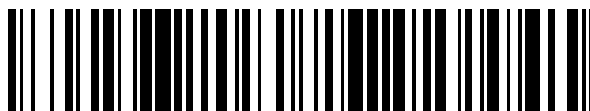


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 055**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010** **E 10784391 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2504449**

54 Título: **Métodos y aparatos para la reducción de errores en el ADN basada en un chip**

30 Prioridad:

25.11.2009 US 264643 P

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

14.06.2016

73 Titular/es:

GEN9, INC. (100.0%)
840 Memorial Drive
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

RAMU, SENTHIL;
JACOBSON, JOSEPH y
CHU, LARRY LI-YANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 574 055 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

Métodos y aparatos para la reducción de errores en el ADN basada en un chip

5 Campo de la invención

Los métodos y aparatos proporcionados en el presente documento se refieren a la síntesis y ensamblaje de ácidos nucleicos de alta fidelidad y a bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia predefinida utilizando reacciones en microvolumen. Más particularmente, se proporcionan métodos y aparatos para la síntesis de polinucleótidos, la reducción de errores, el ensamblaje jerárquico y/o la verificación de la secuencia sobre un soporte sólido. En algunas realizaciones se aplican tecnologías de dispensación de picolitros y subpicolitros y de movimiento de gotas para acceder y manipular los oligonucleótidos en micromatrices de ADN.

Antecedentes

Utilizando las técnicas de la química de ADN recombinante, ahora es habitual replicar y amplificar las secuencias de ADN de la naturaleza y después desmontarlas en sus partes componentes. Como partes componentes, a continuación las secuencias se recombinan o vuelven a montar en nuevas secuencias de ADN. Sin embargo, la dependencia de las secuencias disponibles de forma natural limita significativamente las posibilidades que pueden explorar los investigadores. A pesar de que ahora es posible sintetizar directamente secuencias cortas de ADN a partir de nucleósidos individuales, en general ha sido poco práctico construir directamente segmentos grandes o conjuntos de polinucleótidos, es decir, secuencias de polinucleótidos más largos que aproximadamente 400 pares de bases.

La síntesis de oligonucleótidos se puede realizar a través de síntesis personalizadas masivamente paralelas en microchips (Zhou et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32:5409; Fodor et al. (1991) Science 251:767). Sin embargo, los microchips actuales tienen áreas de superficie muy bajas y, por lo tanto, solo se pueden producir pequeñas cantidades de oligonucleótidos. Cuando se liberan a la solución, los oligonucleótidos están presentes en concentraciones picomolares o más bajas por secuencia, concentraciones que no son suficientemente altas como para dirigir las reacciones biomoleculares de cebado de manera eficiente. Los métodos actuales para ensamblar un pequeño número de ácidos nucleicos variantes no se pueden ampliar de una manera rentable para generar un número grande de variantes especificadas. Como tal, sigue existiendo la necesidad de métodos y dispositivos mejorados y para el ensamblaje de genes de alta fidelidad y similares.

Además, los oligonucleótidos en microchips se sintetizan generalmente por medio de reacciones químicas. Las reacciones químicas falsas causan errores aleatorios en las bases en los oligonucleótidos. Una de las limitaciones importantes en la síntesis química de ácidos nucleicos es la tasa de errores. La tasa de errores de los oligonucleótidos sintetizados químicamente (deleciones una velocidad de 1 en 100 bases y apareamientos erróneos e inserciones en aproximadamente 1 de cada 400 bases) supera la tasa de error que se puede obtener a través de medios enzimáticos de replicación de un ácido nucleico existente (por ejemplo, PCR). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de nuevas tecnologías para producir polinucleótidos de alta fidelidad.

Sumario

Los aspectos de la divulgación se refieren a métodos y aparatos para la preparación y/o el ensamblaje de polímeros de alta fidelidad. También se proporcionan en el presente documento dispositivos y métodos para el procesamiento de reacciones de ensamblaje de ácidos nucleicos y el ensamblaje de ácidos nucleicos. Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos prácticos y económicos de sintetizar polinucleótidos personalizados. Es un objetivo adicional proporcionar un método de producción de polinucleótidos sintéticos que tienen tasas de error más bajas que los polinucleótidos sintéticos producidos mediante métodos conocidos en la técnica.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona un método para la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad en un soporte sólido, que comprende las etapas de exponer una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos a un soporte que comprenden una secuencia predefinida a una enzima polimerasa en condiciones adecuadas para una reacción de síntesis dependiente de molde, para producir de este modo una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios, cada uno de los cuales comprende un oligonucleótido unido a un soporte y un oligonucleótido complementario sintetizado; la desnaturalización de la pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios tal que los oligonucleótidos sintetizados se liberan desde los oligonucleótidos unidos al soporte a una solución; la rehibridación de los oligonucleótidos sintetizados a los oligonucleótidos unidos al soporte, con lo que se producen oligonucleótidos bicatenarios rehibridados; y la exposición de los oligonucleótidos bicatenarios rehibridados a un componente de reconocimiento de apareamientos erróneos y de escisión en condiciones adecuadas para la escisión de oligonucleótidos bicatenarios rehibridados que contienen un apareamiento erróneo.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad en un soporte sólido. El método incluye la síntesis de una primera pluralidad de oligonucleótidos en una reacción de extensión de la cadena usando una segunda pluralidad de oligonucleótidos como moldes. La segunda pluralidad de

oligonucleótidos se inmoviliza sobre un soporte sólido y comprende un oligonucleótido que contiene error que tiene un error de secuencia en una posición que contiene errores. La reacción de extensión de cadena produce una primera pluralidad de dúplex. El método también incluye la fusión de la primera pluralidad de dúplex para liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de la segunda pluralidad de oligonucleótidos, en el que la primera pluralidad de oligonucleótidos comprende oligonucleótidos sin errores que están libres de error en la posición que contiene errores del oligonucleótido que contiene errores. El método incluye adicionalmente poner en contacto la primera pluralidad de oligonucleótidos con la segunda pluralidad de oligonucleótidos en condiciones de hibridación para formar una segunda pluralidad de dúplex. La segunda pluralidad de dúplex comprende un heterodúplex que contiene apareamientos erróneos formado entre el oligonucleótido que contiene errores y uno de los oligonucleótidos sin errores. El método también incluye la eliminación de al menos una parte del heterodúplex que contiene apareamientos erróneos mediante un componente que reconoce apareamientos erróneos y de escisión, produciendo de este modo los oligonucleótidos de alta fidelidad. En algunas realizaciones, el método incluye además después de la etapa de eliminación, la desaparición selectiva de los truncamientos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de ensamblaje de polímeros de ácidos nucleicos. El método incluye la producción de dos o más conjuntos de oligonucleótidos de alta fidelidad de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. El método también incluye la fusión de conjuntos deseables de oligonucleótidos de alta fidelidad en una solución, combinando los conjuntos deseables de oligonucleótidos de alta fidelidad en un volumen de reacción y sometiendo el volumen de reacción a condiciones adecuadas para una o más de hibridación, ligadura y/o extensión de la cadena.

En diversas realizaciones, la segunda pluralidad de oligonucleótidos se sintetiza químicamente sobre el soporte sólido y se inmoviliza dentro de una o más características en el soporte sólido. La segunda pluralidad de oligonucleótidos puede incluir oligonucleótidos que tienen sustancialmente la misma secuencia. La segunda pluralidad de oligonucleótidos puede depositarse en una característica sobre el soporte sólido, o en dos o más características sobre el soporte sólido. La segunda pluralidad de oligonucleótidos puede ser de dos o más secuencias diferentes y cada secuencia se encuentra en una característica diferente en el soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una micromatriz.

En algunas realizaciones, la primera pluralidad de oligonucleótidos se sintetiza enzimáticamente en el soporte sólido. Uno o más de la primera pluralidad de oligonucleótidos pueden difundirse en un fluido cuando se funden y no forman dúplex con la segunda pluralidad de oligonucleótidos.

Algunos aspectos de la invención se refieren a un método de producción de al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia predefinida sobre un soporte sólido, comprendiendo el método (a) sintetizar sobre un soporte sólido una primera pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios utilizando una segunda pluralidad de oligonucleótidos como moldes; (b) liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de la segunda pluralidad de oligonucleótidos dentro de un microvolumen aislado; (c) poner en contacto la segunda pluralidad de oligonucleótidos con la primera pluralidad de oligonucleótidos en condiciones de hibridación para formar una segunda pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios dentro del volumen aislado; (d) poner en contacto y escindir la segunda pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios con un agente de unión de apareamiento erróneo, en el que el agente de unión al apareamiento erróneo se une de forma selectiva y escinde los oligonucleótidos bicatenarios que comprenden un apareamiento erróneo; y (e) eliminar los oligonucleótidos bicatenarios que comprenden el apareamiento erróneo de modo que se producen oligonucleótidos libres de errores. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de oligonucleótidos se libera en condiciones de desnaturalización. En algunas realizaciones, el método comprende además la liberación de oligonucleótidos libres de errores en solución.

En algunas realizaciones, la segunda pluralidad de oligonucleótidos se une a una característica discreta del soporte sólido y la característica se hidrata selectivamente, proporcionando de ese modo la segunda pluralidad de oligonucleótidos dentro del volumen aislado. La característica se puede hidratar selectivamente aplicando una solución que comprende una polimerasa, dNTP, una solución de estimulación de la extensión del cebador, al menos un cebador en el que el cebador es complementario a un sitio de unión del cebador en la segunda pluralidad de oligonucleótidos.

En ciertas realizaciones, el componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos comprende una endonucleasa de apareamientos erróneos. En una realización, la endonucleasa de apareamientos erróneos es CEL1. En algunas realizaciones, componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos realiza la escisión química. Después de la escisión, ciertas realizaciones también pueden incluir la eliminación del heterodúplex escindido que tiene el apareamiento erróneo mediante intercambio de tampón.

