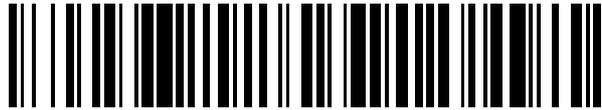


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 571**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/414** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2002 E 10157896 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2211173**

54 Título: **Aparato y procedimiento de detección de fluctuaciones localizadas de carga iónica durante una reacción química mediante el uso de transistores de efecto de campo sensibles a iones**

30 Prioridad:

**09.03.2001 GB 0105831**

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

**29.01.2014**

73 Titular/es:

**DNA ELECTRONICS LTD (100.0%)  
Ugli Campus Block C, 56 Wood Lane  
London W12 7SB, GB**

72 Inventor/es:

**TOUMAZOU, CHRISTOFER y  
PURUSHOTHAMAN, SUNIL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 440 571 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

Aparato y procedimiento de detección de fluctuaciones localizadas de carga iónica durante una reacción química mediante el uso de transistores de efecto de campo sensibles a iones

5 La presente invención se refiere a un aparato y procedimiento sensor y, en particular aunque no de forma exclusiva, a un aparato y procedimiento sensor adecuado para secuenciar ADN.

10 Los procedimientos de secuenciación de ADN han permanecido prácticamente invariables durante los últimos 20 años [1]. El método de Sanger es un método muy conocido de secuenciación de ADN y comprende síntesis de ADN con terminación de la replicación del ADN en los puntos de inserción de los didesoxinucleótidos. A la síntesis de ADN le sigue electroforesis del ADN sintetizado para separar las moléculas de ADN de acuerdo con sus proporciones masa/carga, de modo que permite la determinación de la secuencia de ADN.

15 Una desventaja del método de Sanger es que la electroforesis es compleja, cara y azarosa.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un aparato y procedimiento sensor que supere o mitigue al menos una de las desventajas anteriores.

20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento sensor que comprende las etapas de proporcionar una mezcla de un ácido nucleico desconocido y una polimerasa, insertar una base nucleotídica conocida para la síntesis de ácido nucleico, detectar la salida de una señal eléctrica de un transistor de efecto de campo sensible a iones, monitorizar la señal eléctrica para discriminar las fluctuaciones del pH y asociar las fluctuaciones del pH con la inserción de la base nucleotídica conocida en el ácido nucleico sintetizado para identificar una o más bases del ácido nucleico desconocido.

25 Los inventores se han dado cuenta que se pueden medir las fluctuaciones localizadas de la carga iónica que se producen en la superficie de un transistor de efecto de campo. Aunque los transistores de efecto de campo sensibles a iones ya se conocen, anteriormente se han usado para monitorizar cambios lentos de, por ejemplo, valores absolutos del pH en una mezcla de reacción como un todo. No se han usado para monitorizar las fluctuaciones localizadas de la carga iónica. En una disposición conocida de una disposición del transistor de efecto de campo sensible a iones se realiza una determinación del valor absoluto del pH de la mezcla de reacción cada 30 segundos. Normalmente se producirán muchos millones de reacciones químicas entre determinaciones y esto se ve como un cambio del valor absoluto del pH. La invención permite monitorizar acontecimientos individuales de una reacción química.

30 Normalmente, cada acontecimiento comprenderá varias miles de moléculas todas sometidas a la misma reacción al mismo tiempo.

35 Preferentemente, la reacción química es la síntesis de ADN y las fluctuaciones de la carga iónica indican la inserción de didesoxinucleótidos trifosfato ((ddNTP) y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).

40 Una limitación de las disposiciones de los transistores de efecto de campo sensibles a iones es que intentan medir valores absolutos de pH y, en consecuencia, sufren desviaciones e histéresis. La invención monitoriza las fluctuaciones de la carga iónica en lugar de valores absolutos y, por tanto, evita este problema.

45 Preferentemente, se monitoriza el momento en el cual se producen las fluctuaciones y la magnitud de las fluctuaciones para permitir la secuenciación de ADN o de ARNm.

