extremo de la macromolécula, es decir, la distancia entre dos extremos de la macromolécula, y <R> como el vector de extremo a extremo medio, de modo que el 95% de R estará dentro de $2\langle R \rangle$ en una disolución considerada apropiada por quien tiene experiencia en la técnica. Las disoluciones ejemplares incluyen, por ejemplo, una disolución diluida de la macromolécula en agua o en un tampón de pH. Particularmente, una macromolécula puede estar en un estado extendido cuando R es superior a $2,0\langle R \rangle$.

"Estado orientado" se refiere a una macromolécula en un estado que sería reconocido como orientado por quien tiene experiencia en la técnica. Una macromolécula puede estar en un estado orientado cuando está orientada con respecto a su conformación nativa en disolución, o la macromolécula está orientada cuando está dispuesta en paralelo con el campo de una fuerza capaz de orientar la macromolécula. La macromolécula puede estar orientada cuando es una de una pluralidad de macromoléculas que están dispuestas en paralelo, como es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica.

5.2. Métodos de inmovilización selectiva

Como se describió en el sumario, la presente invención proporciona un método para extender y selectivamente inmovilizar un polinucleótido. También se describen en esta memoria otros métodos para la inmovilización selectiva de una macromolécula en un estado extendido. La macromolécula, una vez selectivamente inmovilizada, puede ser utilizada con cualquier finalidad evidente para quienes tienen experiencia en la técnica.

5.2.1. Macromoléculas

En los métodos, la macromolécula puede ser cualquier macromolécula conocida por quienes tienen experiencia en la técnica, sin limitación. La macromolécula puede ser una macromolécula que sea susceptible de ser extendida mediante los métodos de la descripción. La macromolécula puede ser susceptible de ser inmovilizada en una o dos porciones, como se describe en las secciones posteriores.

Se describe en esta memoria que la macromolécula es cualquier polímero conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Por ejemplo, la macromolécula puede ser un polisacárido, un polipéptido o un polinucleótido. Los polinucleótidos útiles incluyen ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos y otros polinucleótidos conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica.

La macromolécula puede tener cualquier tamaño que sea suficiente para permitir la extensión e inmovilización de la macromolécula de acuerdo con los métodos de la invención. Cuando la macromolécula es un polinucleótido, la macromolécula puede tener una longitud superior a 500 bp, superior a 750 bp, superior a 1 kb, superior a 1,5 kb, superior a 2,0 kb, superior a 2,5 kb, superior a 3,0 kb, superior a 4,0 kb o superior a 5,0 kb. En esta descripción, cuando la macromolécula es un polipéptido, la macromolécula puede tener un tamaño superior a 50 aminoácidos, superior a 100 aminoácidos, superior a 200 aminoácidos, superior a 300 aminoácidos, superior a 400 aminoácidos, superior a 500 aminoácidos, superior a 750 aminoácidos, superior a 1000 aminoácidos, superior a 1500 aminoácidos, superior a 2000 aminoácidos, superior a 2500 aminoácidos, superior a 3000 aminoácidos, superior a 4000 aminoácidos o superior a 5000 aminoácidos. En esta descripción, cuando la macromolécula es un polisacárido, la macromolécula puede tener un tamaño superior a 50 sacáridos, superior a 100 sacáridos, superior a 200 sacáridos, superior a 300 sacáridos, superior a 400 sacáridos, superior a 500 sacáridos, superior a 750 sacáridos, superior a 1000 sacáridos, superior a 1500 sacáridos, superior a 2000 sacáridos, superior a 2500 sacáridos, superior a 3000 sacáridos, superior a 4000 sacáridos o superior a 5000 sacáridos.

La macromolécula puede ser una macromolécula nativa como es entendido por quienes tienen experiencia en la técnica, o la macromolécula puede ser una macromolécula no nativa. En esta descripción, cuando la macromolécula es un polipéptido, la macromolécula puede comprender sólo aminoácidos presentes en la naturaleza, o la macromolécula puede comprender aminoácidos presentes en la naturaleza y aminoácidos no presentes en la naturaleza. Los otros aminoácidos pueden ser cualesquier aminoácidos, o derivados o análogos de los mismos, conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica. Cuando la macromolécula es un polinucleótido, el polinucleótido puede comprender sólo nucleótidos presentes en la naturaleza, o el polinucleótido puede comprender nucleótidos presentes en la naturaleza y nucleótidos no presentes en la naturaleza. En esta descripción, cuando la macromolécula es un polisacárido, el polisacárido puede comprender sólo sacáridos presentes en la naturaleza, o el polisacárido puede comprender sacáridos presentes en la naturaleza y sacáridos no presentes en la naturaleza. Los polímeros pueden comprender sólo monómeros artificiales. La macromolécula puede comprender una pluralidad de clases de monómeros, tales como aminoácidos, nucleótidos y/o sacáridos.

La macromolécula de la descripción puede comprender sólo una cadena primaria covalentemente enlazada de monómeros. Por ejemplo, cuando la macromolécula es un polipéptido, la macromolécula puede comprender sólo una cadena primaria de aminoácidos. Cuando la macromolécula es un polinucleótido, la macromolécula es de hebra sencilla. La macromolécula puede comprender dos cadenas primarias covalentemente enlazadas de monómeros. Por ejemplo, cuando la macromolécula es un polipéptido, la macromolécula comprende dos cadenas primarias de aminoácidos. Cuando la macromolécula es un polinucleótido, la macromolécula comprende dos hebras polinucleotídicas; la macromolécula puede ser de hebra doble, en parte o en su totalidad. La macromolécula puede

comprender tres o más cadenas primarias covalentemente enlazadas de monómeros. Por ejemplo, cuando la macromolécula es un polipéptido, la macromolécula comprende tres cadenas primarias de aminoácidos. Cuando la macromolécula es un polinucleótido, la macromolécula comprende tres hebras polinucleotídicas. Por ejemplo, la macromolécula puede comprender tres hebras F1, X y F2, donde una porción de la hebra X es complementaria de la hebra F1, y una porción de la hebra X es complementaria de la hebra F2. En la Figura 2A se ilustra un ejemplo. La macromolécula puede comprender más de tres cadenas primarias covalentemente enlazadas de monómeros.

De forma ventajosa, una macromolécula de la descripción puede comprender una o más etiquetas que faciliten la detección, la obtención de imágenes o la identificación de la macromolécula mediante técnicas conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico. La etiqueta puede ser cualquier componente detectable conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Las etiquetas ejemplares para macromoléculas incluyen isótopos, radioisótopos, fluoróforos, colorantes, enzimas, ligandos, receptores, antígenos, anticuerpos, lectinas, carbohidratos y secuencias nucleotídicas detectables, y cualquier otra etiqueta detectable evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. En la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/753.758, presentada el 23 de diciembre de 2005 y titulada "Nanoreporters And Methods Of Manufacturing And Use Thereof", se describen etiquetas útiles, macromoléculas que comprenden etiquetas, y métodos para su preparación.

Un polinucleótido es un polímero de nucleobases naturales (por ejemplo, A, G, C, T y U) o sintéticas, o una combinación de ambas. La cadena principal del polinucleótido puede estar totalmente compuesta de enlaces fosfodiéster "nativos", o puede contener uno o más enlaces modificados, tal como uno o más enlaces fosforotioato, fosforditioato o fosforamidato u otros enlaces modificados. Como un ejemplo específico, un polinucleótido puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA; del inglés, *peptide nucleic acid*), que contiene interenlaces amídicos. En, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 6.001.983, Uhlman y Peyman, 1990, *Chemical Review* 90 (4): 544-584; Goodchild, 1990, *Bioconjugate Chem.* 1 (3): 165-186; Egholm et al., 1992, *J. Am. Chem. Soc.* 114: 1895-1897; Gryaznov et al., *J. Am. Chem. Soc.* 116: 3143-3144, así como en las referencias citadas en todos los documentos anteriores, se pueden hallar ejemplos adicionales de cadenas principales y bases sintéticas que se pueden utilizar junto con la invención, así como métodos para su síntesis. Las nucleobases sintéticas comunes de las cuales pueden estar compuestos los polinucleótidos incluyen 3-metiluracilo, 5,6-dihidouracilo, 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-torouracilo, 5-yodouracilo, 6-dimetil-aminopurina, 6-metil-aminopurina, 2-aminopurina, 2,6-diamino-purina, 6-amino-8-bromopurina, inosina, 5-metilcitosina, 7-desazaadenina y 7-desazaguanosina. En Fasman, *CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 1985, páginas 385-392; *Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*, Springer Verlag, Berlín; y *Chemical Abstracts*, todos los cuales proporcionan referencias a publicaciones que describen las estructuras, propiedades y preparación de dichas nucleobases, se pueden hallar ejemplos no restrictivos adicionales de nucleobases sintéticas de las que puede estar compuesto el ácido nucleico diana.

La macromolécula puede ser preparada de acuerdo con cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia en este campo técnico. De forma ventajosa, las macromoléculas de acuerdo con la descripción pueden comprender etiquetas y/o miembros de pares ligantes, como se describe en las secciones posteriores, que se pueden utilizar para facilitar la preparación y/o purificación de la macromolécula. Además, ciertas macromoléculas de la descripción son capaces de formar complejos con moléculas que comprenden miembros de pares ligantes, como se describe más adelante. Estos complejos pueden ser utilizados para facilitar la preparación y/o purificación de la macromolécula o el complejo.

5.2.2. Inmovilización de la primera porción

En el método de la invención y los métodos de la descripción, se inmoviliza una primera porción de la macromolécula. En general, la primera porción está inmovilizada si es reconocida como inmovilizada por quien tiene experiencia en la técnica. La primera porción puede ser inmovilizada mediante cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia en este campo técnico. La técnica para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula no es crítica.

La primera porción de la macromolécula puede estar en cualquier posición de la macromolécula. La primera porción puede estar en un extremo de la macromolécula. Para las presentes finalidades, una porción de una macromolécula puede estar "en un extremo" cuando está a menos de cinco, cuatro, tres, dos, uno o cero monómeros de un extremo de la macromolécula. Por supuesto, aunque muchas macromoléculas tienen dos extremos, los métodos presentes son aplicables a macromoléculas que tienen más de dos extremos y a macromoléculas que tienen uno o ningún extremo, por ejemplo, macromoléculas circulares. Alternativamente, la primera porción puede no estar en un extremo de la macromolécula.

La macromolécula puede ser inmovilizada sobre cualquier sustrato evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. El sustrato puede ser cualquier componente al que se pueda inmovilizar la macromolécula, sin limitación. El sustrato puede ser una superficie, una membrana, un glóbulo, un material poroso, un electrodo o una matriz.