Otras características y ventajas de los dispositivos y métodos proporcionados en el presente documento serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones. Las reivindicaciones que figuran a continuación se incorporan en esta sección del presente documento por referencia. Las diversas realizaciones descritas en la presente memoria pueden ser complementarias y se pueden combinar o usar juntas de un modo entendido por el experto en la técnica en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra un método de ejemplo de la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad en una micromatriz de ADN, en el que a la formación de heterodúplex le sigue la escisión del apareamiento erróneo.

La Fig. 2 muestra un experimento de escisión Surveyor de ejemplo heterodúplex después del barajado.

La Fig. 3 muestra un gráfico de ejemplo que muestra la intensidad en los puntos de la micromatriz (fuerza de la señal) después del tratamiento Surveyor™.

La Fig. 4 ilustra un método de ejemplo para la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad utilizando escisión Surveyor: El flujo de reacción molecular, el flujo de proceso, y el flujo de reactivo.

La Fig. 5 muestra métodos de ejemplo para producir microvolúmenes depositados adecuados para barajado.

La Fig. 6 ilustra métodos de ejemplo utilizando la difusión local para realizar el barajado sin microvolúmenes.

La Fig. 7 muestra métodos de ejemplo que utilizan barajado rápido por evaporación.

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la tecnología proporcionada en el presente documento son útiles para aumentar la exactitud, el rendimiento, el rendimiento y/o la productividad de las reacciones de síntesis y ensamblaje de ácidos nucleicos. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a formas poliméricas de nucleótidos naturales o sintéticas. Los oligonucleótidos y las moléculas de ácido nucleico pueden estar formadas de nucleótidos de origen natural, por ejemplo formando moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) de ácido ribonucleico (ARN). Como alternativa, los oligonucleótidos de origen natural pueden incluir modificaciones estructurales que alteren sus propiedades, tales como en ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o en ácidos nucleicos bloqueados (LNA). La síntesis en fase sólida de oligonucleótidos y moléculas de ácido nucleico con bases de origen natural o artificiales es bien conocida en la técnica. Debe entenderse que los términos incluyen equivalentes, análogos de ARN o ADN formados a partir de análogos de nucleótidos y, según sea aplicable a la realización descrita, polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Los nucleótidos útiles en la invención incluyen, por ejemplo, nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), o modificaciones naturales o sintéticas de nucleótidos, o bases artificiales. Como se usa en el presente documento, el término monómero se refiere a un miembro de un conjunto de pequeñas moléculas que son y pueden unirse a partir de un oligómero, un polímero o un compuesto formado por dos o más miembros. El orden particular de los monómeros dentro de un polímero se denomina en el presente documento la "secuencia" del polímero. El conjunto de monómeros incluye, pero no se limita al ejemplo, el conjunto de los L-aminoácidos comunes, el conjunto de D-aminoácidos, el conjunto de ácidos sintéticos y/o naturales, el conjunto de nucleótidos y el conjunto de pentosas y hexosas. Los aspectos de la invención se describen en el presente documento principalmente en relación a la preparación de oligonucleótidos, pero fácilmente se podrían aplicar a la preparación de otros polímeros tales como péptidos o polipéptidos, polisacáridos, fosfolípidos, heteropolímeros, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, sulfuros de poliarileno, polisiloxanos, poliimidas, poliacetatos, o cualquier otros polímero.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia predeterminada" o "predefinida" significa que la secuencia del polímero es conocida y elegida antes de la síntesis o ensamblaje del polímero. En particular, los aspectos de la invención se describen en el presente documento principalmente en relación con la preparación de moléculas de ácido nucleico, siendo la secuencia del oligonucleótido o polinucleótido conocida y elegida antes de la síntesis o el ensamblaje de las moléculas de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, los oligonucleótidos o polinucleótidos inmovilizados se utilizan como fuente de material. En diversas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento utilizan oligonucleótidos, determinándose sus secuencias basándose en la secuencia de las construcciones polinucleotídicas finales que se van a sintetizar. En una realización, los oligonucleótidos son moléculas de ácido nucleico cortas. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden tener de 10 a aproximadamente 300 nucleótidos, de 20 a aproximadamente 400 nucleótidos, de 30 a aproximadamente 500 nucleótidos, de 40 a aproximadamente 600 nucleótidos, o más de aproximadamente 600 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se pueden usar oligonucleótidos más cortos o más largos. Los oligonucleótidos pueden estar diseñados para tener una longitud diferente. En algunas realizaciones, la secuencia de la construcción polinucleotídica puede dividirse en una pluralidad de secuencias más cortas que se pueden sintetizar en paralelo y ensamblar en una sola o una pluralidad de construcciones polinucleotídicas deseadas usando los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, el procedimiento de ensamblaje puede incluir varias etapas de reacción en paralelo y/o secuenciales en las que una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos u oligonucleótidos se sintetizan o inmovilizan, se amplifican y se combinan con el fin de ensamblarse (por ejemplo, mediante extensión o ligadura como se describe en el presente documento) para generar un producto de ácido nucleico más largo para utilizar para el ensamblaje posterior, la clonación, u otras aplicaciones (véase la solicitud provisional de EE.UU. 61/235.677 y la solicitud de PCT PCT/US09/55267). Las estrategias de amplificación y de ensamblaje proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar para generar bibliotecas muy grande representativas de muchas secuencias de ácido nucleico de interés diferentes.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan métodos de bibliotecas de ensamblaje que contienen ácidos nucleicos que tienen variaciones de secuencias predeterminadas. Las estrategias de ensamblaje proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar para generar bibliotecas muy grande representativas de muchas secuencias de ácido nucleico de interés diferentes. En algunas realizaciones, las bibliotecas de ácido nucleico son bibliotecas de variantes de la secuencia. Las variantes de secuencia pueden ser variantes de una sola secuencia que codifica la proteína de origen natural. Sin embargo, en algunas realizaciones, las variantes de secuencia pueden ser variantes de una pluralidad de diferentes secuencias de codificación de la proteína.

En consecuencia, un aspecto de la tecnología proporcionada en el presente documento se refiere al diseño de estrategias de ensamblaje para la preparación de bibliotecas precisas de ácidos nucleicos de alta densidad. Otro aspecto de la tecnología proporcionada en el presente documento se refiere al ensamblaje de bibliotecas precisas de ácidos nucleicos de alta densidad. Los aspectos de la tecnología proporcionada en el presente documento también proporcionan bibliotecas precisas de ácidos nucleicos de alta densidad. Una biblioteca de ácidos nucleicos de alta densidad puede incluir más que 100 variantes de secuencia diferentes (por ejemplo, de aproximadamente 10^2 a 10^3 ; de aproximadamente 10^3 a 10^4 ; de aproximadamente 10^4 a 10^5 ; de aproximadamente 10^5 a 10^6 ; de aproximadamente 10^6 a 10^7 ; de aproximadamente 10^7 a 10^8 ; de aproximadamente 10^8 a 10^9 ; de aproximadamente 10^9 a 10^{10} ; de aproximadamente 10^{10} a 10^{11} ; de aproximadamente 10^{11} a 10^{12} ; de aproximadamente 10^{12} a 10^{13} ; de aproximadamente 10^{13} a 10^{14} ; de aproximadamente 10^{14} a 10^{15} ; o más secuencias diferentes) en la que un alto porcentaje de las diferentes secuencias son secuencias especificadas en lugar de secuencias aleatorias (por ejemplo, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 75 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 85 %, más de aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de las secuencias son secuencias de interés predeterminadas).

Los oligonucleótidos pueden utilizarse como bloques componentes para la síntesis de ADN y se pueden sintetizar en cadenas simples en un soporte sólido (por ejemplo, superficie del chip de micromatriz) usando chorro de tinta y otras tecnologías. En el proceso de ensamblaje de ácido nucleico, se pueden utilizar oligonucleótidos sintéticos para montar o amplificar el ADN en construcciones de ADN de tamaño grande. Durante la amplificación enzimática, el error en la secuencia se replica fielmente. Como resultado, la población de ADN sintetizado por este método contiene secuencias tanto libres de errores como propensas a errores. En algunas realizaciones, dado que los oligonucleótidos sintéticos pueden contener secuencias incorrectas debido a los errores introducidos durante la síntesis de oligonucleótidos, puede ser útil eliminar fragmentos de ácido nucleico que han incorporado uno o más oligonucleótidos que contienen errores durante el ensamblaje. En algunas realizaciones, uno o más fragmentos de ácido nucleico ensamblados pueden secuenciarse para determinar si contienen la secuencia predeterminada o no. Este procedimiento permite identificar fragmentos con la secuencia correcta. En otras realizaciones, pueden utilizarse otras técnicas para eliminar fragmentos de ácido nucleico que contienen errores. Tales fragmentos de ácido nucleico pueden ser oligonucleótidos sintetizados de forma emergente o polímeros de ácido nucleico ensamblados. Se debe apreciar que los ácidos nucleicos que contienen errores puede ser homodúplex de doble cadena que tienen el error en las dos cadenas (es decir, nucleótido(s) complementario(s) incorrectos), delección(es) o adición (es) en ambas cadenas), porque el procedimiento de ensamblaje puede implicar una o más rondas de extensión de la polimerasa (por ejemplo, durante el ensamblaje o después del ensamblaje para amplificar el producto ensamblado) durante el cual un ácido nucleico que contiene un error puede servir como molde, produciendo de este modo una cadena complementaria con el error complementario. En ciertas realizaciones, se puede sospechar que una preparación de fragmentos de ácido nucleico de doble cadena contiene una mezcla de ácidos nucleicos que tienen la secuencia correcta y ácidos nucleicos que incorporan uno o más errores de secuencia durante el ensamblaje. En algunas formas de realización, los errores de secuencia pueden eliminarse mediante una técnica que implica la desnaturalización y la rehibridación de los ácidos nucleicos de doble cadena. En algunas realizaciones, puede ser improbable que las cadenas simples de los ácidos nucleicos que contienen errores complementarios se rehibriden si los ácidos nucleicos que contienen cada error individual están presentes en la preparación de ácido nucleico a una frecuencia menor que los ácidos nucleicos que tienen la secuencia correcta en la misma posición. En su lugar, las cadenas simples que contienen errores pueden rehibridarse con una cadena complementaria que no contiene ningún error o que contiene uno o más errores diferentes (por ejemplo, errores en diferentes posiciones). Como resultado, las cadenas que contienen errores pueden terminar en forma de moléculas de heterodúplex en el producto de la reacción rehibridado. Las cadenas de ácido nucleico que carecen de errores pueden rehibridarse con cadenas que contiene errores o con otras cadenas libres de errores. Las cadenas libres de errores rehibridadas forman homodúplex en la muestra rehibridada. De acuerdo con lo anterior, mediante la eliminación de moléculas de heterodúplex de la preparación de fragmentos de ácido nucleico rehibridados, la cantidad o la frecuencia de los ácidos nucleicos que contienen errores se pueden reducir.