50 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un aparato sensor que comprende un transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) dispuesto para generar una señal de salida eléctrica, el ISFET se puede exponer a un ácido nucleico desconocido, una polimerasa y una base nucleotídica conocida, medios para monitorizar la señal de salida eléctrica para discriminar las fluctuaciones del pH y medios adaptados para asociar las fluctuaciones del pH en la señal de salida eléctrica con una inserción de una base nucleotídica conocida para la síntesis de ácido nucleico para identificar una o más bases del ácido nucleico desconocido.

55 Preferentemente, la reacción química es la síntesis de ADN y las fluctuaciones de la carga iónica indican la inserción de didesoxinucleótidos trifosfato ((ddNTP) y desoxinucleótidos trifosfato (dNTP).

60 Preferentemente, el medio de monitorización está dispuesto para monitorizar el momento en el cual se producen las fluctuaciones localizadas y la magnitud de las fluctuaciones localizadas para permitir la secuenciación de ADN o de ARNm.

Sakurai y col., Anal. chem. 1992, 64, 1996-1997 divulgan la monitorización en tiempo real de las reacciones de la ADN polimerasa mediante un micro sensor del pH ISFET.

65 A continuación se describirá una realización específica de la invención a modo de ejemplo únicamente en referencia a las figuras adjuntas en las que:

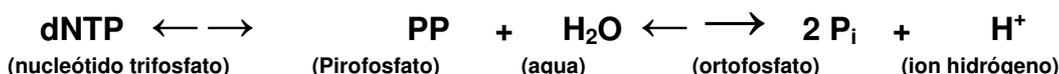
La Figura 1 muestra los cambios de pH que se producen durante la hidrólisis de pirofosfato usando un medio de reacción tamponado.

La Figura 2 es un diagrama esquemático de un transistor de efecto de campo abarcado por la invención;

La Figura 3 es un diagrama esquemático de un par de transistores de efecto de campo abarcados por la invención; y

La Figura 4 es una representación esquemática de los resultados obtenidos usando el par de transistores de efecto de campo.

La secuenciación del ADN usando una realización de la invención se realiza del siguiente modo: Una cantidad de ADN de interés se amplifica usando una reacción en cadena de la polimerasa o clonación y la región de interés se cebe usando ARNm. La ADN polimerasa cataliza la síntesis de ADN mediante la incorporación de bases nucleotídicas en una cadena de ADN en crecimiento. Esto se acompaña in vivo de la hidrólisis de pirofosfato, que a pH fisiológico conduce a la liberación de iones hidrógeno [2].



Con las flechas ' $\leftarrow \rightleftharpoons$ ' se pretende indicar reacciones reversibles. Con la diferencia entre los tamaños de las flechas de la derecha se pretende indicar que es más energícamente favorable a ir desde el pirofosfato y el agua al ortofosfato y un ion hidrógeno que al contrario.

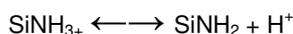
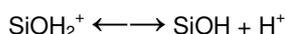
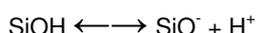
Los resultados mostrados en la figura 1 demuestran la reacción de hidrólisis de pirofosfato y su efecto sobre el pH. El pH se midió usando una disposición de electrodos vítreos con mediciones del valor absoluto del pH tomadas cada 30 segundos. Se puede ver que el pH disminuye de forma gradual. La realización de la invención usa esta reacción para monitorizar la inserción de nucleótidos detectando fluctuaciones localizadas de pH que se producen en la superficie de un transistor de efecto de campo (FET) sensible a iones o adyacentes a la misma.

El FET está provisto de una capa de nitruro de silicio sensible a iones encima de la cual se proporciona una capa de polimerasa. El FET detecta la hidrólisis del pirofosfato por la pirofosfatasa que permanece unida a la enzima polimerasa [7]. La hidrólisis es indicativa de la inserción de nucleótidos durante la síntesis de ADN. La magnitud del cambio del pH en cualquier dirección (es decir, positiva o negativa) se detecta para detectar de un modo fiable la inserción de nucleótidos, como se describe más adelante. La inserción de nucleótidos individuales se producirá aproximadamente cada 3 ms a una temperatura de 65° C, [6]). El FET puede detectar cambios rápidos de pH y tiene una tasa de respuesta inmediata medida en un plazo de 1 ms de un cambio de pH [5].