La primera porción de la macromolécula puede ser inmovilizada no selectivamente. Alternativamente, la primera porción de la macromolécula puede ser inmovilizada selectivamente. De forma ventajosa, una vez que está inmovilizada la primera porción de la macromolécula, cierta porción de la macromolécula debería estar libre para moverse suficientemente para que la macromolécula pudiera ser extendida y/o orientada en operaciones siguientes

del método. Particularmente, cuando la primera porción de la macromolécula es inmovilizada no selectivamente, es importante que la macromolécula entera no esté inmovilizada no selectivamente hasta un grado que evite la extensión de cualquier porción de la macromolécula.

5 La inmovilización puede ser mediante cualquier interacción con el sustrato, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. La inmovilización puede ser a través de una interacción electrostática o iónica, a través de uno o más enlaces covalentes o a través de uno o más enlaces no covalentes, o mediante combinaciones de los puntos anteriores. La inmovilización puede ser a través de una interacción electrostática con un electrodo. Alternativamente, la inmovilización puede ser a través de una interacción electrostática con un sustrato distinto de un electrodo.

10 La primera porción de la macromolécula comprende un primer miembro de un par ligante. El primer miembro del par ligante puede estar covalentemente unido a la primera porción de la macromolécula, o pueden estar unidos no covalentemente. Los enlaces covalentes y enlaces no covalentes útiles resultarán evidentes a quienes tienen experiencia en la técnica. Resulta útil que el sustrato sobre el cual se une la primera porción de la macromolécula comprenda un segundo miembro del par ligante. El sustrato puede estar covalentemente unido al segundo miembro, o pueden estar no covalentemente unidos. La Figura 1A ilustra una macromolécula que comprende un componente F1 que es capaz de unirse selectivamente a un componente del sustrato. El componente F1 puede ser, por ejemplo, biotina, capaz de unirse, por ejemplo, a un sustrato revestido con avidina.

15 La primera porción de la macromolécula puede comprender un miembro de un par ligante que sea capaz de unirse a un miembro de un par ligante sobre el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los sustratos útiles ejemplares incluyen aquellos que comprenden un componente ligante seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas y anticuerpos. La primera porción de la macromolécula comprendería un componente ligante capaz de unirse con el componente ligante del sustrato.

20 De forma ventajosa, la primera porción de la macromolécula se puede inmovilizar en el sustrato a través de un par ligante de avidina-biotina. La macromolécula puede comprender un componente de biotina en su primera porción. Por ejemplo, una macromolécula polinucleotídica puede comprender un resto nucleotídico biotinilado. Similarmente, una macromolécula polipeptídica puede comprender un resto de aminoácido biotinilado. El sustrato que comprende avidina puede ser cualquier sustrato que comprenda avidina conocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Se dispone comercialmente de sustratos que comprenden avidina útiles, incluyendo TB0200 (Accelr8), SAD6, SAD20, SAD100, SAD500 y SAD2000 (Xantec), SuperAvidin (Array-It), portaobjetos de estreptavidina (nº de catálogo: MPC 000, Xenopore) y STREPTAVIDINslide (nº de catálogo: 439003, Greiner Bio-one).

30 La primera porción de la macromolécula puede comprender una secuencia de nucleótidos que sea capaz de unirse selectivamente a una secuencia de nucleótidos sobre el sustrato.

La primera porción de la macromolécula puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. Se dispone comercialmente de sustratos que comprenden biotina útiles, incluyendo Optiarray-biotin (Accelr8) y BD6, BD20, BD100, BD500 y BD2000 (Xantec).

35 Además, la primera porción de la macromolécula puede ser capaz de formar un complejo con una o más moléculas distintas que, a su vez, son capaces de unirse covalente o no covalentemente a un componente ligante del sustrato. Por ejemplo, una primera porción de la macromolécula puede ser capaz de unirse selectivamente a otra molécula que comprende, por ejemplo, un componente de biotina que es capaz de unirse selectivamente a, por ejemplo, un componente de avidina del sustrato. La Figura 2A ilustra una macromolécula que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula X que es capaz de unirse selectivamente a una tercera molécula que comprende F1. F1 es capaz de unirse selectivamente a un componente sobre un sustrato. La Figura 2B ilustra una macromolécula que es capaz de unirse selectivamente a una segunda molécula que comprende F1, y F1 es capaz de unirse selectivamente a un componente sobre un sustrato.

40 La primera porción de la macromolécula puede comprender un miembro de un par ligante que es capaz de reaccionar con un miembro de un par ligante sobre el sustrato para formar uno o más enlaces covalentes. Los sustratos útiles que comprenden grupos reactivos incluyen aquellos que comprenden un componente reactivo seleccionado del grupo que consiste en succinamidas, aminas, aldehídos, epóxidos y tioles. Los sustratos útiles ejemplares que comprenden componentes reactivos incluyen, pero no se limitan a, superficies que comprenden epóxido, aldehído, oro, hidrazida, sulfhidrilo, éster de NHS, amina, tiol, carboxilato, maleimida, hidroximetil-fosfina, imidoéster, isocianato, hidroxilo, éster pentafluorofenílico, psoraleno, disulfuro de piridilo y vinil-sulfona, y mezclas de los mismos. Dichas superficies se pueden obtener de fuentes comerciales o se pueden preparar de acuerdo con técnicas estándares. La primera porción de la macromolécula comprendería un componente reactivo capaz de reaccionar con el componente reactivo del sustrato. Los sustratos útiles ejemplares que comprenden componentes reactivos incluyen, pero no se limitan a, el grupo OptArray-DNA NHS (Accelr8), Nexterion Slide AL (Schott) y Nexterion Slide E (Schott).

55 La primera porción de la macromolécula puede comprender un componente reactivo que es capaz de unirse al sustrato por fotoactivación. El sustrato podría comprender el componente fotorreactivo, o la primera porción de la macromolécula podría comprender el componente fotorreactivo. Algunos ejemplos de componentes fotorreactivos incluyen aril-azidas, tal como N-[(2-piridilditio)etil]-4-azidosalicilamida; aril-azidas fluoradas, tal como el ácido 4-azido-

2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos basados en benzofenona, tal como el éster succinimidílico del ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-bromo-desoxiuridina.

La primera porción de la macromolécula puede ser inmovilizada en el sustrato a través de otros pares ligantes evidentes para quienes tienen experiencia en la técnica.

5 5.2.3. Extensión de la macromolécula

En el método de la invención y ciertos métodos de la descripción, la macromolécula está en un estado extendido. En general, cualquier macromolécula está en un estado extendido si es reconocido como tal por quien tiene experiencia en la técnica.

10 La macromolécula está en un estado extendido cuando está en el campo de una fuerza capaz de extender la macromolécula bajo unas condiciones adecuadas para que se extienda la macromolécula. Dichas fuerzas y condiciones deberían resultar evidentes a quienes tienen experiencia en la técnica. Por ejemplo, muchas macromoléculas pueden ser extendidas mediante fuerza hidrodinámica o mediante gravedad, y muchas macromoléculas cargadas pueden ser extendidas mediante fuerza electromagnética. La fuerza puede ser indirectamente aplicada a la macromolécula. Por ejemplo, la macromolécula puede comprender, o puede estar
15 covalente o no covalentemente unida a, un componente susceptible de ser movido por una fuerza. La macromolécula puede estar unida a un componente susceptible de ser movido por una fuerza electromagnética, hidrodinámica u óptica.

20 La fuerza puede ser una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando la macromolécula está cargada, tal como en el caso de un polinucleótido, la macromolécula puede ser extendida en un campo eléctrico o magnético. El campo debería ser lo suficientemente intenso para extender la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. En Matsuura et al., 2002, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20 (3): 429-36; Ferree y Blanch, 2003, *Biophys. J.* 85 (4): 2539-46; Stigter y Bustamante, 1998, *Biophys. J.* 1998, 75 (3): 1197-210; Matsuura et al., 2001, *Nucleic Acids Res.* 29 (16); y Ferree y Blanch, 2004, *Biophys. J.* 87 (1): 468-75, se describen técnicas ejemplares para extender una macromolécula en un campo eléctrico o magnético.

25 La fuerza puede ser una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchas macromoléculas, incluyendo polisacáridos, polipéptidos y polinucleótidos, pueden ser extendidas en el campo de un fluido en movimiento. La fuerza hidrodinámica debería ser lo suficientemente intensa para extender la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. En Bensimon et al., 1994, *Science* 265: 2096-2098; Henegariu et al., 2001, *BioTechniques* 31: 246-250; Kraus et al., 1997, *Human Genetics* 99: 374-380; Michalet et al., 1997, *Science* 277: 1518-1523; Yokota et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 (5): 1064-70; Otobe et al., 2001, *Nucleic Acids Research* 29: 109; Zimmerman y Cox, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22 (3): 492-7, y las Patentes de EE.UU. números 6.548.255, 6.344.319, 6.303.296, 6.265.153, 6.225.055, 6.054.327 y 5.840.862, se describen técnicas ejemplares para extender una macromolécula en un campo hidrodinámico.

35 La fuerza puede ser la gravedad. De forma ventajosa, se puede combinar la fuerza de la gravedad con, por ejemplo, fuerza hidrodinámica para extender la macromolécula. La fuerza debería ser lo suficientemente intensa para extender la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. En Michalet et al., 1997, *Science* 277: 1518-1523; Yokota et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 (5): 1064-70; y Kraus et al., 1997, *Human Genetics* 99: 374-380, se describen técnicas ejemplares para extender una macromolécula con gravedad.

40 La fuerza puede ser aplicada a través de un menisco móvil. Quienes tienen experiencia en la técnica reconocerán que un menisco móvil puede aplicar diversas fuerzas a una macromolécula, incluyendo fuerza hidrodinámica, tensión superficial y/o cualquier otra fuerza reconocida por quienes tienen experiencia en la técnica. El menisco puede ser movido mediante cualquier técnica evidente para quienes tienen experiencia en este campo técnico, incluyendo evaporación y gravedad. En, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 6.548.255, 6.344.319, 6.303.296, 6.265.153, 6.225.055, 6.054.327 y 5.840.862 se describen técnicas ejemplares para extender una
45 macromolécula con un menisco móvil.

La macromolécula puede ser extendida mediante una trampa óptica o unas pinzas ópticas. Por ejemplo, la macromolécula puede comprender, o puede estar covalente o no covalentemente unida a, una partícula capaz de ser atrapada o movida por una apropiada fuente de fuerza óptica. En Ashkin et al., 1986, *Optics Letters* 11: 288-290; Ashkin et al., 1987, *Science* 235: 1517-1520; Ashkin et al., *Nature* 330: 769-771; Perkins et al., 1994, *Science* 264: 822-826; Simmons et al., 1996, *Biophysical Journal* 70: 1813-1822; Block et al., 1990, *Nature* 348: 348-352; y Grier, 2003, *Nature* 424: 810-816, se describen técnicas útiles para mover partículas con trampas ópticas o pinzas ópticas.