Por tanto, la formación de heterodúplex se lleva a cabo a través de un proceso que puede entenderse como barajado, por el cual las cadenas de ácidos nucleicos a partir de diferentes poblaciones pueden hibridarse entre sí de manera que se pueden formar dúplex perfectos que contienen apareamientos y apareamientos erróneos. El método adecuado para la eliminación de moléculas de heterodúplex incluye cromatografía, electroforesis, unión selectiva de moléculas de heterodúplex, etc. Un requisito para el agente de unión selectiva para su uso en este

proceso es que se une preferentemente a ADN de doble cadena que tiene un apareamiento erróneo de la secuencia entre las dos cadenas. En algunas realizaciones, dicho agente puede ser una endonucleasa de apareamiento erróneo. El término "endonucleasa" en general se refiere a una enzima que puede escindir el ADN internamente. El término "apareamiento erróneo" o "apareamiento erróneo de pares de bases" indica una combinación de pares de bases, que generalmente no se forma en los ácidos nucleicos de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. Por ejemplo, al tratar con las bases que se encuentran habitualmente en el ADN, es decir, adenina, guanina, citosina y timidina, los apareamientos erróneos de pares de bases son las combinaciones de bases distintas de los pares A-T y G-C que normalmente se encuentran en el ADN. Como se describe en el presente documento, se puede indicar que un apareamiento erróneo es, por ejemplo, C/C lo que significa que un residuo de citosina se encuentra enfrente de otra citosina, en lugar de la pareja de apareamiento adecuada, guanina. Tal como se usa en el presente documento, oligonucleótido "heterodúplex" se refiere a un oligonucleótido de cadena doble formado mediante hibridación de oligonucleótidos de cadenas simples en los que las cadenas, cuando se hibridan tienen regiones no apareadas, tales como apareamiento erróneo de pares de bases, bucle(s) de inserción/delección y/o hueco(s) de nucleótido(s). En un aspecto, la invención se refiere a un método para producir oligonucleótidos de alta fidelidad sobre dicho soporte sólido. El método incluye la síntesis de una primera pluralidad de oligonucleótidos en una reacción de extensión de la cadena usando una segunda pluralidad de oligonucleótidos como moldes. La segunda pluralidad de oligonucleótidos se inmoviliza sobre un soporte sólido y probablemente comprende oligonucleótidos libres de errores y que contienen errores que tienen un error de secuencia en una posición que contiene errores. La reacción de extensión de cadena produce una primera pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios o dúplex (homodúplex y/o heterodúplex). El método también incluye la desaparición o desnaturalización de la primera pluralidad de dúplex para liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de la segunda pluralidad de oligonucleótidos, en el que la primera pluralidad de oligonucleótidos comprende oligonucleótidos sin errores que están libres de error en la posición que contiene errores del oligonucleótido que contiene errores. El método incluye adicionalmente poner en contacto la primera pluralidad de oligonucleótidos con la segunda pluralidad de oligonucleótidos en condiciones de hibridación o apareamiento para formar una segunda pluralidad de dúplex. La segunda pluralidad de dúplex comprende un heterodúplex que contiene apareamientos erróneos formado entre el oligonucleótido que contiene errores y uno de los oligonucleótidos sin errores. El método también incluye la eliminación de al menos una parte del heterodúplex que contiene apareamientos erróneos mediante un componente que reconoce apareamientos erróneos y de escisión, produciendo de este modo los oligonucleótidos de alta fidelidad. En algunas realizaciones, el método incluye además después de la etapa de eliminación, la desaparición selectiva de los truncamientos.

La Figura 1 muestra un método de ejemplo de la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad en una micromatriz de ADN, en el que a la formación de heterodúplex le sigue la escisión del apareamiento erróneo. La micromatriz contiene oligonucleótidos sintetizados químicamente que se inmovilizan sobre la superficie del chip 10. Los oligonucleótidos sintetizados químicamente, como se ha mencionado anteriormente, probablemente contengan tanto la cadena molde sin errores 11 como la cadena molde propensa a errores 12. A modo de ejemplo, en una reacción de extensión de la cadena (por ejemplo, PCR) usando el cebador 13 (por ejemplo, un cebador de amplificación universal), los oligonucleótidos sintetizados químicamente pueden servir como cadenas molde para la producción de cadenas complementarias. Los productos resultantes pueden incluir la cadena complementaria sin errores 14 (complementaria de la cadena molde libre de errores 11) y la cadena complementaria amplificada propensa a errores 15 (complementaria a la cadena molde propensa a errores 12). En condiciones de fusión (por ejemplo, un aumento de la temperatura en el soporte sólido o la superficie del chip 10), las cadenas complementarias están separadas de las cadenas molde. Después del barajado, el heterodúplex 16 se puede formar entre una cadena molde propensa a errores y una cadena complementaria libre de errores. Después, el heterodúplex 16 puede ser reconocido y escindido por un componente 17 (por ejemplo, la endonucleasa Surveyor™). La eliminación posterior de los dúplex propensos a errores escindidos puede dar lugar a una superficie de un chip sin errores 18.

El reconocimiento y escisión del heterodúplex se puede lograr mediante la aplicación de un agente de unión a apareamiento erróneo a la mezcla de reacción. En algunas realizaciones, el agente de unión al apareamiento erróneo es una endonucleasa específica del apareamiento de errores. En alguna realización se puede usar una proteína de unión a apareamiento de errores unida o fusionada a una nucleasa.

Una endonucleasa de apareamiento de errores preferida es una endonucleasa CEL1 que tiene una alta especificidad por apareamientos erróneos por inserciones, delecciones y sustituciones de bases y puede detectar dos polimorfismos que están separados por cinco nucleótidos. CEL1 es una glicoproteína extracelular específica de plantas que puede escindir heterodúplex de ADN en todos los posibles apareamientos erróneos de nucleótidos únicos, en 3' de los apareamientos erróneos (Oleykowski CA et al, 1998, Nucleic Acids Res. 26: 4596-4602). CEL1 es útil en ensayos de detección de apareamientos erróneos que se basan en mellar y escindir el ADN dúplex en apareamientos erróneos por inserción/delección y sustitución de bases. En una realización de ejemplo se puede añadir una nucleasa Surveyor™ (Transgenomic Inc.) a un volumen de reacción que contiene los dúplex de oligonucleótidos. La nucleasa Surveyor™ es una endonucleasa específica de apareamientos erróneos que escinde todos los tipos de apareamientos erróneos, tales como polimorfismos de nucleótido único, pequeñas inserciones o delecciones. La adición de la endonucleasa tiene como resultado la escisión de los oligonucleótidos bicatenarios en el lugar o la región del apareamiento erróneo. La parte restante de los dúplex de oligonucleótidos se puede fundir después a una temperatura más baja y menos estricta (por ejemplo, fusión estricta) necesaria para distinguir un

único apareamiento erróneo de bases. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos libres de errores se liberan en solución.

Los dúplex que contienen apareamientos erróneos de la población se pueden escindir preferentemente mediante la endonucleasa CEL1 específica de apareamientos erróneos. En algunas realizaciones se pueden usar otras proteínas de unión a apareamientos erróneos que se unen selectivamente (por ejemplo, específicamente) a moléculas de ácido nucleico heterodúplex. Un ejemplo incluye el uso de MutS, un homólogo de MutS, o una combinación de los mismos que se unen a moléculas de heterodúplex. MutS de *Thermus aquaticus* se pueden adquirir comercialmente de Epicenter Corporation, Madison, Wis., n.º de catálogo SP72100 y SP72250. La secuencia del gen para la proteína también se conoce y se ha publicado en Biswas y Hsieh, Jour. Biol. Chem. 271:5040-5048 (1996) y está disponible en GenBank, número de acceso U33117. En *E. coli*, la proteína MutS, que parece funcionar como un homodímero, sirve como un factor de reconocimiento de apareamientos erróneos. En eucariotas, se han identificado al menos tres proteínas MutS homólogas (MSH); a saber, MSH2, MSH3, y MSH6, y forman heterodímeros. Por ejemplo, en la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, el complejo MSH2-MSH6 (también conocido como Mutsa) reconoce apareamientos erróneos de bases y bucles de un inserción/delección de un solo nucleótido, mientras que el complejo MSH2-MSH3 (también conocido como MutSβ) reconoce inserciones/delecciones de hasta 12-16 nucleótidos, aunque ejercen funciones sustancialmente redundantes. Una proteína de unión a apareamientos erróneos se puede obtener a partir de fuentes recombinantes o naturales. Una proteína de unión a apareamientos erróneos puede ser estable al calor. En algunas realizaciones, se puede usar una proteína de unión a apareamientos erróneos termoestable de un organismo termófilo. Ejemplos de proteínas de unión a apareamientos erróneos termoestables incluyen, sin limitaciones: Tth MutS (de *Thermus thermophilus*); Taq MutS (de *Thermus aquaticus*); Apy MutS (de *Aquifex pyrophilus*); Tma MutS (de *Thermotoga maritima*); cualquier otra MutS adecuada; o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En algunas realizaciones, se pueden diseñar y sintetizar moléculas pequeñas capaces de unirse a apareamientos erróneos de nucleótidos específicos. Por ejemplo, la naftiridina dimérica 1, un ligando sintético que se une a un apareamiento erróneo G-G. Un cóctel de tales ligandos que, en combinación, reconoce todos los posibles apareamientos erróneos podría reemplazar a CEL1. También pueden usarse otros agentes proteicos que pueden diferenciar entre los dúplex apareados y no apareados. Por ejemplo, la endonucleasa de T7 I escindirá específicamente una cadena de ADN en un apareamiento erróneo y sería posible utilizar esta enzima como un destructor catalítico de las secuencias apareadas erróneamente o para inactivar la función de escisión de esta enzima para su uso en este proceso como agente de unión al apareamiento erróneo. La endonucleasa VII de T4 se unirá específicamente y escindirá el ADN en apareamientos erróneos del dúplex y ya se ha diseñado una versión mutante de esta enzima que carece de la actividad nucleasa pero retiene la capacidad para unirse a moléculas de ADN dúplex mutantes (Golz y Kemper, Nucleic Acids Research, 27:e7 (1999)). La nucleasa SP es una nucleasa altamente activa de espinaca que incide todos los apareamientos erróneos excepto los que contienen un residuo de guanina, y esta enzima también podría diseñarse para eliminar la actividad de escisión o utilizar directamente. Dos o más de estos agentes de unión se pueden combinar para proporcionar más rigor a la filtración o para cubrir todos los tipos de errores de secuencia si un agente no se une a todos los apareamientos erróneos posibles.