La hidrólisis de pirofosfato causa una producción neta o consumo de iones hidrógeno dependiendo del pH al que se produce la reacción. En la realización de la invención, la reacción se lleva a cabo a pH 6,8. A pH 6,8, los iones hidrógeno se consumen en general en lugar de liberarse durante la inserción de nucleótidos. Por tanto, la realización de la invención monitoriza elevaciones del pH como indicadores de la inserción de nucleótidos.

Un FET sensible al pH abarcado por la invención se muestra en la figura 2. El FET es similar a un MOSFET (transistor de efecto de campo semiconductor de óxido metálico) tradicional. El FET comprende una capa dieléctrica de óxido de silicio 1, una capa sensible química de nitruro de silicio 2 y una interfaz enzima/electrolito 3. Las capas 1, 2 y la interfaz 3 se localizan entre una fuente 4 y un drenaje 5 (la configuración convencional de un FET). El FET se proporciona sobre un circuito de silicio, que está encapsulado en una resina epoxi para protegerlo de la mezcla de reactivo. La resina epoxi ayuda a proteger el FET de la hidratación y la migración de la carga [9]. El propio FET no está cubierto por resina epoxi de modo que puede estar sumergido en la mezcla de reacción.

La interfaz enzima/electrolito 3 mostrada en la figura 2 permite la sensibilidad a iones de la capa de nitruro de silicio 2 para usar para la secuenciación de ADN. El FET funciona produciendo un intercambio de iones cargados entre la superficie de la capa sensible química 2 y el medio de reacción (es decir, la interfaz enzima/electrolito 3):



La inclusión de nitruro de silicio es ventajosa porque proporciona una sensibilidad mayor y más rápida a los cambios de pH de lo que se obtendría en ausencia de nitruro de silicio. Además, el nitruro de silicio ayuda a proteger al FET de la hidratación y la migración de cargas].

Una respuesta no Nernstiana constituye la sensibilidad inmediata del FET, que surge de la rápida unión y desunión dependiente de protones de los iones cargados en la superficie de la compuerta aislante de nitruro de silicio, que tiene como resultado una variación reproducible del descenso del voltaje a través de la capa de nitruro de silicio 2. La variación del descenso de voltaje a través de la capa de nitruro de silicio 2 se correlaciona con los cambios del pH. El descenso del voltaje se monitoriza usando un sistema de circuitos de instrumentación de modo que permite la detección de inserciones de nucleótidos individuales. El voltaje medido se denomina voltaje de banda plana.

La interfaz enzima/electrolito 3 se deposita sobre la capa de nitruro de silicio usando un procedimiento de unión enzimática conocido [10]). El procedimiento comprende la presilanización de la capa de nitruro de silicio 2 usando una solución de aminosilano y, después, activando la superficie usando glutaraldehído. Después, un descenso de la solución tampón/enzima polimerasa se deposita sobre la capa de nitruro de silicio 2 y se deja secar durante aproximadamente media hora para formar la capa enzimática 3.

La realización mostrada en la figura 2 usa un electrodo de referencia 6 para proporcionar una determinación de los cambios de pH. El electrodo de referencia es relativamente grande y difícil de fabricar. Una realización alternativa de la invención no usa un electrodo de referencia sino que, en su lugar, usa un segundo FER que tiene la misma construcción en el primer FET, pero se proporciona con una capa unida no enzimática en vez de la capa enzimática 3. Esta configuración es ventajosa porque proporciona una determinación diferencial que da una proporción señal-ruido mejorada.

La realización alternativa de la invención se ilustra en la figura 3. La configuración de estas realizaciones se basa en una construcción conocida [11] que previamente se ha usado para monitorizar la lenta desviación gradual del pH. La realización comprende un primer amplificador operacional 10 al que se conecta la fuente del primer FET 11 (el primer FET tiene la capa enzimática unida) y un segundo amplificador operacional 12 al que se conecta la fuente del segundo FET 13 (el segundo FET tiene la capa no enzimática unida). Los drenajes de los FET primero y segundo están conectados a una fuente de corriente fija (no mostrado). Las salidas de los amplificadores operacionales primero y segundo se pasan a un amplificador diferencial 14, que amplifica la diferencia entre las salidas para generar una señal de salida  $V_{out}$ . La retroalimentación negativa del amplificador diferencial 14 pasa a un electrodo noble 15 que se localiza en la mezcla de reactivos. El amplificador operacional 14 genera un voltaje de salida que mantiene igual el voltaje aplicado a los FET 11, 13, a pesar de los cambios de la concentración de hidrógeno.