La macromolécula puede ser extendida mediante combinaciones de las fuerzas anteriores, que son evidentes para quienes tienen experiencia en la técnica. Más adelante, en los ejemplos, ciertas macromoléculas son extendidas mediante una combinación de un campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica.

55 La macromolécula está extendida cuando es reconocida como extendida por quien tiene experiencia en la técnica de acuerdo con criterios estándares para la extensión de una macromolécula. La macromolécula está extendida cuando pierde la mayor parte de sus rasgos estructurales terciarios, según es reconocido por quienes tienen experiencia en

la técnica. Alternativamente, la macromolécula está extendida cuando pierde la mayor parte de sus rasgos estructurales secundarios, según es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica, o la macromolécula está extendida cuando sus rasgos estructurales primarios son detectables en cuanto a secuencia cuando se obtienen imágenes de acuerdo con técnicas estándares. En los ejemplos posteriores se describen técnicas
5 ejemplares para obtención de imágenes.

Se puede reconocer un estado extendido de una macromolécula al comparar su radio hidrodinámico con su radio hidrodinámico medio cuando está libre en disolución diluida. Por ejemplo, una macromolécula, o una porción de la misma, está extendida cuando su radio hidrodinámico es aproximadamente más del doble de su radio hidrodinámico medio en disolución diluida. Más cuantitativamente, R representa el radio hidrodinámico de la macromolécula, o de una porción de la misma, y $\langle R \rangle$ representa el radio hidrodinámico medio de la macromolécula, o de una porción de la misma, en disolución diluida. Se debería calcular el $\langle R \rangle$ medio de modo que el R de la macromolécula, o de una porción de la misma, cuando no está unida en disolución diluida, fuera menor de $2\langle R \rangle$ el 95% del tiempo. Una macromolécula, o porción de la misma, está en un estado extendido cuando R es superior a $1,5\langle R \rangle$, superior a $1,6\langle R \rangle$, superior a $1,7\langle R \rangle$, superior a $1,8\langle R \rangle$, superior a $1,9\langle R \rangle$, superior a $2,0\langle R \rangle$, superior a $2,1\langle R \rangle$, superior a $2,2\langle R \rangle$, superior a $2,3\langle R \rangle$, superior a $2,4\langle R \rangle$, superior a $2,5\langle R \rangle$ o superior a $3,0\langle R \rangle$. Particularmente, una macromolécula, o porción de la misma, está en un estado extendido cuando R es superior a $2,0\langle R \rangle$.
10
15

5.2.4. Orientación de la macromolécula

En ciertos métodos de la descripción, la macromolécula está en un estado orientado. En general, cualquier macromolécula está en un estado orientado si es reconocido como tal por quien tiene experiencia en la técnica.

La macromolécula está en un estado orientado cuando está en el campo de una fuerza capaz de orientar la macromolécula bajo unas condiciones adecuadas para orientar la macromolécula. Dichas fuerzas y condiciones deberían resultar evidentes a quienes tienen experiencia en la técnica.
20

La fuerza puede ser una fuerza electromagnética. Por ejemplo, cuando la macromolécula está cargada, tal como en el caso de un polinucleótido, la macromolécula puede ser orientada en un campo eléctrico o magnético. El campo debería ser lo suficientemente intenso para orientar la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. Anteriormente se describieron técnicas ejemplares para orientar una macromolécula en un campo eléctrico o magnético.
25

La fuerza puede ser una fuerza hidrodinámica. Por ejemplo, muchas macromoléculas, incluyendo polisacáridos, polipéptidos y polinucleótidos, pueden ser orientadas en el campo de un fluido en movimiento. La fuerza hidrodinámica debería ser lo suficientemente intensa para orientar la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. Anteriormente se describieron técnicas ejemplares para orientar una macromolécula en un campo hidrodinámico.
30

La fuerza puede ser la gravedad. De forma ventajosa, se puede combinar la fuerza de la gravedad con, por ejemplo, fuerza hidrodinámica o tensión superficial para orientar la macromolécula. La fuerza debería ser lo suficientemente intensa para orientar la macromolécula, de acuerdo con el juicio de quien tiene experiencia en la técnica. Anteriormente se describieron técnicas ejemplares para orientar una macromolécula con gravedad.
35

La fuerza puede ser una fuerza óptica. Por ejemplo, la macromolécula puede comprender, o puede estar covalente o no covalentemente unida a, una partícula susceptible de ser atrapada o movida por una apropiada fuente de fuerza óptica, como se describió anteriormente.

La macromolécula puede ser orientada mediante combinaciones de las fuerzas anteriores, que son evidentes para quienes tienen experiencia en la técnica. Más adelante, en los ejemplos, ciertas macromoléculas son orientadas mediante una combinación de un campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica.
40

La macromolécula está orientada cuando es reconocida como orientada por quien tiene experiencia en la técnica de acuerdo con criterios estándares para la orientación de una macromolécula. La macromolécula está orientada cuando está dispuesta en paralelo, como es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica, con el campo de una fuerza capaz de orientar la macromolécula, o la macromolécula está orientada cuando es una de una pluralidad de macromoléculas que están dispuestas en paralelo, como es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Por ejemplo, una pluralidad de macromoléculas pueden estar orientadas cuando el vector de un primer extremo a un segundo extremo de una macromolécula es paralelo, según es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica, a los vectores entre los correspondientes extremos de otras macromoléculas de la pluralidad.
45
50

5.2.5. Inmovilización selectiva de la segunda porción de la macromolécula

Como se discutió anteriormente, en el método de la invención y los métodos de la descripción, se inmoviliza selectivamente una segunda porción de la macromolécula. La segunda porción de la macromolécula puede ser cualquier porción de la macromolécula que no sea idéntica a la primera porción de la macromolécula. La segunda porción de la macromolécula no se solapa con ninguna parte de la primera porción de la macromolécula.
55

5 La invención y la descripción presentes proporcionan métodos que comprenden la operación individual de inmovilizar selectivamente una segunda porción de una macromolécula mientras la macromolécula está en un estado extendido u orientado y mientras una primera porción de la macromolécula está inmovilizada. En las secciones anteriores se describieron con detalle métodos ejemplares para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula y para la extensión u orientación de la macromolécula.

10 La presente descripción proporciona métodos que comprenden la operación de extender una macromolécula mientras una primera porción de la macromolécula está inmovilizada, y la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción de una macromolécula mientras la macromolécula está en un estado extendido. En las secciones anteriores se describieron con detalle métodos ejemplares para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula y para la extensión de la macromolécula.

15 La invención y la descripción presentes proporcionan métodos que comprenden la operación de inmovilizar una primera porción de una macromolécula, la operación de extender la macromolécula mientras la primera porción está inmovilizada, y la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción de una macromolécula mientras la macromolécula está en un estado extendido. Anteriormente se describieron con detalle métodos ejemplares para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula y para la extensión de la macromolécula.

20 La presente descripción proporciona métodos que comprenden la operación de orientar una macromolécula mientras una primera porción de la macromolécula está inmovilizada, y la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción de una macromolécula mientras la macromolécula está en un estado orientado. En las secciones anteriores se describieron con detalle métodos ejemplares para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula y para orientar la macromolécula.

25 La presente descripción proporciona métodos que comprenden la operación de inmovilizar una primera porción de una macromolécula, la operación de orientar la macromolécula mientras la primera porción está inmovilizada, y la operación de inmovilizar selectivamente una segunda porción de una macromolécula mientras la macromolécula está en un estado orientado. Anteriormente se describieron con detalle métodos ejemplares para la inmovilización de la primera porción de la macromolécula y para orientar la macromolécula.

30 La inmovilización selectiva de la segunda porción de la macromolécula puede seguir cualquier técnica para la inmovilización selectiva de una macromolécula, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. De forma significativa y ventajosa, la segunda porción de la macromolécula no es inmovilizada no selectivamente. La inmovilización selectiva puede permitir que la macromolécula sea inmovilizada mientras está en un estado totalmente extendido o un estado casi totalmente extendido. La inmovilización selectiva también puede permitir que la macromolécula sea inmovilizada en un modo orientado. En otras palabras, se pueden inmovilizar la primera porción y la segunda porción de la macromolécula a lo largo de la dirección del campo o los campos usados para extender la macromolécula, precediendo la primera porción a la segunda porción en el campo. Cuando se inmovilizan una pluralidad de macromoléculas, pueden ser uniformemente orientadas a lo largo del campo.

35 La segunda porción de la macromolécula puede estar en cualquier posición de la macromolécula. La segunda porción puede estar en un extremo de la macromolécula o la segunda porción puede no estar en un extremo de la macromolécula. La primera porción, descrita en las secciones anteriores, puede estar en un extremo de la macromolécula y la segunda porción puede estar en otro extremo de la macromolécula.

40 Como se discutió anteriormente, la segunda porción de la macromolécula se inmoviliza selectivamente. La inmovilización puede ser mediante cualquier interacción selectiva con el sustrato, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. La inmovilización puede ser a través de una interacción electrostática o iónica, a través de uno o más enlaces covalentes o a través de uno o más enlaces no covalentes, o mediante combinaciones de los puntos anteriores. La inmovilización puede ser a través de una interacción electrostática con un electrodo. Alternativamente, la inmovilización es a través de una interacción electrostática con un sustrato distinto del electrodo.

45 Si se inmovilizan selectivamente la primera porción y la segunda porción de la macromolécula en el mismo sustrato, las técnicas de inmovilización selectiva deberían ser desde luego compatibles con el sustrato. Las técnicas de inmovilización pueden ser las mismas. Por ejemplo, se pueden inmovilizar selectivamente tanto la primera porción como la segunda porción de la macromolécula sobre un sustrato revestido con avidina, a través de interacciones de biotina-avidina. Sin embargo, como resultará evidente a quienes tienen experiencia en la técnica, no es necesario usar la misma interacción en las porciones primera y segunda para la inmovilización sobre el mismo sustrato. Por ejemplo, el sustrato puede comprender múltiples componentes capaces de unión selectiva, o la primera porción puede ser inmovilizada no selectivamente, u otras técnicas evidentes para quienes tienen experiencia en la técnica.

50 La segunda porción de la macromolécula puede comprender un primer miembro de un par ligante. El primer miembro del par ligante puede estar covalentemente unido a la segunda porción de la macromolécula, o pueden estar unidos no covalentemente. Los enlaces covalentes y enlaces no covalentes útiles resultarán evidentes a quienes tienen experiencia en la técnica. Resulta útil que el sustrato sobre el cual se une la segunda porción de la macromolécula comprenda un segundo miembro del par ligante. El sustrato puede estar covalentemente unido al

segundo miembro, o pueden estar unidos no covalentemente.