Algunas realizaciones del dispositivo y métodos proporcionados en el presente documento utilizan oligonucleótidos que se inmovilizan sobre una superficie o sustrato. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "soporte" y "sustrato" se utilizan indistintamente y se refiere a un material insoluble en disolvente poroso o no poroso en el que se sintetizan o inmovilizan polímeros tales como ácidos nucleicos. Tal como se usa en el presente documento "poroso" significa que el material contiene poros que tienen diámetros sustancialmente uniformes (por ejemplo en el intervalo de nm). Los materiales porosos incluyen papel, filtros sintéticos etc. En este tipo de materiales porosos, la reacción puede tener lugar dentro de los poros. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como perno, tira, placa, disco, barra, curvas, estructura cilíndrica, partícula, incluyendo perlas, nanopartículas y similares. El soporte puede tener anchuras variables. El soporte puede ser hidrófilo o capaz de hacerse hidrófilo e incluye polvos inorgánicos tales como sílice, sulfato de magnesio, y alúmina; materiales poliméricos naturales, en particular materiales celulósicos y materiales derivados de celulosa, tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, etc.; polímeros de origen natural sintéticos o modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), dextrano reticulado, agarosa, poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), vidrio, vidrio de poro controlado, vidrio de poro controlado magnético, cerámica, metales, y similares etc.; usados por sí mismos o en combinación con otros materiales. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se sintetizan en un formato de matriz. Por ejemplo, los oligonucleótidos de cadena sencilla se sintetizan *in situ* sobre un soporte común, en el que cada oligonucleótido se sintetiza en una característica (o mancha) separada o discreta sobre el sustrato. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos de cadena sencilla se unen a la superficie del soporte o característica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "matriz" se refiere a una disposición de características discretas para almacenamiento, enrutamiento, amplificación y liberación de oligonucleótidos u oligonucleótidos complementarios para otras reacciones. En una realización preferida, el soporte o la matriz es direccionable: el soporte incluye dos o más características direccionables discretas en un lugar predeterminado concreto (es decir, una "dirección") sobre el soporte. Por lo tanto, cada molécula de oligonucleótido de la matriz se localiza en una ubicación conocida y definida en el soporte. La secuencia de cada oligonucleótido se puede determinar a partir de su

posición sobre el soporte. Además, los soportes o matrices direccionables permiten el control directo de los volúmenes de aislados individuales, tales como gotas. El tamaño de la característica definida se elige para permitir la formación de una gota de microvolumen en la característica, manteniéndose cada gota separadas unas de otras. Como se describe en el presente documento, las características están, normalmente, aunque no es necesario, separadas por espacios intercaracterísticas para asegurar que las gotas entre dos entidades adyacentes no se combinen. Las intercaracterísticas normalmente no llevarán ningún oligonucleótido en su superficie y corresponderán a espacio inerte. En algunas realizaciones, las características e intercaracterísticas pueden diferir en sus propiedades de hidrofiliidad o hidrofobicidad. En algunas realizaciones, las características e intercaracterísticas pueden comprender un modificador como se describe en el presente documento.

Las matrices se pueden construir, ordenar a medida o comprar a un proveedor comercial (por ejemplo, Agilent, Affymetrix, Nimblegen). Los oligonucleótidos se unen, fijan, inmovilizan, unen al soporte, soportan o sintetizan en las características discretas de la superficie o la matriz como se ha descrito anteriormente. Los oligonucleótidos pueden estar unidos covalentemente a la superficie o depositarse en la superficie. Varios métodos de construcción son bien conocidos en la materia, por ejemplo, sintetizadores de matriz sin máscara, métodos dirigidos por luz que usan máscaras, métodos de canales de flujo, métodos de manchado etc.

En algunas realizaciones, la construcción y/o selección de oligonucleótidos pueden sintetizarse sobre un soporte sólido usando sintetizador de matriz sin máscaras (MAS). Los sintetizadores de matriz sin máscara se describen, por ejemplo, en la solicitud de PCT n.º WO 99/42813 y en la correspondiente patente de Estados Unidos n.º 6.375.903. Otros ejemplos son instrumentos sin máscara conocidos que pueden fabricar una micromatriz de ADN a medida en la que cada una de las características de la matriz tiene una molécula de ADN monocatenaria de la secuencia deseada.

Otros métodos para la síntesis de los oligonucleótidos de construcción y/o de selección incluyen, por ejemplo, los métodos dirigidos por luz utilizando máscaras, métodos de canales de flujo, métodos de aplicación de manchas, métodos basados en pasadores, y métodos que utilizan múltiples soportes. Los métodos dirigidos por luz usando máscaras (por ejemplo, métodos VLSIPS™) para la síntesis de oligonucleótidos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.143.854, 5.510.270 y 5.527.681. Estos métodos implican la activación de regiones predefinidas de un soporte sólido y después poner en contacto el soporte con una solución monomérica preseleccionada. Las regiones seleccionadas pueden activarse por irradiación con una fuente de luz a través de una máscara, gran parte en la forma de técnicas de fotolitografía usadas en la fabricación de circuitos integrados. Otras regiones del soporte permanecen inactivas porque la iluminación es bloqueada por la máscara y permanecen protegidas químicamente. Por lo tanto, un patrón de luz define qué regiones del soporte reaccionen con un monómero dado. Al activar repetidas veces diferentes conjuntos de regiones predefinidas y poner en contacto diferentes soluciones monoméricas con el soporte, se produce un conjunto diverso de polímeros sobre el soporte. Opcionalmente se pueden usar otras etapas, tales como el lavado de la solución monomérica sin reaccionar del soporte. Otros métodos aplicables incluyen técnicas mecánicas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 5.384.261.

En la patente de Estados Unidos n.º 5.384.261 se describen métodos adicionales aplicables a la síntesis de oligonucleótidos de construcción y/o de selección sobre un único soporte. Por ejemplo, los reactivos pueden liberarse en el soporte mediante (1) flujo dentro de un canal definido en regiones predefinidas o (2) "manchado" en regiones predefinidas. También se pueden usar otros enfoques, así como combinaciones de las manchas y el flujo. En cada caso, ciertas regiones activadas del soporte se separan mecánicamente de otras regiones cuando las soluciones monoméricas se liberan en los diversos sitios de reacción. Los métodos de canales de flujo implican, por ejemplo, los sistemas de microfluidos para el control de la síntesis de oligonucleótidos en un soporte sólido. Por ejemplo, diversas secuencias poliméricas pueden sintetizarse en regiones seleccionadas de un soporte sólido mediante la formación de canales de flujo en una superficie del soporte a través del cual fluyen los reactivos apropiados o en el que se colocan reactivos apropiados. Los métodos de manchado para la preparación de oligonucleótidos sobre un soporte sólido implican la liberación de reactivos en cantidades relativamente pequeñas que se depositan directamente en regiones seleccionadas. En algunos pasos, toda la superficie del soporte se puede rociar, o de otra forma recubrir, con una solución, si es más eficiente hacerlo. Alícuotas medidas de forma precisa de las soluciones monoméricas pueden depositarse gota a gota mediante un dispensador que se mueve de una región a otra.

Los métodos basados en pasadores para la síntesis de oligonucleótidos sobre un soporte sólido se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,288,514. Los métodos basados en pasadores utilizan un soporte que tiene una pluralidad de pasadores u otras extensiones. Los pasadores se insertan cada uno simultáneamente en recipientes de reactivos individuales en una bandeja. Una matriz de 96 pasadores se utiliza habitualmente con una bandeja de 96 recipientes tal como una placa de microtitulación de 96 pocillos. Cada bandeja se llena con un reactivo particular, para el acoplamiento en una reacción química particular, en un pasador individual. En consecuencia, las bandejas a menudo contendrán diferentes reactivos. Dado que las reacciones químicas se han optimizado de tal manera que cada una de las reacciones puede realizarse bajo un conjunto relativamente similar de condiciones de reacción, se hace posible llevar a cabo múltiples etapas de acoplamiento químico al mismo tiempo.