La realización mostrada en la figura 3 es ventajosa porque permite la racionalización de fabricación de los FET 11, 13 y los amplificadores operacionales 10, 12, 15.

Los FET 11, 13 se pueden disponer para formar la primera etapa de los amplificadores operacionales 10, 12. Esto se realiza para cada amplificador operacional sustituyendo un FET convencional de un par de cola larga localizado en la entrada del amplificador operacional, con el primero o segundo FET 11, 13. Esto es ventajoso porque permite que el primer y el segundo FET formen parte del sistema de circuitos de amplificación.

Un ejemplo esquemático de un voltaje de banda plana detectado usando la realización mostrada en la figura 2 se ilustra en la figura 4. El ejemplo es para un NMOS FET con la reacción funcionando en modo de consumo de iones, como se ha descrito anteriormente (la figura se invertiría para un PMOS FER o si la reacción funcionara en el modo de liberación de iones). El voltaje de banda plana consiste en pulsos que representan cambios de pH asociados con inserción de nucleótidos y descensos correspondientes a la inserción de ddNTP y terminación de la cadena. El número de pulsos locales antes de un descenso más grande determina el número de bases presentes antes de la terminación en una base conocida; la magnitud del descenso más grande depende de la proporción de ddNTP: dNTP usada en la mezcla de reactivos y es importante debido a la dependencia de la longitud leída para dicho descenso. Mediante la repetición del procedimiento cuatro veces en diferentes cámaras de reacción cada una de las cuales contiene los cuatro ddNTP por separado, se delinea la secuencia completa.

En referencia a la figura 4 con detalle, la síntesis de ADN se realiza con terminación de la síntesis de ADN en puntos de inserción de didesoxinucleótidos de bases de timina. Cada inserción de nucleótido individual produce la liberación de un ion hidrógeno y estos se detectan como pulsos del voltaje de banda plana, como se puede observar en la figura 4. Cuando la cadena de ADN alcanza una base de timina, la inserción de nucleótidos se evita para algunas de las cadenas de ADN y la cantidad de consumo de iones de hidrógeno desciende, lo que conduce a un descenso de a salida de la señal. La síntesis de ADN continua para las cadenas de ADN que se habían terminado en la base timina y esto se ve como pulsos del voltaje de banda plana al nuevo nivel menor. El voltaje de banda plana desciende de nuevo cuando la cadena de ADN alcanza una segunda base de timina y después continúa pulsando al nivel menor.

El procedimiento se puede usar con o sin termociclado. Por ejemplo, el termociclado se puede usar para facilitar la optimización usando polimerasa taq como enzima de secuenciación [12]. Por ejemplo, el pH de la mezcla de reactivos se puede ajustar. Una disminución del pH conducirá a la producción de más iones de hidrógeno, pero también tenderá a finalizar la reacción. En ensayos se ha mostrado que el pH 6,8 es un valor útil de pH. A la mezcla de reacción se puede añadir magnesio para que actúe la enzima. Las concentraciones de los reactivos se pueden modificar.

En la tabla 1 se expone una secuencia típica de termociclado.

**Tabla 1. Secuenciación de ciclo**

Temperatura	Duración	Función
95 °C	30 s	Desnaturalización del molde de ADN
55 °C	30 s	Hibridación del cebador
72 °C	60 s	Extensión y terminación del ADN

5 La operación en un ciclador térmico permite múltiples repeticiones del procedimiento de secuenciación con una manipulación mínima. Esto permite una descarga de señal-ruido y una delineación más fácil de las regiones difíciles de leer tales como las regiones ricas en GC y las áreas de repeticiones de nucleótidos únicos.

10 En lugar de la taq polimerasa se puede usar T7 polimerasa recombinante. Cuando se usa T7 polimerasa, esto puede proporcionar un aumento de la velocidad y mejor precisión de la monitorización de la inserción de nucleótidos.

Las etapas usadas para fabricar el FET sensible a enzimas se exponen más adelante en la tabla 2.