5 La segunda porción de la macromolécula puede comprender un miembro de un par ligante que sea capaz de unirse con un miembro de un par ligante sobre el sustrato para formar uno o más enlaces no covalentes. Los sustratos útiles ejemplares incluyen aquellos que comprenden un componente ligante seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas y anticuerpos tales como los descritos en las secciones anteriores.

10 De forma ventajosa, la segunda porción de la macromolécula puede ser inmovilizada en el sustrato a través de un par ligante de avidina-biotina. La macromolécula puede comprender un componente de biotina en su primera porción. Por ejemplo, una macromolécula polinucleotídica puede comprender un resto nucleotídico biotinilado. Similarmente, una macromolécula polipeptídica puede comprender un resto de aminoácido biotinilado. En las secciones anteriores se describieron sustratos que comprenden avidina útiles.

La segunda porción de la macromolécula puede comprender avidina, y el sustrato puede comprender biotina. En las secciones anteriores se describieron sustratos que comprenden biotina útiles.

15 La segunda porción de la macromolécula puede comprender un miembro de un par ligante que sea capaz de reaccionar con un miembro de un par ligante sobre el sustrato para formar uno o más enlaces covalentes. En las secciones anteriores se describieron sustratos útiles ejemplares que comprenden grupos reactivos.

20 La segunda porción de la macromolécula puede comprender un componente reactivo que sea capaz de unirse al sustrato por fotoactivación. El sustrato podría comprender el componente fotorreactivo, o la segunda porción de la macromolécula podría comprender el componente fotorreactivo. Algunos ejemplos de componentes fotorreactivos incluyen aril-azidas, tal como N-[(2-piridilditio)etil]-4-azidosalicilamida; aril-azidas fluoradas, tal como el ácido 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoico; reactivos basados en benzofenona, tal como el éster succinimidílico del ácido 4-benzoilbenzoico; y 5-bromo-desoxiuridina.

La segunda porción de la macromolécula puede ser inmovilizada en el sustrato a través de otros pares ligantes descritos en las secciones anteriores.

25 La segunda porción de la macromolécula es capaz de formar un complejo con una o más moléculas distintas que, a su vez, son capaces de unirse covalente o no covalentemente a un componente ligante del sustrato. Por ejemplo, la segunda porción de la macromolécula puede ser capaz de unirse selectivamente a otra molécula que comprende, por ejemplo, un componente de biotina que es capaz de unirse selectivamente a, por ejemplo, un componente de avidina del sustrato. La Figura 1B ilustra una macromolécula de unirse selectivamente a una segunda molécula que comprende F3 que, a su vez, es capaz de unirse selectivamente a un componente sobre un sustrato. La interacción entre la segunda porción de la macromolécula y la molécula que comprende F3 puede ser mediada, por ejemplo, por una interacción de antígeno-anticuerpo.

30

35 Las Figuras 3A y 3B ilustran la inmovilización selectiva de una macromolécula de acuerdo con métodos de la presente invención. En la Figura 3A, una primera porción de la macromolécula comprende un componente ligante F1 que es capaz de unirse selectivamente a un componente sobre el sustrato ilustrado S. El componente ligante F1 puede ser, por ejemplo, biotina, y el sustrato S puede estar revestido con, por ejemplo, avidina. La macromolécula de la Figura 3A está extendida por una fuerza como la descrita en las secciones anteriores. En la Figura 3B, la fuerza es un potencial eléctrico. Mientras está extendida, la macromolécula es puesta en contacto con moléculas que comprenden un componente ligante F2 que es capaz de unirse selectivamente a un componente sobre el sustrato ilustrado S. El componente ligante F2 puede ser, por ejemplo biotina, y el sustrato S puede estar revestido con, por ejemplo, avidina. Resulta significativo que hasta tres moléculas que comprenden F2 son capaces de unirse selectivamente a una segunda porción de la macromolécula para inmovilizarla selectivamente en su estado extendido. Como se ilustra, las moléculas comprenden un segundo componente ligante que se une selectivamente a un componente ligante repetido de la macromolécula. Los componentes ligantes pueden ser, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico complementarias, como se ilustra en la Figura 3B. La macromolécula resultante es selectivamente inmovilizada en un estado extendido y debería permanecer extendida aun cuando se retirara la fuerza. La macromolécula extendida y selectivamente inmovilizada puede ser utilizada con cualquier finalidad evidente para quienes tienen experiencia en la técnica.

40

45

5.2.6. Inmovilización de dos porciones de una macromolécula extendida u orientada

50 La invención y la descripción presentes proporcionan métodos para la inmovilización selectiva de una primera porción y una segunda porción de una macromolécula que está en un estado extendido u orientado. Resulta significativo, de acuerdo con los métodos de la descripción, que no es necesario que la macromolécula esté inmovilizada antes de la aplicación de una fuerza capaz de extender u orientar la macromolécula.

55 En estos métodos, la macromolécula es extendida u orientada, o ambas cosas, por una fuerza capaz de extender u orientar la macromolécula. Dichas fuerzas se describieron con detalle en las secciones anteriores. La fuerza es una fuerza capaz de extender u orientar la macromolécula mientras la macromolécula se mantiene en una posición, es decir, una fuerza capaz de extender u orientar sin mover sustancialmente la macromolécula. Las fuerzas ejemplares

incluyen campos electromagnéticos oscilantes y campos hidrodinámicos oscilantes. La fuerza puede ser un campo eléctrico oscilante. En Asbury et al., 2002, *Electrophoresis* 23 (16): 2658-66; Kabata et al., 1993, *Science* 262 (5139): 1561-3; y Asbury y van den Engh, 1998, *Biophys. J.* 74: 1024-30, se describen técnicas ejemplares para extender u orientar una macromolécula en un campo eléctrico oscilante.

- 5 En los métodos, la macromolécula es inmovilizada por una primera porción y por una segunda porción mientras está extendida u orientada. Tanto la primera porción como la segunda porción pueden ser inmovilizadas no selectivamente, ambas pueden ser inmovilizadas selectivamente, o una puede ser inmovilizada selectivamente y la otra no selectivamente. En las secciones anteriores se describieron con detalle técnicas para la inmovilización de la primera porción y la segunda porción.

10 5.2.7. Sustrato para inmovilización

El sustrato para la inmovilización puede ser cualquier sustrato capaz de unirse selectivamente a la macromolécula, evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. Además, en ciertos aspectos, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden una macromolécula selectivamente inmovilizada en un estado extendido. Las composiciones comprenden un sustrato, como se describe en esta memoria, que tiene inmovilizado sobre él una macromolécula en un estado extendido. Desde luego, la macromolécula puede ser inmovilizada de acuerdo con un método de la invención o la descripción.

El único requisito del sustrato es que sea capaz de unirse selectivamente a la segunda porción de la macromolécula, como se describió anteriormente. De este modo, el sustrato puede ser un filtro o una membrana, tal como una nitrocelulosa o un nailon, vidrio, un polímero tal como poliacrilamida, un gel tal como agarosa, dextrano, celulosa, poliestireno, látex o cualquier otro material conocido por quienes tienen experiencia en la técnica en el que se pueden inmovilizar compuestos de captura. El sustrato puede estar compuesto de un material poroso, tal como un producto acrílico, un copolímero de estireno y metacrilato de metilo, y etileno/ácido acrílico.

El sustrato puede tomar cualquier forma con tal de que la forma no evite la inmovilización selectiva de la segunda porción de la macromolécula. Por ejemplo, el sustrato puede tener la forma de un disco, una lámina, una tira, un glóbulo, una partícula submicrométrica, un glóbulo magnético revestido, una almohadilla de gel, un pocillo para microtitulación, un portaobjetos, una membrana, una frita u otra forma conocida por quienes tienen experiencia en la técnica. El sustrato está opcionalmente dispuesto dentro de un alojamiento, tal como una columna para cromatografía, una columna para centrifugación, un cuerpo de jeringa, una pipeta, una punta de pipeta, una placa de 96 o 384 pocillos, un microcanal, un capilar, etcétera, que facilita el flujo de fluido sobre, o a través de, el sustrato.

La macromolécula puede ser inmovilizada sobre un único sustrato o sobre una pluralidad de sustratos. Por ejemplo, se pueden inmovilizar las porciones primera y segunda de la macromolécula sobre el mismo sustrato, como es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica. Se puede inmovilizar la primera porción de la macromolécula sobre un primer sustrato, mientras que se puede inmovilizar la segunda porción de la macromolécula sobre un segundo sustrato distinto del primero.

El sustrato puede ser preparado de acuerdo con cualquier método evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. Para una revisión de las innumerables técnicas que se pueden utilizar para activar sustratos ejemplares de la invención con una densidad suficiente de grupos reactivos, véanse *Wiley Encyclopedia of Packaging Technology*, 2ª edición, redactado por Brody y Marsh, "Surface Treatment", páginas 867-874, John Wiley & Sons (1997), y las referencias en esa obra citadas. En Atkinson y Smith, "Solid Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Phosphite Triester Method" en *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, redactado por M. J. Gait, 1984, IRL Press, Oxford, particularmente en las páginas 45-49 (y las referencias en esa obra citadas), se describen métodos químicos adecuados para generar grupos amino sobre sustratos de óxido de silicio; en Pease et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5022-5026 (y las referencias en esa obra citadas), se describen métodos químicos adecuados para generar grupos hidroxilo sobre sustratos de óxido de silicio; y en Lloyd Williams et al., 1997, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, capítulo 2, CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU. (y las referencias en esa obra citadas), se describen métodos químicos para generar grupos funcionales sobre polímeros tales como poliestireno, poliamidas y poliestirenos injertados.

Los sustratos útiles ejemplares incluyen superficies revestidas con estreptavidina, por ejemplo, Accelr8 TB0200. Otros sustratos útiles incluyen superficies revestidas con N-hidroxisuccinamida que son capaces de reaccionar con una porción de una macromolécula que comprende una amina. Una de tales superficies es OptArray-DNA (Accelr8). Son superficies útiles adicionales las revestidas con aldehído (por ejemplo, Nexterion Slide AL, Schott) y las superficies revestidas con epóxido (por ejemplo, Nexterion Slide E, Schott). Otra superficie útil es una superficie revestida con BSA biotinizada, útil para la inmovilización selectiva de una porción de una macromolécula que comprende avidina o estreptavidina.

55 5.3. Métodos para usar macromoléculas extendidas u orientadas y selectivamente inmovilizadas

Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas con cualquier finalidad evidente para quienes tienen experiencia en la técnica. Por ejemplo las macromoléculas extendidas y/o

orientadas y selectivamente inmovilizadas son útiles para mapeo, nanoensamblaje y resonancia de plasmones superficiales.

5 Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para macromolecular con una diversidad de técnicas, tales como, por ejemplo, microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica.

Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para mapeo macromolecular. Por ejemplo, pueden ser utilizadas para determinar la posición de unión o hibridación a lo largo de una macromolécula mediante, por ejemplo, moléculas fluorescentes o proteínas ligantes de DNA.