En otra realización, se puede sintetizar una pluralidad de oligonucleótidos en varios soportes. Un ejemplo es un método de síntesis basado en esferas que se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.770.358; 5.639.603; y 5.541.061. Para la síntesis de moléculas, tales como oligonucleótidos sobre esferas, una gran pluralidad de perlas se suspende en un vehículo adecuado (tal como agua) en un recipiente. Las esferas se proporcionan con moléculas espaciadoras opcionales que tienen un sitio activo al que se une, opcionalmente, un grupo protector. En cada etapa de la síntesis, las esferas dividen para acoplarse en una pluralidad de recipientes. Después de que las cadenas de oligonucleótido nacientes se desprotegen, se añade una solución monomérica diferente a cada recipiente, de modo que en todas las esferas en un recipiente dado, se produce la misma reacción de adición de nucleótidos. Después, las esferas se lavan de los reactivos en exceso, se combinan en un único recipiente, se mezclan y redistribuyen en otra pluralidad de recipientes en preparación para la siguiente ronda de síntesis. Debe tenerse en cuenta que en virtud de la gran cantidad de esferas utilizadas desde el principio, habrá, de forma similar, un gran número de esferas dispersas al azar en el recipiente, teniendo cada una una única secuencia de oligonucleótidos sintetizada en una superficie de la misma después de numerosas rondas de adición aleatorizada de bases. Una esfera individual puede marcarse con una secuencia que es única para el oligonucleótido de doble cadena sobre la misma, para permitir la identificación durante el uso.

En otra realización más, una pluralidad de oligonucleótidos se puede unir o sintetizar en nanopartículas. Las nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, metales (por ejemplo, oro, plata, cobre y platino), semiconductores (por ejemplo, CdSe, CDs y CdS recubiertos con ZnS) y materiales coloidales magnéticos (por ejemplo, ferromagnetita). Los métodos para unir oligonucleótidos a las nanopartículas son conocidos en la materia. En otra realización, las nanopartículas se unen al sustrato. Las nanopartículas con o sin oligonucleótidos inmovilizados se pueden unir a los sustratos como se describe en, por ejemplo, Grabar et al., *Analyt. Chem.*, 67, 73-743 (1995); Bethell et al., *J. Electroanal. Chem.*, 409, 137 (1996); Bar et al., *Langmuir*, 12, 1172 (1996); Colvin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5221 (1992). Las nanopartículas desnudas se pueden unir primero al sustrato y los oligonucleótidos se pueden unir a las nanopartículas inmovilizadas.

Las secuencias de oligonucleótidos y/o polinucleótidos presintetizadas se pueden unir a un soporte o sintetizar in situ usando métodos dirigidos por luz, métodos de canales de flujo y de manchado, métodos de chorro de tinta, métodos basados en pasadores y métodos basados en esferas expuestos en las referencias siguientes: McGall et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:13555; *Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering*, Vol. 20:111, Plenum Press (1998); Duggan et al. (1999) *Nat. Genet.* S21:10; *Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics*, Cambridge University Press, 2003; las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º 2003/0068633 y 2002/0081582; las patentes de Estados Unidos n.º 6.833.450, 6.830.890, 6.824.866, 6.800.439, 6.375.903 y 5.700.637; y las publicaciones PCT N° WO 04/031399, WO 04/031351, WO 04/029586, WO 03/100012, WO 03/066212, WO 03/065038, WO 03/064699, WO 03/064027, WO 03/064026, WO 03/046223, WO 03/040410 y WO 02/24597. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos previamente sintetizados se unen a un soporte o se sintetizan utilizando una metodología de manchas en la que las soluciones monoméricas se depositan gota a gota mediante dispensador que se mueve de una región a otra (por ejemplo, chorro de tinta). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se aplican en manchas sobre un soporte utilizando, por ejemplo, un dispensador accionado por onda mecánica.

Los métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento implican volúmenes de reacción de amplificación y/o ensamblaje pequeños, tales como microvolúmenes, nanovolúmenes, picovolúmenes o subpicovolúmenes. Por consiguiente, los aspectos de la divulgación se refieren a métodos y dispositivos para la amplificación y/o ensamblaje de polinucleótidos en gotas de volumen pequeño en características separadas y direccionables de un soporte. Por ejemplo, una pluralidad de oligonucleótidos complementarios a los oligonucleótidos de cadena sencilla unidos a la superficie se sintetiza en un microvolumen de reacción predefinido de la solución mediante síntesis dependiente de molde. En algunas realizaciones, se pueden usar microvolúmenes de reacción predefinidos de entre aproximadamente 0,5 pl y aproximadamente 100 pl. Sin embargo, pueden utilizarse volúmenes más pequeños o más grandes. En algunas formas de realización, un dispensador accionado por onda mecánica se puede utilizar para la transferencia de volúmenes de menos de 100 nl, a menos de 10 nl, menos de 5 nl, menos de 100 pl, menos de 10 pl, o aproximadamente 0,5 pl o menos. En algunas realizaciones, el dispensador accionado por onda mecánica puede ser un dispositivo de chorro de tinta piezoeléctrico o un manipulador de líquidos acústico. En una realización preferida, se usa un dispositivo de chorro de tinta piezoeléctrico y puede liberar soluciones de picolitros de una manera muy precisa sobre un soporte tal como se describe en el presente documento.

Los aspectos de la divulgación se refieren a la manipulación de la submicrovolúmenes sobre un sustrato y al control del movimiento de los microvolúmenes sobre un sustrato. Es un fenómeno bien conocido que las superficies de la mayoría de los sustratos normalmente sólidos, cuando entran en contacto con una solución, tienen un grado característico de no humectabilidad. Es decir, las soluciones acuosas no se extienden sobre la superficie sólida sino que contactan para formar gotas. consecuencia, los soportes preferibles tienen propiedades de superficie, principalmente propiedades de tensión superficial y de humectabilidad, que permiten la formación de gotas cuando se dispensan volúmenes pequeños sobre la característica direccionable. En algunas realizaciones, el microvolumen está delimitado completamente o casi completamente por la superficie libre que forma una gota o microgota. Un experto en la técnica entenderá que la forma de la gota estará gobernada y mantenida por el ángulo de contacto de

la interacción líquido/sólido, la tensión superficial del líquido, así como por la energía de superficie. Las fuerzas adhesivas entre un líquido y un sólido harán que una gota de líquido se extienda por toda la superficie, mientras que las fuerzas de cohesión dentro del líquido harán que la gota caiga y evite contacto con la superficie. Para el líquido, la densidad de energía de la superficie es idéntica a la tensión superficial. La tensión superficial es la propiedad de la materia, debido a las fuerzas moleculares, que existe en la película superficial de todos los líquidos y tiende a llevar el volumen contenido en una forma que tiene el menor área superficial posible. En algunas realizaciones, la superficie se divide en regiones discretas, en las que los ángulos de contacto de la superficie de la región discreta difieren para el fluido de interés. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "ángulo de contacto" se refiere a una medida cuantitativa de la humectación de un sólido por un líquido. Un ángulo de contacto se define como el ángulo formado por un líquido en el límite trifásico en el que el vapor (gas, por ejemplo, atmósfera), líquido y sólido se cruzan. Por ejemplo, en el caso de una gota de microvolumen dispensada en una superficie plana horizontal, la forma de la gota de microvolumen será determinada por la ecuación de equilibrio de Young:

$$0 = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma \cos \theta_c$$

en la que γ_{SV} es la energía interfacial de sólido-vapor; γ_{SL} es la energía interfacial sólido-líquido y γ es la energía de líquido-vapor (es decir, la tensión superficial) y θ_c es el ángulo de contacto de equilibrio.

Se entenderá que para los valores θ_{do} del ángulo de contacto menores de 90 °, el líquido se extiende sobre la superficie sólida. Por ejemplo, las superficies muy hidrófilas tienen un ángulo de contacto de 0° a aproximadamente 30°. En el caso de soluciones acuosas y soporte altamente hidrófilo, el ángulo de contacto θ_c estará cerca de 0° y la solución acuosa o gota se extenderá completamente sobre la superficie sólida (es decir, humectación completa de la superficie). Si no se produce humectación completa, el líquido formará una gota. Por el contrario, para los valores del ángulo de contacto θ_c iguales o mayores que 90°, el líquido descansará sobre la superficie y formará una gota en la superficie sólida. La forma de la gota está determinada por el valor del ángulo de contacto. En el caso de soluciones acuosas y superficies altamente hidrófobas, el líquido formará esferas. En algunas realizaciones, el soporte se elige de modo que tenga una energía de superficie y un ángulo de contacto de la superficie que no permitan que las gotas se extiendan más allá del perímetro de la característica. Además, en una superficie ideal, las gotas volverán a sus formas originales si son perturbadas, por ejemplo después de la adición de una solución miscible o no miscible. En algunas realizaciones, la superficie se divide en regiones, en las que los ángulos de contacto de la superficie de la región discreta difieren para el líquido de interés. En algunas realizaciones, estas regiones corresponden a las características discretas del sustrato. En una realización preferida, la superficie se divide en regiones por modificadores. Los modificadores se pueden añadir a localizaciones específicas de la superficie de sustrato. En algunos casos, la superficie se dividirá en regiones que comprenden áreas de superficie modificadoras y no modificadoras. En algunas realizaciones, las regiones no modificadoras corresponden al sustrato sin modificar. Sin embargo, en otras realizaciones, las regiones no modificadoras corresponden a una superficie de cualquier modificación arbitraria o cualquier modificador que es diferente que el modificador en una región que corresponde a una característica de un soporte. En algunas realizaciones, los modificadores son oligómeros. Por ejemplo, los modificadores corresponden a los ácidos nucleicos y están modificando un conjunto de características discretas del sustrato. Los modificadores pueden tener forma circular, cuadrada, trapezoidal, o cualquier forma geométrica o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los modificadores están dispuestos en un patrón de rejilla o en otras configuraciones diferentes. El patrón no está limitado a ningún diseño. Por ejemplo, los modificadores pueden estar dispuestos en un patrón formado al azar. Los patrones pueden formarse mediante cualquier proceso conocido en la técnica. Por ejemplo, patrones organizados o patrones al azar se pueden formar por procesos tales como el autoensamblaje de superficie del copolímero de bloque. En otras formas de realización, la superficie del sustrato se divide en regiones por al menos dos regiones modificadoras diferentes modificadoras como se trata en el presente documento. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto de la superficie de los modificadores (θ_M) es diferente al ángulo de contacto de la superficie de la región no modificadora (θ_{NM}). Por ejemplo, el ángulo de contacto de la superficie de los modificadores puede ser mayor que el ángulo de contacto de la superficie de las regiones no modificadoras ($\theta_M > \theta_{NM}$). Como alternativa, el ángulo de contacto de la superficie de las regiones no modificadoras es mayor que el ángulo de contacto de la superficie de los modificadores ($\theta_M < \theta_{NM}$). En el contexto de las soluciones acuosas, las superficies modificadoras pueden ser más hidrófilas que la superficie de las regiones no modificadoras (es decir, el ángulo de contacto de la superficie de los modificadores es menor que el ángulo de contacto de la superficie de las regiones no modificadoras). Como alternativa, las superficies modificadoras pueden ser más hidrófobas que la superficie de las regiones de la superficie no modificadoras (es decir, el ángulo de contacto de la superficie de los modificadores es menor que el ángulo de contacto de la superficie de las regiones superficie no modificadoras). En un ejemplo de realización, los modificadores son oligonucleótidos y la superficie de las regiones modificadoras es más hidrófila que la superficie de las regiones no modificadoras. En otras realizaciones, la totalidad o una parte sustancial del soporte o superficie están cubiertas con al menos dos modificadores diferentes. Los al menos dos modificadores diferentes puede tener un patrón como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, los diferentes modificadores pueden cubrir la superficie en un patrón alternativo. Debe apreciarse que la superficie del soporte puede estar cubierta con una pluralidad de modificadores que están dispuestos en la superficie para formar un gradiente hidrófilo. En algunas realizaciones, cada modificador tiene un ángulo de contacto diferente que el modificador adyacente. En algunas realizaciones, la superficie se divide con una pluralidad de modificadores diferentes, siendo la pluralidad de los primeros modificadores más hidrófila que el al