**Tabla 2**

<b>SUSTRATO DE SILICIO PURIFICADO</b>
<b>ADICIÓN DE DOPANTE: PRODUCCIÓN DE SUSTRATO DE TIPO p</b>
<b>OXIDACIÓN DE SUPERFICIE: CAPA DE GENERACIÓN DE SiO<sub>2</sub></b>
<b>DEFINICIÓN DE FUENTE/DRENAJE E IMPLANTACIÓN</b>
<b>DEPÓSITO DE NITRURO DE SILICIO USANDO LPCVD*</b>
<b>FORMACIÓN DE CONTACTO</b>
<b>PASIVACIÓN</b>
<b>SUSTRATO DE SILICIO PURIFICADO</b>
<b>ADICIÓN DE DOPANTE: PRODUCCIÓN DE SUSTRATO DE TIPO p</b>
<b>OXIDACIÓN DE SUPERFICIE: CAPA DE GENERACIÓN DE SiO<sub>2</sub></b>
<b>DEFINICIÓN DE FUENTE/DRENAJE E IMPLANTACIÓN</b>
<b>DEPÓSITO DE NITRURO DE SILICIO USANDO LPCVD*</b>
<b>FORMACIÓN DE CONTACTO</b>
<b>PASIVACIÓN</b>

15 Los FET y, en particular, los mostrados en la figura 3, y las etapas de amplificación pueden sustituirse o combinarse con transistores PMOS que funcionan en la región de inversión débil. Esto es ventajoso porque permite usar la ganancia exponencial producida por los transistores PMOS. Cuando esto se realiza, se puede hacer que una señal de otro modo decadente se comporte al contrario y se eleve.

20 La longitud del ADN que se puede secuenciar normalmente estará limitada por la señal-ruido en bases distales a medida que la señal decae con la inserción de ddNTP. El uso de PMOS FET debería permitir la extensión de la longitud de la lectura pero puede implicar un posible compromiso sobre la localización de las bases más proximales. La instalación de dos circuitos de FET separados, del tipo mostrado en la figura 3, un par NMOS de FET y un par de PMOS de FET deberían proporcionar la longitud de lectura óptima. Es posible que se produzcan sesgos en inversión débil, ya que la determinación a realizar es la de los cambios en la salida en lugar de los valores absolutos y no se requiere una linealidad absoluta en la amplificación de la señal para el análisis de la señal.

30 Las determinaciones se pueden repetir para proporcionar mejores proporciones de señal-ruido.

**Referencias**

1) F. Sterky, J. Lundeberg, "Sequence of genes and genomes, Journal of Biotechnology, vol. 76 pp. 1-31,2000.

35 2) Mathews, Holde, Ahem, Biochemistry, 2ª Ed.

3) Yuri A. Shakhov, Pal Nyren, 'A Sensitive and Rapid Method for Determination of Pyrophosphate Activity' Acta Chemica Scandinavica B 36 (1982) pp 689-694

4) R. Buck, "Electrochemistry of Ion-Selective Electrodes ", Sensors and Actuators, (1), pp. 197- 260, 1981

40 5) P. Woias, L. Meixner, D. Amandi, y col., "Modelling the short-time response of ISFET sensors," Sensors and Actuators B, 24-25, pág. 211-217,1995

6) Taor, S. y Richardson, C. C, "DNA Sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions" Journal of Biological Chemistry, pp 8322-8328, 1990

7) L. Victorova y col., "New substrates of DNA polymerases," Federation of European Biochemical Societies Letters, 453, pp. 6-10, 1999

45 8) Hanazato y col., "Integrated Multi-Biosensors Based on an Ion-sensitive Field-Effect Transistor Using Photolithographic Techniques", IEEE Transactions of Electron Devices, vol. 36, pp. 1303- 1310, 1989.

9) Matsuo, M. Esashi, "Methods of ISFET fabrication" Sensors and Actuators, 1, pág. 77-96, 1981

- 10) N. F. Starodub and W. Torbicz y col., "Optimisation methods of enzyme integration with transducers for analysis of irreversible inhibitors ", Sensors and Actuators B, 58, pp. 420-426, 1999
- 11) Hon-Sum Wong, Marvin White. "A Self-Contained CMOS Integrated pH Sensor," Electron Devices Meeting.
- 5 12) Alphey Luke, "DNA sequencing: from experimental methods to bioinformatics"