10 Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para nanoensamblaje. Por ejemplo, pueden ser utilizadas para facilitar el crecimiento de cristales sobre macromoléculas extendidas y/o orientadas, o el crecimiento de cristales sobre polipéptidos enlazados o unidos a macromoléculas extendidas y/o orientadas. Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para la construcción de nanovías. Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para transporte dirigido usando motores moleculares, tales como cinesina o miosina. Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para cálculos moleculares o para el ensamblaje de circuitos que comprenden macromoléculas, es decir, cálculos de DNA. Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para manipular nanotubos de carbono.

20 Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para el estudio de proteínas ligantes de polinucleótidos. Pueden ser utilizadas, por ejemplo, para determinar la presencia oposición de una proteína unida a un polinucleótido. Las técnicas útiles incluyen la resonancia de plasmones superficiales.

Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para el estudio de fibras proteicas, tales como amiloide, titina y fibronectina.

25 Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser utilizadas para crear códigos de barras macromoleculares con las finalidades de separación y detección secuencial de etiquetas. Estas etiquetas espaciadas a lo largo de la molécula proporcionan un código único que puede ser leído cuando la macromolécula está inmovilizada y extendida y/o orientada. La extensión y/o orientación con inmovilización selectiva puede facilitar la descodificación del código de barras macromolecular.

30 Las macromoléculas extendidas y/o orientadas y selectivamente inmovilizadas pueden ser además utilizadas en cualquier contexto en que pueda ser útil la detección o la obtención de imágenes de una macromolécula. Pueden ser usadas con fines de diagnóstico, pronóstico, terapia y exploración. Por ejemplo, pueden ser aplicadas al análisis de muestras biomoleculares obtenidas o derivadas de un paciente, con objeto de determinar si un tipo celular morbozo está presente en la muestra y/o de graduar la enfermedad. Pueden ser utilizadas para diagnosticar infecciones patógenas, por ejemplo, infecciones por bacterias y virus intracelulares, al determinar la presencia y/o cantidad de marcadores de bacteria o virus, respectivamente, en la muestra. Las composiciones y los métodos de la invención se pueden utilizar para cuantificar moléculas diana cuya abundancia es indicativa de un estado biológico o una condición morboza, tales como, por ejemplo, marcadores sanguíneos que resultan suprarregulados o infrarregulados como resultado de un estado morbozo. Además, las composiciones y los métodos de la invención se pueden utilizar para proporcionar información de pronóstico que ayude a determinar el curso de un tratamiento para un paciente.

40 5.4. Kits que comprenden macromoléculas extendidas u orientadas y selectivamente inmovilizadas

La descripción proporciona además kits que comprenden uno o más componentes de la invención. Los kits pueden comprender, por ejemplo, un sustrato de acuerdo con la invención y una o más macromoléculas extendidas y/o orientadas, o ambas cosas, selectivamente inmovilizadas sobre el sustrato. Los kits se pueden utilizar con cualquier finalidad evidente para quienes tienen experiencia en la técnica, incluyendo las finalidades anteriormente descritas.

45 La presente descripción también proporciona kits útiles para la extensión y/o orientación e inmovilización selectiva de macromoléculas. Los kits pueden comprender un sustrato para inmovilización y una o más parejas ligantes para facilitar la extensión y/o orientación o inmovilización de una macromolécula. Las parejas ligantes podrían comprender un componente útil para la extensión y/o orientación de la macromolécula bajo una fuerza apropiada. Las parejas ligantes podrían facilitar la inmovilización o inmovilización selectiva de la macromolécula en la superficie. El kit podría comprender una macromolécula para extensión y/o orientación e inmovilización. El kit podría comprender un dispositivo capaz de extender la macromolécula.

50 La presente descripción proporciona kits que comprenden un recipiente y uno o más componentes de los kits anteriormente descritos.

55 Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar esta invención y no han de ser considerados en modo alguno como restrictivos del alcance de esta invención.

6. Ejemplos

6.1. Ejemplo 1: Inmovilización selectiva de DNA extendido

Se funcionaliza un híbrido de RNA-DNA de doble hebra, de 7,2 kb de longitud, por un extremo con biotina. En el otro extremo, el DNA comprende una secuencia de hebra sencilla de 15 bases repetidas cuatro veces (5'-GTC TAT CAT CAC AGC GTC TAT CAT CAC AGC GTC TAT CAT CAC AGC-3'; ID. SEC. nº 1). De esta manera, el DNA comprende cuatro sitios ligantes en un extremo para inmovilización selectiva. El híbrido también tiene 4 regiones con fluoróforos Cy3 incorporados al RNA.

Se transfiere una pequeña muestra del DNA (3 µl, 0,01 femtomoles/µl en TAE 1X, o Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH de 8,0) a un dispositivo para microfluidos que comprende un canal moldeado en polidimetilsiloxano que está pasivamente adherido a un cubreobjetos revestido con estreptavidina (Accelr8, TB0200). Las dimensiones del canal son 50 µm x 1 mm x 10 mm. Véase la Figura 4A. Se pone la muestra en contacto con el cubreobjetos a temperatura ambiental durante 15 minutos, lo que permite que el DNA se una selectivamente a la superficie de estreptavidina a través de la biotina del extremo del DNA. El DNA no unido se elimina por lavado mediante flujo de fluido. Se cambia el tampón de TAE 1X de los pocillos por tampón fresco y se igualan los niveles de fluido de cada pocillo a 30 µl. Véase la Figura 4A.

Se aplica un campo eléctrico de 200 V/cm para extender el largo DNA negativamente cargado (véase la Figura 4B) hacia el electrodo positivo.

Se añade al pocillo negativo un agente de inmovilización, un oligonucleótido biotilado [5'-biotina\GCTGTGATGATAGAC-3' (ID. SEC. nº 2), 50 µl a 100 nM, TAE 1X] complementario del segundo extremo del DNA. El volumen adicional eleva el nivel de fluido en el pocillo y provoca un flujo hidrostático para introducir el reactivo de inmovilización en el canal (véase la Figura 4C). El flujo también actúa, además del campo eléctrico, para estirar más el DNA.

El oligonucleótido biotilado se hibrida con el segundo extremo del DNA mientras está extendido y se une selectivamente a la estreptavidina del cubreobjetos. La muestra puede ser eficazmente inmovilizada en un estado extendido en menos de 5 minutos.

6.2. Ejemplo 2: Obtención de imágenes de macromoléculas extendidas y selectivamente inmovilizadas

Se prepara y purifica una macromolécula que comprende etiquetas fluoróforas y marcadores de afinidad de biotina, de acuerdo con el Ejemplo 3. La macromolécula es unida a la superficie de un cubreobjetos que comprende biotina y es estirada con un campo eléctrico de acuerdo con el Ejemplo 3. Finalmente, se irradia la macromolécula con una lámpara de arco y se toman imágenes con una cámara. En la Figura 5 se proporciona una imagen ejemplar. En la imagen se pueden detectar colorantes individuales y, significativamente, el orden de esos colorantes sobre macromoléculas individuales.

6.3. Ejemplo 3: Preparación y obtención de imágenes de macromoléculas extendidas y selectivamente inmovilizadas

Se presenta aquí, paso a paso, un ejemplo de la construcción de un nanoinformador a partir de diversos componentes. Se puede apreciar que se pueden construir o añadir diversos componentes a la vez que, o antes o después de, otros componentes. Por ejemplo, las hibridaciones de prolongaciones o unidades de parche a un andamio se pueden hacer simultáneamente o una después de otra.

6.3.1. Producción de andamios

Se hibrida el DNA circular de hebra sencilla M13mp18 (USB) con un oligonucleótido complementario del sitio de reconocimiento de Bam HI (oligonucleótido Bam Cutter) en un exceso molar de 5 veces, y se corta con la enzima de restricción Bam HI para producir una cadena principal lineal de DNA de hebra sencilla. Se añade posteriormente un oligonucleótido complementario del oligonucleótido Bam Cutter (oligonucleótido anti-Bam) en un exceso de 50 veces, para secuestrar el oligonucleótido Bam Cutter libre y evitar de este modo la recircularización del M13 durante operaciones posteriores.

La molécula lineal de M13 sirve como andamio sobre el cual se pueden hibridar parches de RNA, o segmentos de RNA, con fluoróforos incorporados.

6.3.2. PCR para formar posiciones de doble hebra sobre el andamio de M13

Se diseñaron diez conjuntos de pares de cebadores oligonucleotídicos para crear 10 regiones diferentes a lo largo del andamio de M13. Cada par contiene un cebador que tiene un promotor de RNA polimerasa de T7 en el extremo 5'. Se diseñan las regiones 2-7 para que tengan una longitud de 900 bases (aproximadamente 300 nm), ya que este es el tamaño aproximado de un punto limitado por la difracción (el punto más pequeño que se puede alcanzar con una óptica estándar). Las regiones 1 y 8 tienen versiones tanto largas como cortas: las versiones largas cubren la

región completa de 900 bases, mientras que las versiones cortas cubren sólo una porción de la región de 900 bases para permitir que se ligue una secuencia específica de la diana. De esta manera, se puede fijar una secuencia específica de la diana a cualquier extremo. Los extremos pueden ser también utilizados para la fijación de anclas o etiquetas.

- 5 La PCR se lleva a cabo usando Taq polimerasa y 0,5 ng de MP13mp18 (USB) de hebra doble como molde. Se depuran las mezclas de reacción usando un kit de purificación Qiaquick de Qiagen. Cada reacción PCR produce un fragmento de doble hebra que corresponde a un segmento específico, como se ilustra más adelante. Estos fragmentos se utilizan como moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos de RNA.

6.3.3. Transcripción *in vitro* para producir segmentos de RNA oscuros

- 10 Utilizando los productos de PCR anteriormente descritos como moldes de doble hebra, se generan segmentos de RNA usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (kit Megascript T7). Los productos de las reacciones de transcripción son purificados (incluyendo el tratamiento con DNasa I para eliminar el molde) usando un kit RNeasy de Qiagen.

6.3.4. Transcripción *in vitro* para producir segmentos de RNA modificados con grupos aminoalilo

- 15 Utilizando los productos de PCR anteriormente descritos como moldes de doble hebra, se generan segmentos de RNA para posterior copulación de colorantes, usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion (kit MessageAmp aRNA). Se incorporan nucleótidos UTP modificados con aminoalilo a los segmentos de RNA durante la transcripción. Los productos de las reacciones de transcripción son purificados (incluyendo el tratamiento con DNasa I para eliminar el molde) usando un kit RNeasy de Qiagen.

- 20 6.3.5. Copulación de colorantes con segmentos de RNA aminoalílicos para producir segmentos de RNA coloreados

Se copulan 20-100 µg de segmento de RNA modificado con aminoalilo, con colorantes de éster de NHS usando el kit Ambion Aminoallyl Labeling. Los colorantes usados incluyen Alexa 488, Alexa 594 y Alexa 647 (Invitrogen/Molecular Probes) así como Cy3 (Amersham).