menos un segundo modificador, teniendo la pluralidad de los primeras modificadoras cada uno un ángulo de contacto ligeramente diferente al del siguiente primer modificador. Por ejemplo, el ángulo de contacto de cada uno de la pluralidad del primera modificador puede diferir en al menos aproximadamente 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12°, 13°, 14°, 15°, 16°, 17°, 18°, 19°, 20°, 25°, 30° o más del siguiente primer modificador. La pluralidad de los primeros modificadores, por tanto, forma un gradiente hidrófilo y de un camino predeterminado a lo largo de la cual una gota se puede mover mediante la manipulación de la tensión superficial.

De acuerdo con algunos aspectos de la divulgación, la diferencia en los ángulos de contacto de la superficie entre dos modificadores diferentes o un modificador y la superficie del no modificador crea una "pared" virtual. Tal como se utiliza en el presente documento, el término ángulo de contacto más pequeño (SCA) se refiere a la superficie o el modificador que tiene el ángulo de contacto más pequeño y el término ángulo de contacto más grande (HCA) se refiere a la superficie o modificador que tiene un ángulo de contacto mayor. En el contexto de las soluciones acuosas, los SCA son más hidrófilos que los HCA. En algunas realizaciones, los valores de HCA son al menos 20°, al menos 30°, al menos 35° mayores que los SCA. En consecuencia, los volúmenes de líquidos se pueden formar y aislar en tales superficies. Por ejemplo, si el ángulo de contacto de la superficie modificadora es mayor que el ángulo de contacto de la superficie no modificadora, los volúmenes de líquido formarán una gota entre dos regiones modificadoras. Se apreciará que dependiendo del volumen de líquido depositado sobre la superficie y la diferencia de los valores de contacto entre modificadores, la gota puede ocupar una única región del ángulo de contacto pequeño (SCA) o múltiples regiones. Por ejemplo, el volumen de líquido puede ocupar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más regiones SCA. De acuerdo con ello, el líquido puede ocupar una huella correspondiente a uno o más SCA. Por tanto, la huella puede abarcar uno o más HCA. En algunas realizaciones, para asegurar que dos gotas o volúmenes aislados pequeños no se fusionan, los volúmenes de líquido se colocan suficientemente separados unos de otros. Por ejemplo, la separación entre dos volúmenes aislados puede comprender al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez o regiones de HC o regiones modificadoras. La colocación de los volúmenes de líquido suficientemente separados también permite mantener los volúmenes de líquidos aislados durante las fluctuaciones de temperatura, tales como durante el termociclado. Debido a que la tensión superficial disminuye generalmente con el aumento de la temperatura, las gotas pueden extenderse o desplazarse sobre la superficie cuando se eleva la temperatura del soporte o del volumen de líquido. Se apreciará que si los volúmenes de líquido se mantienen suficientemente separados, los volúmenes de líquidos permanecerán aislados y no se fusionarán con volúmenes de líquido adyacentes durante la fluctuación de la temperatura.

En un aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos y dispositivos para el procesamiento de forma independiente uno o más pluralidad de oligonucleótidos de una manera dependiente de la temperatura en las características direccionables en los volúmenes de líquido aislados. En algunas realizaciones, el método se lleva a cabo de una manera que proporcione un conjunto de oligonucleótidos de cadena simple predefinidos o secuencias de oligonucleótidos complementarios para reacciones o procesamiento especificados adicionales. Se debe apreciar que siendo cada característica independientemente direccionable, cada reacción se puede procesar de forma independiente dentro de un volumen de líquido aislado predefinido o una gota sobre una característica discreta (por ejemplo, cámara virtual). En algunas realizaciones, las matrices se almacenan en seco para las reacciones posteriores. En una realización preferida, los oligonucleótidos inmovilizados sobre soporte pueden hidratarse de forma independiente con una solución acuosa. Las soluciones acuosas incluyen, pero no se limitan a agua, tampón, cebadores, mezcla maestra, productos químicos de liberación, enzimas, o cualquier combinación de los mismos. La solución acuosa se puede aplicar en forma de mancha o inyectar sobre la o las ubicaciones de la superficie correspondiente(s) a la o las características discretas. Posteriormente, la solución o gel acuoso miscible así como no miscible pueden depositarse de la misma manera. Como alternativa se puede usar un dispensador accionado por onda mecánico para la transferencia de pequeños volúmenes de fluidos (por ejemplo, picolitros o subpicolitros). Un dispensador accionado por onda mecánica puede ser un dispositivo de chorro de tinta piezoeléctrico o un manipulador de líquidos acústico. Un dispositivo de chorro de tinta piezoeléctrico puede expulsar fluidos mediante el accionamiento de un mecanismo de accionamiento piezoeléctrico, que fuerza la expulsión de las gotas de fluido. Los piezoeléctricos en general tienen un buen ancho de banda de operación y pueden generar grandes fuerzas en un tamaño compacto. Algunos de los instrumentos de micromatriz de chorro de tinta piezoeléctricos comercialmente disponibles incluyen los de Perkin Elmer (Wellesley, MA), GeSim (Alemania) y MicroFab (Plano, TX). Los dispensadores piezoeléctricos típicos pueden crear gotas en el intervalo de picolitros y con un coeficiente de variación de 3-7 %. Las tecnologías y dispositivos de chorro de tinta para la expulsión de una pluralidad de gotas de líquido hacia características discretas en una superficie de sustrato para la deposición sobre la misma se han descrito en una serie de patentes, tales como las patentes de Estados Unidos n.º 6.511.849; 6.514.704; 6.042.211; 5.658.802.

En una realización, el depósito de fluido o solución se lleva a cabo usando un manipulador o eyector de líquidos acústico. Los dispositivos acústicos son dispositivos de dispensación sin contacto capaces de dispensar un volumen pequeño de fluido (por ejemplo, de picolitros a microlitros), véase por ejemplo Echo 550 de Labcyte (CA), HTS-01 de EDC Biosystems. Las tecnologías y dispositivos acústicos para expulsar acústicamente una pluralidad de gotas de fluido hacia sitios discretos sobre una superficie de sustrato para el depósito sobre el mismo se han descrito en una serie de patentes, tales como las patentes de Estados Unidos n.º 6.416.164; 6.596.239; 6.802.593; 6.932.097; 7.090.333 y la solicitud de patente de Estados Unidos 2002-0037579. El dispositivo acústico incluye un generador

de radiación acústica o transductor que se puede usar para expulsar gotas de fluido desde un depósito (por ejemplo, pocillos de microplacas) a través de un medio de acoplamiento. La presión de las ondas acústicas focalizadas en la superficie del fluido crea una corriente ascendente, haciendo así que el líquido para suba rápido para expulsar una gota, por ejemplo, de un pocillo de una placa fuente, a una placa receptora situada por encima del depósito de fluido.

5 El volumen de la gota eyectada puede determinarse mediante la selección de la frecuencia de la onda de sonido apropiada.

En algunas realizaciones, la placa fuente que comprende agua, tampones, cebadores, mezcla maestra, productos químicos de liberación, enzimas, o cualquier combinación de los mismos, y las placas de destino que comprende los oligonucleótidos o polinucleótidos se emparejan para permitir una correcta liberación o aplicación en mancha del reactivo en el sitio correcto. El dispensador accionado por onda mecánica puede acoplarse con un microscopio y/o una cámara para proporcionar la selección de posición de las manchas depositadas. Se puede colocar una cámara a ambos lados de la placa de destino o sustrato. Se puede usar una cámara para registrar la posición sobre la matriz, especialmente si el ácido nucleico está acoplado con un marcador fluorescente.