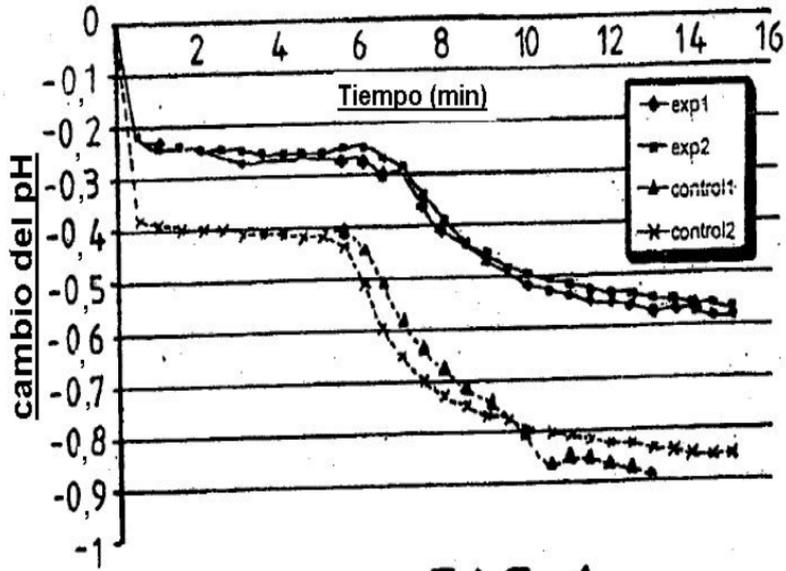
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento sensor que comprende las etapas de:
  - 5           proporcionar una mezcla de un ácido nucleico desconocido y una polimerasa; insertar una base nucleotídica conocida para la síntesis de ácido nucleico; detectar una salida de señal eléctrica desde un transistor de efecto de campo sensible a iones; monitorizar la señal eléctrica para discriminar las fluctuaciones de pH; y
  - 10          asociar las fluctuaciones de pH con la inserción de la base nucleotídica conocida al ácido nucleico sintetizado para identificar una o más bases del ácido nucleico desconocido.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se detecta la inserción de uno o más nucleótidos al final de una cadena nucleotídica.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se detecta la inserción de un didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP) al final de una cadena nucleotídica.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en el que se observa la síntesis de ADN y las fluctuaciones en la señal eléctrica indican la inserción de uno o más desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y la terminación de la síntesis de ADN mediante la inserción de un didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP).
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el momento en el cual se producen las fluctuaciones y la magnitud de las fluctuaciones se monitorizan para permitir la secuenciación de ADN o de ARNm.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el procedimiento incluye termociclado.
- 30 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende repetir la reacción y las etapas de detección y de monitorización varias veces para mejorar las proporciones de señal-ruido.
8. Un aparato sensor que comprende:
  - 35           un transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) dispuesto para generar una señal de salida eléctrica, pudiendo estar el ISFET expuesto a un ácido nucleico desconocido, una polimerasa y una base nucleotídica conocida;
  - 40           medios para monitorizar la señal de salida eléctrica para discriminar las fluctuaciones de pH; y medios adaptados para asociar las fluctuaciones de pH en la señal de salida eléctrica a una inserción de una base nucleotídica conocida para la síntesis de ácido nucleico para identificar una o más bases del ácido nucleico desconocido.
9. Un aparato sensor de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el transistor de efecto de campo sensible a iones está provisto de una capa unida mediante enzima.
- 45 10. Un aparato sensor de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la capa unida mediante enzima comprende polimerasa.
11. Un aparato sensor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que las fluctuaciones en la señal de salida eléctrica identifican la inserción de uno o más nucleótidos al final de una cadena nucleotídica.
- 50 12. Un aparato sensor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el transistor de efecto de campo sensible a iones está configurado para generar la señal de salida eléctrica en respuesta a una reacción de hidrólisis de pirofosfato.
- 55 13. Un aparato sensor de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el aparato comprende dos transistores de efecto de campo sensibles a iones, estando provisto un primero de los transistores de una capa unida a enzima y estando provisto un segundo de los transistores de una capa unida no mediante enzima, y medios para determinar la diferencia entre las señales eléctricas generadas por los transistores primero y segundo, para proporcionar una señal de salida eléctrica.
- 60 14. Un aparato sensor de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los transistores primero y segundo están conectados a un primero y un segundo amplificadores operacionales y las salidas de los amplificadores operacionales se pasan a un amplificador diferente que proporciona la señal de salida eléctrica.