- 25 Cada segmento se prepara separadamente en 4 colores para que cada posición del andamio pueda ser ocupada por un segmento de cualquiera de los cuatro colores; de esta manera, se pueden añadir diferentes colores en diferentes posiciones para crear muchas combinaciones cromáticas únicas.

En esta realización particular, los segmentos adyacentes deben ser de diferentes colores o puede haber segmentos oscuros entremezclados para que cada segmento se detecte como una "mancha" individual. Los segmentos oscuros se pueden usar como parte del código nanoinformador.

- 30 6.3.6. Ensamblaje de la molécula etiqueta

Se hibridan segmentos para cada posición en una relación 2:1 de segmento a andamio de M13, en tampón SSPE 1X a 70 °C durante 2 horas.

- 35 En las Figuras 6A-6B se representa un nanoinformador ensamblado, con segmentos de RNA etiquetados. En la Figura 6A se representa un nanoinformador en que sólo están etiquetadas "manchas" alternas (1, 3, 5 y 7), y en la Figura 6B se representa un nanoinformador en que todas las manchas están etiquetadas.

6.3.7. Síntesis de oligonucleótidos sonda y diana

- 40 Se sintetizó un oligonucleótido diana de DNA S2 y se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Integrated DNA Technologies). Se generaron moléculas diana de RNA S2 mediante la transcripción *in vitro* de productos de PCR correspondientes a la región del gen clonado del coronavirus del SARS (Invitrogen), usando un kit Ambion Megascript™ según las instrucciones del fabricante. La sonda fantasma S2 [Figura 8A (i)] era complementaria de una región específica de 50 bases de la secuencia diana S2 (S2-a) y fue sintetizada con un monómero de biotina-TEG en el extremo 5' y purificada mediante cromatografía de alta eficacia en fase líquida (Integrated DNA Technologies). Se sintetizó un segundo oligonucleótido con 50 bp complementarias de la diana S2 (S2-b) más 9 bp de una secuencia adicional utilizada para la ligación al andamio de M13 (59 bp en total) y se purificó por HPLC (Integrated DNA Technologies). Adviértase que las regiones diana S2-a y S2-b no se solapaban.

6.3.8. Síntesis de nanoinformadores

- 50 Se ligó el oligonucleótido S2-b al extremo 5' de M13 linearizado [Figura 8A (iii)] y se eliminó el oligonucleótido no ligado residual del producto resultante por purificación mediante filtración de exclusión por tamaños a través de un filtro YM100 (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generaron segmentos de RNA modificados con amino-alilo, complementarios de M13 en las posiciones 2, 4, 6 y 8 (Figura 7A), a partir de la transcripción *in vitro* de moldes de DNA (productos de PCR) por medio del kit Ambion Megascript™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Los segmentos fueron luego copulados con colorante Alexa 647 modificado con éster de NHS (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de Ambion (kit Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA). Se generaron

segmentos de RNA correspondientes a las posiciones 1, 3, 5 y 7 del andamio de M13 (Figura 7C) como RNAs transcritos *in vitro* no modificados, a partir de moldes de DNA como los anteriormente descritos. El ensamblaje del nanoinformador se llevó a cabo hibridando 10 femtomoles/ μ l de cada uno de los ocho segmentos con 5 femtomoles/ μ l del andamio de M13-S1-*b* durante 2 horas a 70 °C en tampón SSPE 1X (cloruro sódico 150 mM, fosfato sódico 10 mM, EDTA 1 mM). El producto final era un nanoinformador con 4 segmentos etiquetados con A647 (rojo), entremezclados con segmentos oscuros.

6.3.9. Condiciones de hibridación

La hibridación de nanoinformadores y sondas fantasma para la diana se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: SSPE 5X (cloruro sódico 750 mM, fosfato sódico 50 mM, EDTA disódico 5 mM), sonda fantasma (oligonucleótido S2-*a* de fijación) 40 pM, nanoinformador S2-*b* 40 pM, 100 ng/ μ l de DNA fragmentado de esperma de salmón, disolución de Denhardt 5X y Tween al 0,1%. Las concentraciones finales de las dianas fueron 20 pM de diana de DNA S2 (Figura 8B) y 1 pM de diana de RNA S2 (Figura 8C). No se añadió diana alguna al testigo negativo (Figura 8D). La mezcla de la reacción de hibridación fue incubada a 65 °C durante al menos 16 horas.

Las mezclas de las reacciones de hibridación fueron diluidas a 1:2 con disolución de tampón de borato 100 mM (pH de 9,8) y fueron introducidas en un canal de célula de flujo y unidas a un cubreobjetos revestido de estreptavidina que formaba el fondo del canal (cubreobjetos Streptavidin-OptiChem de Accelr8). Se realizó la fijación al portaobjetos por un extremo del complejo de nanoinformador/diana/sonda fantasma a través de la interacción de la superficie de estreptavidina con la sonda fantasma biotinilada. Después de enjuagar el canal con tampón de borato adicional para eliminar los informadores en exceso no unidos a la superficie, se cambió el tampón por TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y se aplicó una corriente de 200 V para estirar los complejos de nanoinformador/diana durante la captura de imágenes.

6.3.10. Fijación a una superficie

Una vez que los nanoinformadores están fijados tanto a la molécula diana como a los correspondientes ácidos nucleicos etiquetados, es decir, a los ácidos nucleicos fijados a monómeros etiqueta, son fijados a una superficie y estirados para resolver el orden de las señales emitidas por los monómeros etiqueta y, de esta manera, identificar la molécula diana. En este ejemplo, los nanoinformadores son estirados para resolver espacialmente sus códigos de colorante fluorescente que corresponden a una molécula diana concreta. Los nanoinformadores son estirados fijando un extremo a una superficie (en este ejemplo, un cubreobjetos; véanse las preparaciones posteriores). Se pueden usar dos métodos para la fijación a una superficie: A) portaobjetos revestidos de estreptavidina de Accelr8 Corporation con los nanoinformadores que están biotinilados, y B) portaobjetos revestidos de biotina con los nanoinformadores que tienen estreptavidina. En el tampón, los nanoinformadores son puestos en contacto con la superficie activa y dejados en incubación durante un periodo de tiempo. La reacción se lleva a cabo en células de flujo que estaban hechas de PDMS moldeado en obleas de silicio grabadas, para hacer los canales. Se utilizan tubos metálicos para perforar los pocillos en los extremos de los canales, para la inserción de tampones y muestras. Las dimensiones de los canales son 0,5 mm o 1 mm de anchura y 54 μ m de altura. Una vez que la muestra ha sido cargada en el carril de la célula de flujo y ha sido incubada, se deberían fijar los nanoinformadores. Se pueden estirar los nanoinformadores al aplicar un voltaje o al retirar el líquido con un menisco que retrocede y deja los hilos estirados y secos.

6.3.11. Preparación de la superficie y ensamblaje del dispositivo

Las superficies de unión (cubreobjetos revestidos, marca Streptavidin-OptiChem de Accelr8) se envían en unidades de 5 superficies por recipiente de portaobjetos, y cada recipiente está encerrado en una bolsita de papel metálico con un paquete de agente desecante de sílice. Las bolsitas se almacenan a -20 °C hasta su uso.

Para preparar la superficie para la unión, se extrae primero una bolsita de la nevera y se deja que su temperatura alcance la ambiental a lo largo de varios minutos. Si no se hubiera abierto previamente, se corta luego la bolsita a lo largo de un borde para formar una abertura y se saca el recipiente de superficies. Tras la extracción de la superficie requerida, se vuelve a poner el recipiente en la bolsita con su agente desecante, se cierra herméticamente la abertura con una tira de cinta para embalar y se vuelve a poner la bolsita en la nevera.

La superficie es luego ligeramente enjuagada con una corriente de agua Nanopure (Barnstead Nanopure Diamond) y es empapada durante 10 minutos en PBS 1X filtrado a través de un filtro de 0,2 μ m, en un recipiente Coplin con acanaladuras limpio. Después del empapamiento, la superficie es sumergida en agua Nanopure y es secada haciendo pasar nitrógeno filtrado a través del borde de la superficie.

El dispositivo de PDMS usado para acoplar con la superficie y proporcionar la localización de la muestra es limpiado justo antes de su uso aplicando una cinta de celofán a la superficie de PDMS y desprendiendo luego el polvo u otras partículas que hubieran podido quedar fijadas durante el almacenamiento. La cara de unión de la superficie de Accelr8 es puesta hacia arriba, y la estructura de PDMS limpia es centrada, con el lado del canal hacia abajo, sobre la superficie. El PDMS se adhiere fácilmente al vidrio revestido y no es necesario ningún mecanismo más de fijación.

6.3.12. Unión de muestras y lavado

5 Se une la muestra a la superficie aplicando primero una gota de 5 μ l de la muestra (generalmente diluida en tampón de borato sódico 100 mM, pH de 9,8) a un pocillo del carril elegido. La gota debería tocar exactamente el punto en que el canal se junta con el pocillo (algo de muestra puede entrar en el canal en ese punto). Se llena el canal, y se iguala la unión por todo el canal, arrastrando la gotita a través del canal hasta el pocillo opuesto usando un vacío muy débil (< 2 kPa). Se repite el proceso para las otras muestras en sus respectivos carriles. Se elimina luego de los pocillos el fluido en exceso, se tapan los pocillos con cinta adhesiva para reducir la evaporación y se incuban el dispositivo a temperatura ambiental en la oscuridad durante 20 minutos.

10 Después de la unión, se retira la cinta adhesiva y se llena el pocillo superior de cada carril con 100 μ l del tampón de borato anteriormente descrito. Se arrastran aproximadamente 20 μ l de ese tampón a través de los canales hasta los otros pocillos utilizando el vacío y se repite el proceso una vez. Luego se retira todo tampón de borato de todos los pocillos y se llena el pocillo superior con TAE 1X, pH de 8,3. Se arrastran aproximadamente 50 μ l de TAE a través del canal y luego se retira todo el TAE y se vuelve a llenar el pocillo. Se repite el proceso tres veces, para un total de aproximadamente 150 μ l de enjuague con TAE. Finalmente, se llenan todos los pocillos con 100 μ l de TAE 1X.

6.3.13. Electroestiramiento

15 Se salpica aceite de inmersión en el fondo del dispositivo de cubreobjetos/PDMS y se coloca éste en el microscopio. Se insertan electrodos en los pocillos de los extremos opuestos del primer canal de PDMS (el electrodo negativo en el pocillo superior, el positivo en el fondo). La primera imagen del canal se tomará cerca del pocillo inferior; se ajusta la platina del microscopio para que quede enfocada la zona de interés.