15 Debe apreciarse que cuando se manipulan volúmenes de líquido pequeños, tales como picolitros y nanolitros, cuanto más pequeña es la gota, más rápido se evaporará. Por lo tanto, los aspectos de la divulgación se refieren a métodos y dispositivos para limitar, retardar o evitar la evaporación del agua o el disolvente. En algunas realizaciones, las características discretas o un subconjunto de características discretas se pueden recubrir con una sustancia capaz de atrapar o capturar agua. En otras realizaciones, el material que atrapa el agua puede recubrirse por centrifugación sobre el soporte. Se pueden usar diferentes materiales o sustancias para atrapar el agua en lugares específicos. Por ejemplo, la sustancia de atrapamiento de agua puede ser una matriz acuosa, un gel, un coloide o cualquier polímero adecuado. En algunas realizaciones, el material se elige para que tenga un punto de fusión que permita que se mantenga sólido o semisólido (por ejemplo, gel) a las temperaturas de reacción, tales como la temperaturas de desnaturalización o las temperaturas o de termociclado. Los materiales de captura de agua incluyen, pero no se limitan a, sílice coloidal, gel peptídico, agarosa, solgel y polidimetilsiloxano. En una realización de ejemplo se pueden usar sílice coloidal Snowtex® (Nissan Chemical). La sílice coloidal Snowtex se compone de partículas de sílice amorfa con carga negativa monodispersadas en agua. La sílice coloidal Snowtex se puede aplicar como gel seco o como un gel hidratado sobre la superficie. En una realización preferida, la sustancia de atrapamiento de agua se aplica en forma de mancha en características discretas que comprenden oligonucleótidos unidos a la superficie. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden sintetizarse en las partículas o nanopartículas (por ejemplo, partículas coloidales, sílice coloidal, Snowtex) y las partículas o nanopartículas se puede dispensar en las características discretas de la superficie. En algunas realizaciones, la sustancia de atrapamiento de agua se aplica en forma de mancha en las características discretas del soporte utilizando un dispositivo mecánico, un dispositivo de chorro de tinta o un manipulador de líquidos acústico.

Se apreciará que la evaporación también se puede limitar mediante la formación de una barrera física entre la superficie de la gota y la atmósfera. Por ejemplo, una solución no miscible puede superponerse para proteger la gota de la evaporación. En algunas realizaciones, un pequeño volumen de la solución no miscible se dispensa directamente y de forma selectiva en la localización discreta del sustrato, tales como las características que comprenden una gota. En algunas otras realizaciones, la solución no miscible se dispensa sobre un subconjunto de características que comprenden una gota. En otras formas de realización, la solución no miscible se aplica uniformemente sobre la superficie de la matriz de formación de una bicapa no miscible, en la que están atrapadas las gotas. La bicapa no miscible puede evaporarse después para formar una película fina sobre la superficie o sobre una parte sustancial de la superficie de la gota. La solución no miscible incluye, pero no se limita a, aceite mineral, aceite vegetal, aceite de silicona, aceite de parafina, cera natural o sintética, un disolvente orgánico que es inmiscible en agua o cualquier combinación de los mismos. Un experto en la técnica apreciará que dependiendo de la composición de los aceites, algunos aceites pueden solidificarse parcial o completamente a o por debajo de la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la solución no miscible puede ser una cera natural o sintética, tal como hidrocarburo de parafina. La parafina es un hidrocarburo alcano con la fórmula general C_nH_{2n+2} , dependiendo de la longitud de la molécula, la parafina puede aparecer como un gas, un líquido o un sólido a temperatura ambiente. La cera de parafina se refiere a los sólidos con $20 \leq n \leq 40$ y tiene un punto de fusión típico entre aproximadamente 47 °C a 64 °C. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el soporte puede almacenarse tapado con una cera. Antes del uso, se puede aplicar calor al soporte para permitir que la cera se convierta en una cera de fase líquida recubriendo al soporte.

En algunos aspectos de la divulgación, en etapas posteriores, la solución acuosa se puede añadir a la gota que tiene una solución no miscible en su superficie. El disolvente o la solución acuosa se pueden añadir, por ejemplo, para iniciar una reacción, para ajustar un volumen, para ajustar un pH, para aumentar o disminuir una concentración de soluto, etc. Se apreciará que el disolvente o la solución acuosa pueden penetrar en la capa no miscible utilizando diferentes mecanismos. Por ejemplo, si se utiliza un dispositivo de cabeza de chorro de tinta, la solución acuosa se expulsa y el momento físico de la gota expulsada permitirá que la solución acuosa cruce la capa no miscible. Otros mecanismos pueden emplear fuerzas adicionales, tales como, por ejemplo, fuerzas magnéticas y/o electrostáticas y/o fuerzas ópticas. Las fuerzas ópticas y magnéticas se pueden crear de manera simultánea o independientemente una de otra. Además, el mecanismo puede utilizar pinzas magneto-ópticas acopladas. En algunas realizaciones, la solución acuosa que se va a dispensar contiene nanopartículas magnéticas y una fuerza magnética se puede utilizar

para ayudar a la penetración de la capa no miscible. Como alternativa, la solución acuosa lleva una carga electrostática y se puede usar un campo eléctrico aplicado externo para lograr la penetración de la capa no miscible.

Sin embargo, en otro aspecto de la divulgación, el tamaño de la gota se vigila de forma continua o frecuente. Se apreciará que el tamaño de la gota está determinado por el volumen y por la tensión superficial de la solución. De acuerdo con ello, la pérdida de volumen se puede detectar por una disminución de la huella de la gota o el radio de la huella de las gotas. Por ejemplo, usando un sistema de seguimiento óptico, a través de un sistema de cámara y lentes de microscopio, el tamaño o la huella de la gota se pueden determinar y el volumen de la gota se puede calcular. En algunas realizaciones, el volumen de la gota o el radio de la gota se controlan cada segundo o cada milisegundo. Se apreciará que la magnitud de la velocidad de evaporación del agua desde la gota de interés depende en parte de la temperatura y, por lo tanto, aumenta con temperaturas crecientes. Por ejemplo, durante la amplificación mediante termociclado o durante la desnaturalización de los complejos de doble cadena, el aumento de la temperatura dará lugar a la rápida evaporación de la gota. Por lo tanto, el volumen de la gota se puede controlar con más frecuencia y el ajuste del volumen de la gota mediante rehidratación será más frecuente. En el caso de la fluctuación de volumen, tal como la pérdida de volumen, se pueden dispensar subpico o nanovolumenes de agua o de disolvente sobre la gota o la característica discreta que comprende la gota. De este modo se pueden dispensar volúmenes de agua o de disolvente de aproximadamente 0,5 pl, 1 pl, 10pl, de aproximadamente 100 pl, de aproximadamente 1 nl, de aproximadamente 10 nl, de aproximadamente 100 nl. Los volúmenes de agua o de disolvente se pueden liberar por cualquier medio de liberación convencional, siempre que los volúmenes sean controlados y precisos. En una realización preferida, el agua o el disolvente se dispensan utilizando un dispositivo de chorro de tinta. Por ejemplo, una impresora típica de chorro de tinta es capaz de producir gotas de de 1,5 a 10 pl, mientras que otras técnicas de dispensación ultrasónicas comerciales pueden producir gotas de 0,6 pl. En algunas realizaciones se añade agua en una serie rápida de gotas. En algunas realizaciones, el agua se dispensa cuando se registra una pérdida de volumen de más de 10 %, de más de 25 %, de más de 35 %, de más de 50 %.

En otra realización, la velocidad de evaporación se limita mediante el aumento de la tasa de vapor o la humedad que rodea la gota. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante la colocación de gotas "de sacrificio" alrededor o en las proximidades de la gota de interés (por ejemplo, la gota que comprende los oligonucleótidos) (véase, por ejemplo, Berthier E. et al., Lab Chip, 2008, 8(6):852–859). En algunas realizaciones, la superficie o el soporte sólido están encerrados en un recipiente cerrado para limitar la evaporación.

Sin embargo, en otra realización, la velocidad de evaporación puede limitarse mediante la adición de un compuesto que tiene un componente de alto punto de ebullición a la o las gotas de interés, siempre que la presencia del compuesto no inhiba las reacciones enzimáticas realizadas sobre el sustrato. El punto de ebullición de un líquido es la temperatura a la que las fases líquida y de vapor están en equilibrio entre sí a una presión especificada. Cuando se aplica calor a una solución, la temperatura de la solución se eleva hasta que la presión de vapor del líquido es igual a la presión de los gases circundantes. En este punto, se produce vaporización o evaporación en la superficie de la solución. Mediante la adición de un líquido de alto punto de ebullición a la gota de interés, la evaporación del contenido de agua de una gota se puede reducir sustancialmente (véase la patente de Estados Unidos 6.177.558). En alguna realización, la solución de alto punto de ebullición es un disolvente. En algunas realizaciones, el líquido de alto punto de ebullición tiene un punto de ebullición de al menos 100 °C al menos 150 °C, al menos 200 °C. En algunas realizaciones, se añade glicerol a la solución, lo que aumenta el punto de ebullición. En consecuencia, la solución que contiene el líquido de alto punto de ebullición se evapora a una velocidad mucho más lenta a temperatura ambiente o en condiciones de reacción, tales como en condiciones de termociclado, extensión, ligadura y desnaturalización.