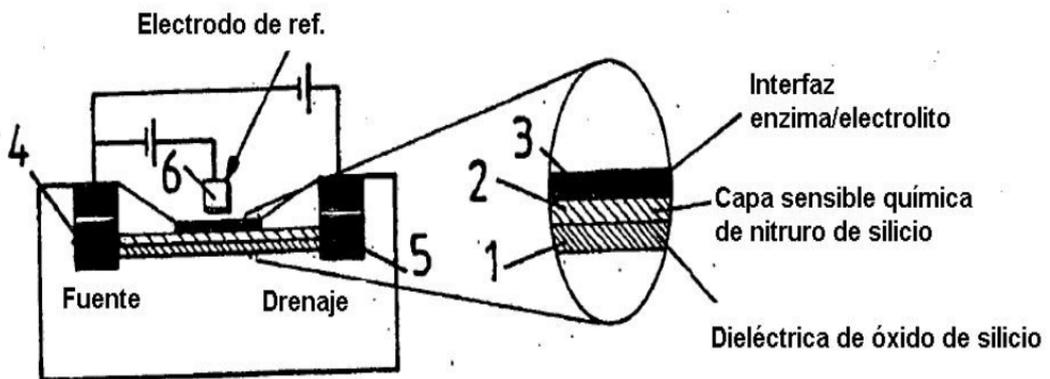
15. Un aparato sensor de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la señal de salida eléctrica se pasa a un electrodo localizado en la mezcla de reactivo, para mantener voltajes aplicados a los transistores primero y segundo a un nivel constante.

- 5 16. Un aparato sensor de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los transistores primero y segundo están dispuestos para formar parte de un primero y un segundo amplificadores operacionales respectivamente y las salidas de los amplificadores operacionales se pasan a un amplificador diferencial que proporciona la señal de salida eléctrica.

10



**FIG.1**



**FIG.2**

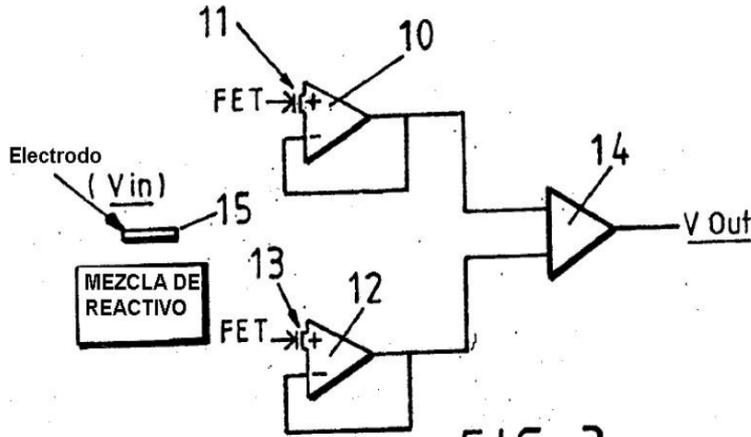


FIG.3

Molde de ADN

G C C T G C T G C

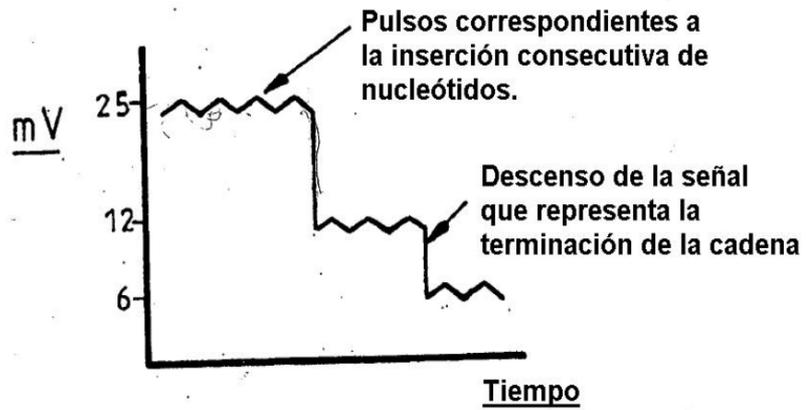


FIG.4