20 Luego se aplica voltaje (200 V) a través del canal. El voltaje es suministrado por una fuente de alimentación de corriente continua (Agilent E3630A) y es amplificado 100 veces mediante un amplificador de alto voltaje (Matsusada Precision Inc.). Una vez que se ha aplicado la corriente, se reajusta el foco y comienza el proceso de toma de imágenes.

Luego se repite el proceso de electroestiramiento y de toma de imágenes con los restantes canales. Se toman imágenes de los nanoinformadores.

25 6.3.14. Fuente lumínica para los colorantes fluorescentes sobre el nanoinformador

Al ser utilizada una lámpara de arco como fuente lumínica, en la selección de los mejores fluoróforos se consideran los tipos más brillantes que no conducen a solapamiento de fluorescencia, tales como Alexa 488, Cy3 y Alexa 594. También se pueden utilizar colorantes fluorescentes más débiles, tales como Alexa 647 y Cy5.5.

6.3.15. Filtros para tomar imágenes de los colorantes fluorescentes sobre el nanoinformador

30 En cuanto a los fluoróforos seleccionados Alexa 488, Cy3, Alexa 594 y Alexa 647, puede haber un solapamiento entre Cy3 y Alexa 594. Sin embargo, el pedido por encargo de un filtro de emisión con una anchura de banda de 572-600 nm minimiza el solapamiento.

6.3.16. Microscopio y objetivos para tomar imágenes de los nanoinformadores

35 El modelo de microscopio utilizado es el Nikon Eclipse TE2000E de Nikon Incorporation, usándose un sistema invertido para toma de imágenes de fluorescencia que tiene 6 cartuchos filtrantes que permiten la selección de la emisión de fluorescencia procedente de múltiples candidatos a colorante fluorescente. Para los colorantes seleccionados, la resolución óptica requerida es aproximadamente 400 nm para todas las longitudes de onda (500-700 nm). El objetivo seleccionado es el objetivo Nikon Plan Apo TIRF, que tiene una apertura numérica (NA; del inglés, *numerical aperture*) de 1,45 y una amplificación de 60 aumentos. La resolución óptica es \sim 210-300 nm para las diferentes longitudes de onda.

40 Cinco minutos antes de ser utilizado el microscopio (Nikon Eclipse TE2000E), se enciende la fuente lumínica (X-Cite 120, Exfo Corporation) y se asegura que la intensidad es la máxima. Se enciende el controlador de la cámara CCD (Hamamatsu, Orca Ag) y el controlador del obturador. Se utiliza el objetivo de aceite de 60 x 1,45 NA (Plan Apo TIRF, Nikon) para evaluar los nanoinformadores. Para todas las evaluaciones de nanoinformadores se ajusta la lente Optivar a 1x. Se abre el software Metamorph (Universal Imaging Corporation). Se adquieren las imágenes utilizando los correspondientes conjuntos filtrantes, tales como Cy3 y A647 (Chroma Technologies).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC.
- <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN MACROMOLÉCULAS INMOVILIZADAS Y ORIENTADAS Y MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN
- 5 <130> 11612-014-228
- <140> para ser asignado
- <141> con la misma fecha que la presente
- <150> 60/753.816
- <151> 2005-12-23
- 10 <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows, versión 4.0
- <210> 1
- <211> 60
- <212> DNA
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> 4 repeticiones de 15 bases que actúan como sitios ligantes para inmovilización selectiva
- <400> 1
- gtctatcatc acagcgtcta tcatcacagc gtctatcatc acagcgtcta tcatcacagc 60
- 20 <210> 2
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> oligonucleótido biotinilado como un agente de inmovilización
- <400> 2
- gctgtgatga tagac 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para extender y selectivamente inmovilizar un polinucleótido, que comprende las operaciones de:
 - a) inmovilizar una primera porción de dicho polinucleótido sobre una superficie;
 - b) aplicar a dicho polinucleótido una fuerza capaz de extender dicho polinucleótido; y
 - 5 c) poner una segunda porción de dicho polinucleótido en contacto con una molécula, en donde dicha molécula comprende un primer componente capaz de unirse a la segunda porción de dicho polinucleótido y un segundo componente capaz de unirse selectivamente a dicha superficie, en unas condiciones bajo las cuales dicha molécula se une selectivamente a la segunda porción de dicho polinucleótido y se une selectivamente a dicha superficie, inmovilizándose por ello selectivamente dicho polinucleótido en un estado extendido.
- 10 2. Una superficie que comprende un polinucleótido extendido y selectivamente inmovilizado, preparado de acuerdo con la Reivindicación 1.
3. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido inmovilizado está extendido entre la primera porción y la segunda porción.
- 15 4. El método de la Reivindicación 1, en donde la primera porción de dicho polinucleótido es selectivamente inmovilizada.
5. El método de la Reivindicación 1, que comprende además la operación de inmovilizar selectivamente la primera porción de dicho polinucleótido extendido, antes de la operación de inmovilizar selectivamente la segunda porción.
6. El método de la Reivindicación 1, en donde la superficie comprende dicho segundo componente de la molécula para la inmovilización selectiva del polinucleótido.
- 20 7. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho primer componente de la molécula es seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas, anticuerpos, biotina, digoxigenina, FITC, avidina, estreptavidina, anti-digoxigenina y anti-FITC.
8. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho segundo componente de la molécula es seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, ácidos nucleicos, receptores, anticuerpos, biotina, digoxigenina, FITC, avidina, estreptavidina, anti-digoxigenina y anti-FITC.
- 25 9. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha primera porción del polinucleótido comprende un primer componente de una molécula que es capaz de unirse selectivamente con el segundo componente de dicha molécula para inmovilizar selectivamente dicha primera porción del polinucleótido.
10. El método de la Reivindicación 1, en donde el primer componente se une no covalentemente a dicho polinucleótido o en donde el primer componente se une covalentemente a dicho polinucleótido.
- 30 11. El método de la Reivindicación 10, en donde la superficie comprende dicho segundo componente de la molécula para la inmovilización selectiva del polinucleótido.
12. El método de la Reivindicación 11, en donde dicho primer componente de la molécula es seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, carbohidratos, ácidos nucleicos, receptores, lectinas y anticuerpos, biotina, digoxigenina, FITC, avidina, estreptavidina, anti-digoxigenina y anti-FITC.
- 35 13. El método de la Reivindicación 11, en donde dicho segundo componente de la molécula es seleccionado del grupo que consiste en ligandos, antígenos, ácidos nucleicos, receptores y anticuerpos, biotina, digoxigenina, FITC, avidina, estreptavidina, anti-digoxigenina y anti-FITC.
14. El método de la Reivindicación 4, en donde la inmovilización selectiva es a través de uno o más enlaces no covalentes o en donde la inmovilización selectiva es a través de uno o más enlaces covalentes.
- 40 15. El método de la Reivindicación 4, en donde dicha segunda porción del polinucleótido comprende el primer componente que es capaz de reaccionar selectivamente con el segundo componente para inmovilizar selectivamente dicha segunda porción del polinucleótido.
16. El método de la Reivindicación 15, en donde la superficie comprende dicho segundo componente de la molécula para la inmovilización selectiva del polinucleótido.
- 45 17. El método de la Reivindicación 16, en donde dicho primer componente y/o dicho segundo componente son seleccionados del grupo que consiste en succinamidas, aminas, aldehídos, epóxidos y tioles.

18. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha fuerza es seleccionada del grupo que consiste en gravedad, fuerza electromagnética y fuerza hidrodinámica.
19. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha fuerza es un potencial eléctrico.
- 5 20. El método de la Reivindicación 18, en donde dicha fuerza es la gravedad o en donde dicha fuerza es fuerza hidrodinámica.
21. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido es de hebra sencilla o en donde dicho polinucleótido comprende múltiples hebras complementarias o en donde dicho polinucleótido comprende dos hebras complementarias o en donde dicho polinucleótido comprende tres hebras complementarias.
- 10 22. El método de la Reivindicación 1, en donde dicho polinucleótido es ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico.
23. El método de la Reivindicación 1, en donde la segunda porción es un extremo de dicho polinucleótido.
24. El método de la Reivindicación 1, en donde la primera porción es un extremo de dicho polinucleótido.
25. El método de la Reivindicación 1, en donde la primera porción y la segunda porción son extremos de dicho polinucleótido.
- 15 26. El método de la Reivindicación 1, en donde dicha segunda porción y/o dicha primera porción no es un extremo de dicho polinucleótido.
27. El método de la Reivindicación 1, en donde se inmovilizan selectivamente una pluralidad de porciones, además de la primera porción, de dicho polinucleótido extendido.
- 20 28. El método de la Reivindicación 1, que comprende además inmovilizar selectivamente una tercera porción de dicho polinucleótido extendido.
29. El método de la Reivindicación 1, en donde la fuerza es capaz de orientar el polinucleótido.

FIG. 1A

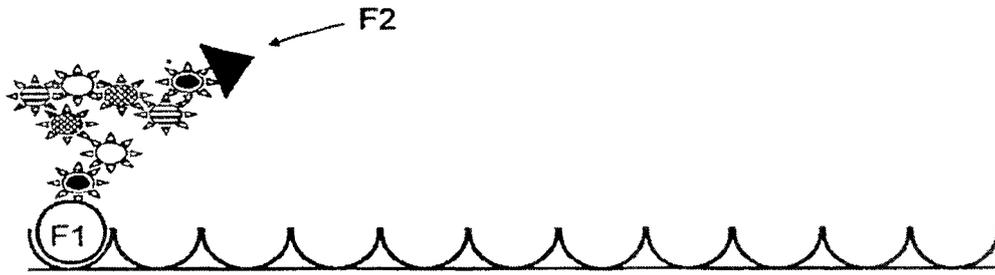


FIG. 1B

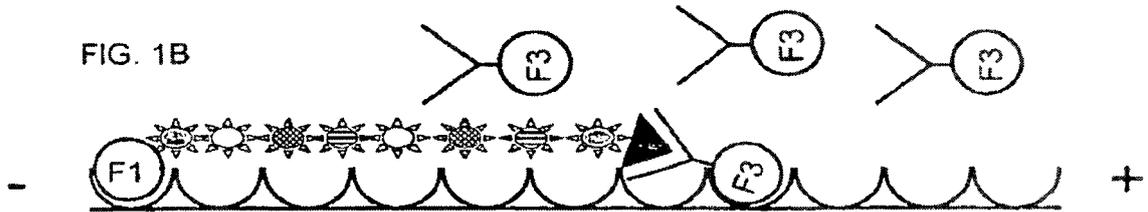


FIG. 2A

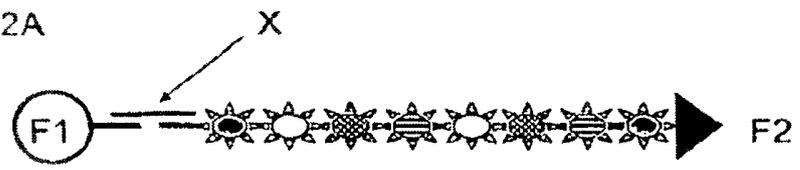


FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 3A

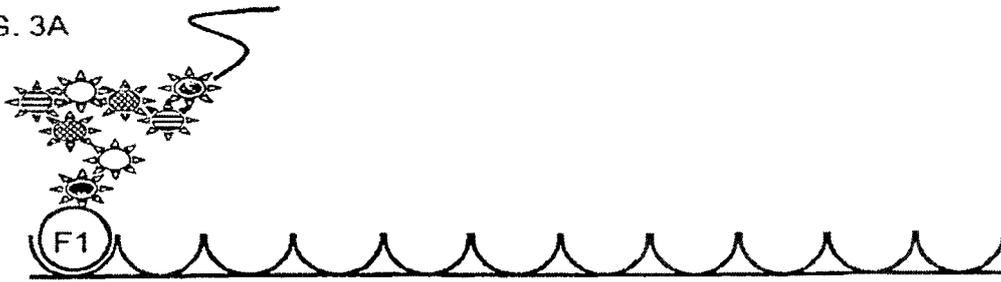


FIG. 3B

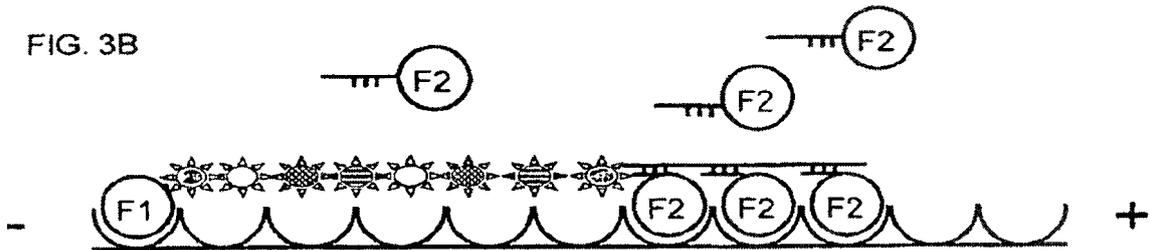


FIG. 3C

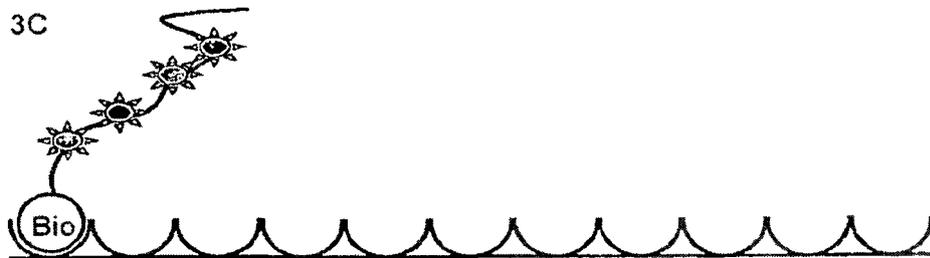


FIG. 3D

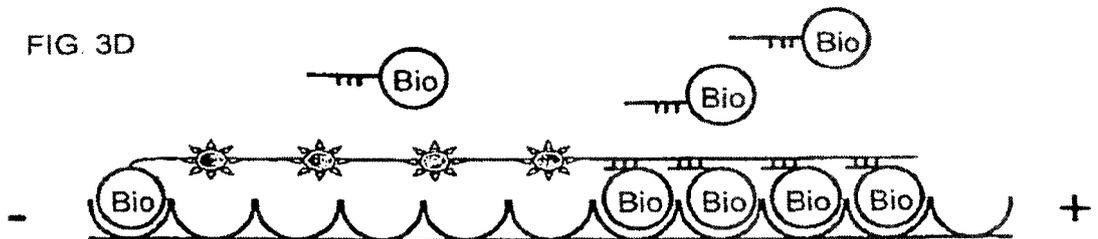


FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C

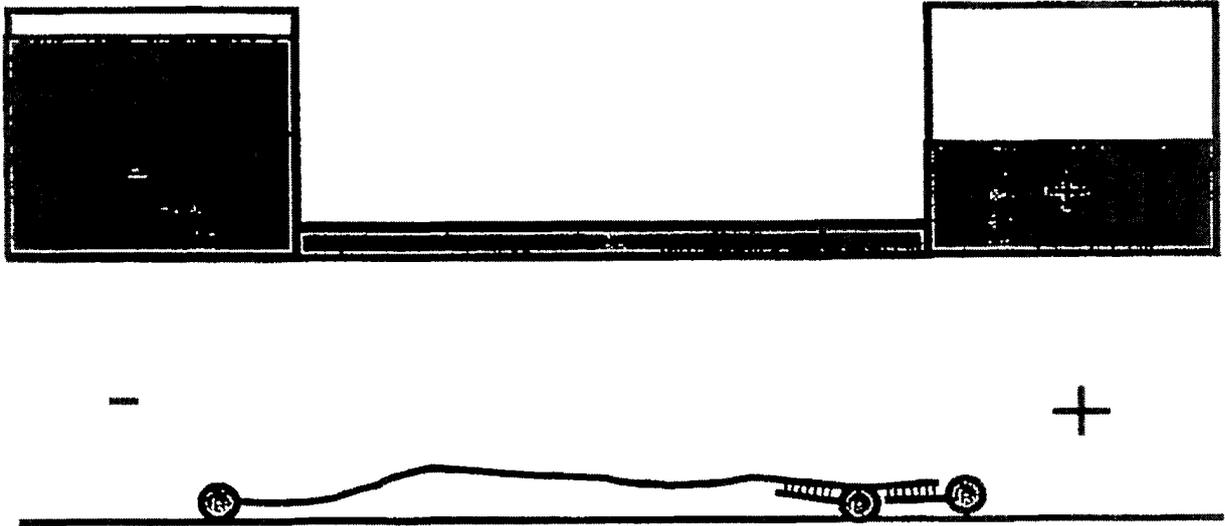


FIG. 5

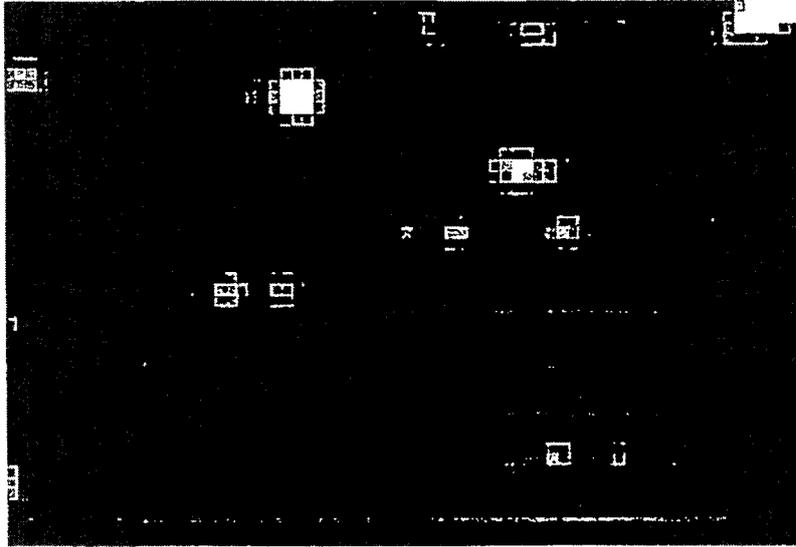


FIG. 6A

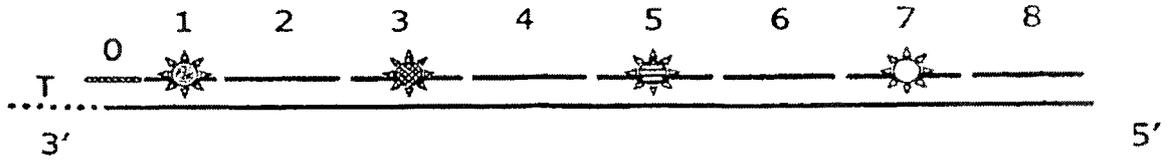


FIG. 6B

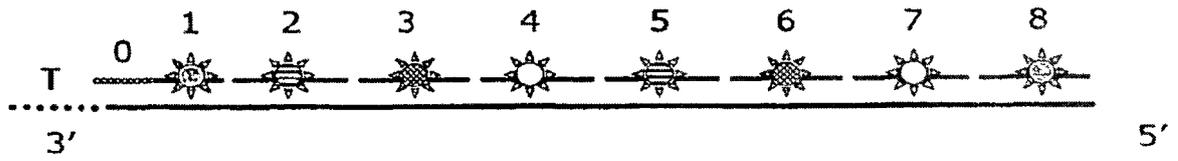


FIG. 7A

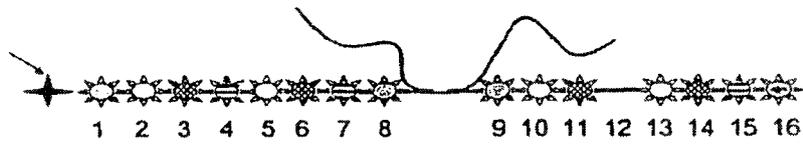


FIG. 7B

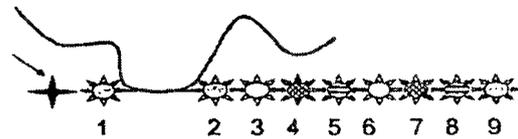


FIG. 7C

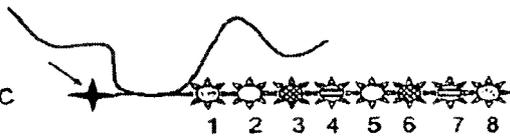


FIG. 8A

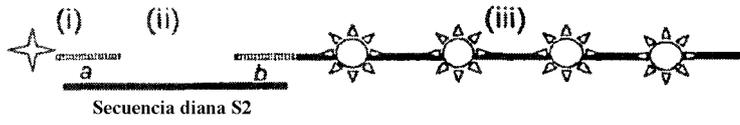


FIG. 8E

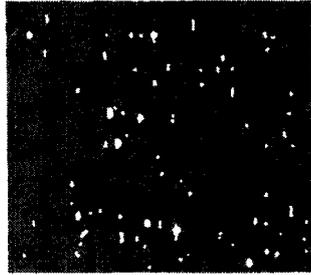


FIG. 8B

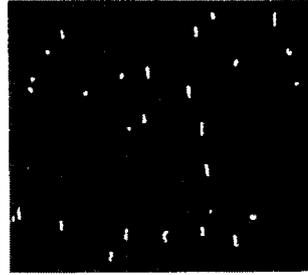


FIG. 8C



FIG. 8D