Los aspectos de la divulgación proporcionan métodos para la amplificación de uno o más oligonucleótidos de cadena simple sobre el soporte. Los oligonucleótidos se pueden amplificar antes o después de haberse desprendido del soporte y/o de eluir en una gota. Preferiblemente, los oligonucleótidos se amplifican en el soporte sólido. Un experto en la técnica apreciará que los oligonucleótidos que se sintetizan sobre un soporte sólido comprenderán un extremo 3' fosforilado o un nucleósido en el extremo 3' adicional (por ejemplo, T). Los oligonucleótidos fosforilados en 3' no son adecuados para el ensamblaje de polinucleótidos, ya que los oligonucleótidos no pueden ser extendidos por la polimerasa. En aspectos preferidos de la divulgación, los oligonucleótidos se amplifican primero y los productos amplificados se ensamblan en un polinucleótido. Por consiguiente, un aspectos de la divulgación proporciona métodos en los que un conjunto o subconjunto de oligonucleótidos, que se unen a un conjunto de subconjunto de características del soporte, se amplifican mediante la liberación local de submicrovolúmenes a características discretas direccionables. El término "amplificación" significa que el número de copias de un fragmento de ácido nucleico aumenta. Como se ha indicado anteriormente, los oligonucleótidos pueden sintetizarse primero en características discretas de la superficie, se pueden depositar sobre el sustrato o se pueden depositar sobre el sustrato unido a las nanopartículas. En una realización preferida, los oligonucleótidos se unen covalentemente a la superficie o a las nanopartículas depositadas en la superficie. En una realización de ejemplo, las ubicaciones o características que comprenden los oligonucleótidos a amplificar se seleccionan primero. En una realización preferida, las características seleccionadas están en estrecha proximidad entre sí sobre el soporte. La solución acuosa o disolvente se deposita después sobre la característica seleccionada, formando de esta manera una gota que comprende oligonucleótidos hidratados. Se apreciará que cada gota está separada de la otra por la tensión superficial. En alguna realización la solución puede ser agua, tampón o una solución que estimula las reacciones

enzimáticas. En una realización ejemplar, la solución incluye, pero no se limita a, una solución que estimula la extensión del cebador. Por ejemplo, la solución puede estar compuesta por cebador(es) oligonucleótidos, nucleótidos (dNTP), tampón, polimerasa y cofactores. En otras formas de realización, la solución es una solución de desnaturalización alcalina. Sin embargo, en otras realizaciones, la solución puede comprender oligonucleótidos tales como oligonucleótidos complementarios.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos o polinucleótidos se amplifican dentro de la gota mediante PCR en fase sólida, eluyendo de ese modo las secuencias amplificadas en la gota. En otras realizaciones, los oligonucleótidos o polinucleótidos se separan primero del soporte sólido y después se amplifican. Por ejemplo, los oligonucleótidos unidos covalentemente se traducen en moléculas de ADN soportados en la superficie a través de un proceso de escisión gaseosa con gas de amina. Los oligonucleótidos pueden escindirse con amoníaco, u otras aminas, en la fase de gas mediante el cual el gas reactivo entra en contacto con el oligonucleótido mientras unido a, o en la proximidad de, el soporte sólido (véase Boal et al, NAR, 1996 (24 (15): 3115-7), las patentes de Estados Unidos n.º 5.514.789; 5.738.829 y 6.664.388)). En este proceso, el enlace covalente que une los oligonucleótidos al soporte sólido se escinde mediante la exposición del soporte sólido para el gas de amina a presión y/o temperatura elevadas. En algunas formas de realización, este proceso se puede utilizar para "adelgazar" la densidad de los oligonucleótidos en características específicas. Un experto en la técnica apreciará que las micromatrices de ADN puede tener una densidad muy alta de los oligonucleótidos en la superficie (aproximadamente 10^8 moléculas por característica), que pueden generar impedimento estérico para las polimerasas necesarias para la PCR. Teóricamente, los oligonucleótidos están generalmente separados por aproximadamente de 2 nm a aproximadamente 6 nm. Para las polimerasas, una enzima típica de 6 subunidades puede tener un diámetro de aproximadamente 12 nm. Por lo tanto puede ser necesario tratar a medida el soporte para abordar la cuestión de la densidad de superficie, de forma que la separación de los oligonucleótidos unidos a la superficie pueda acomodar la dimensión física de la enzima. Por ejemplo, un subconjunto de los oligonucleótidos puede escindirse químicamente o enzimáticamente o eliminarse físicamente de la micromatriz. También se pueden utilizar Otros métodos para modificar los oligonucleótidos de manera que cuando los cebadores se aplican y se hibridan CON los oligonucleótidos, AL menos algunos grupos hidroxilo EN 3' de los cebadores (inicio de la síntesis de ADN) son accesibles para la polimerasa. El número de grupos hidroxilo en 3' accesibles por mancha puede ser estocástico o fijo. Por ejemplo, los cebadores, una vez hibridados, se pueden tratar para eliminar algunos grupos hidroxilo en 3' activos, dejando un número estocástico de grupos hidroxilo en 3' activos que pueden ser objeto de reacciones de extensión de cadena. En otro ejemplo, se puede usar una molécula enlazadora de gran tamaño (por ejemplo, un concatémoro) de tal manera que uno y solo un inicio de la síntesis está disponible por mancha o en un subconjunto de los oligonucleótidos por mancha.

El término "cebador" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, ya sea ARN o ADN, de cadena sencilla o de cadena doble, ya sea derivado de un sistema biológico, generado por digestión con enzimas de restricción, o producido sintéticamente que, cuando se coloca en el medio ambiente adecuado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Cuando se presenta con un molde de ácido nucleico adecuado, los precursores de nucleósidos trifosfato adecuados de ácidos nucleicos, una enzima polimerasa, cofactores y condiciones adecuadas, tales como una temperatura y un pH adecuados, el cebador pueden extenderse en su extremo 3' por la adición de nucleótidos mediante la acción de una polimerasa o actividad similar para producir un producto de extensión del cebador. El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones concretas y los requisitos de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, el cebador oligonucleotídico tiene normalmente 15-25 o más nucleótidos de longitud. El cebador debe ser de complementariedad suficiente con el molde deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, ser capaz de hibridar con la cadena molde deseada de forma suficiente para proporcionar el resto hidroxilo en 3' del cebador en yuxtaposición adecuada para su uso en la iniciación de la síntesis por una polimerasa o una enzima similar. No es necesario que la secuencia del cebador represente un complemento exacto del molde deseado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede estar unida al extremo 5' de un cebador de otra manera complementario. Como alternativa, las bases no complementarias pueden estar intercaladas dentro de la secuencia del cebador de oligonucleótido, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo molde-cebador para la síntesis del producto de extensión.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos hidratados se pueden amplificar dentro de la gota, la gota que actúa como una cámara de reacción virtual. En algunas realizaciones, todo el soporte o matriz que contiene las características discretas se somete a amplificación. En otras realizaciones, una o más características discretas seleccionadas se someten a la amplificación.

La amplificación de características independientes seleccionadas (estando separadas entre sí) se puede realizar calentando localmente al menos una característica discreta. Las características discretas pueden calentarse localmente por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, las características discretas se pueden calentar localmente utilizando una fuente láser de energía que puede controlarse en una dimensión x-y precisa, de modo que modula individualmente la temperatura de una gota. En otro ejemplo, la combinación de un láser de haz más amplio con una máscara puede usarse para irradiar características específicas. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para controlar la temperatura en el soporte de modo que las reacciones enzimáticas pueden tener lugar en

un soporte (PCR, ligadura o cualquier otra reacción sensible a la temperatura). En algunas realizaciones se usa un láser de barrido para controlar el termociclado en características distintas en el soporte sólido. La longitud de onda utilizada puede elegirse de un espectro amplio (de 100 nm a 100.000 nm, es decir, desde el ultravioleta al infrarrojo). En algunas realizaciones, la función sobre la que se aplica la mancha de la gota comprende un absorbente o indicador óptico. En alguna otra realización, el material absorbente óptico se puede añadir a la superficie de la gota. En algunas realizaciones, el soporte sólido se enfría mediante circulación de aire o líquido. La energía que se depositará se puede calcular basándose en el comportamiento de la absorbancia. En algunas realizaciones, la temperatura de la gota puede modelarse utilizando termodinámica. La temperatura se puede medir mediante un material de tipo LCD o cualquier otra tecnología *in situ*. En otra realización más, todo el soporte puede calentarse y enfriarse para permitir que se produzcan las reacciones enzimáticas. Un método para controlar la temperatura de las gotas de la superficie es mediante el uso de una configuración de depósito de energía óptica de barrido. Una fuente de energía puede dirigirse mediante una configuración de barrido para depositar energía en varios lugares en la superficie del soporte sólido que comprende moléculas unidas o fijadas. El material absorbente óptico se puede añadir en la superficie del soporte sólido o en la superficie de la gota. Puede usarse una fuente de energía óptica, tal como una lámpara de alta intensidad, láser, u otra fuente de energía electromagnética (incluyendo microondas). La temperatura de los diferentes sitios de reacción puede controlarse de forma independiente mediante el control de la energía depositada en cada una de las características.

Por ejemplo, se puede usar un dispositivo digital de microespejos (DMD) para el control de la temperatura. El DMD es un semiconductor óptico. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.498.176. En algunas realizaciones, se puede usar un DMD para calentar precisamente características o gotas seleccionadas en el soporte sólido. El DMD puede ser un chip que tiene en su superficie varios cientos de miles de espejos microscópicos dispuestos en una matriz rectangular que corresponden a las características o gotas que se van a calentar. Los espejos se pueden girar de forma individual (por ejemplo, ± 10 - 12°), a un estado activado o desactivado. En el estado activado, la luz de una fuente de luz (por ejemplo, una bombilla) se refleja sobre el soporte sólido para calentar las manchas o gotas seleccionadas. En el estado desactivado, la luz está dirigida en otro lugar (por ejemplo, sobre un disipador de calor). En un ejemplo, la DMD puede consistir en una matriz de 1024×768 de microespejos de 16 μm de ancho. Estos espejos pueden abordarse individualmente y se pueden utilizar para crear cualquier patrón o disposición dada en el calentamiento de diferentes características en el soporte sólido. Las características también se pueden calentar a diferentes temperaturas, por ejemplo, proporcionando una longitud de onda diferente para manchas individuales, y/o controlando el tiempo de irradiación.

Se apreciará que la amplificación se produce únicamente en las características que comprenden oligonucleótidos molde hidratados (es decir, amplificación local en las características que comprenden una gota). Un conjunto diferente de características se puede amplificar de forma paralela o secuencial con rondas paralelas o secuenciales de hidratación (es decir, dispensación de una gota en una característica específica), amplificando oligonucleótidos y secando el conjunto de características. En algunas realizaciones, el soporte se seca mediante evaporación del líquido al vacío mientras se calienta. Por lo tanto, después de cada ronda de amplificación, el soporte comprenderá un conjunto de gotas que contienen oligonucleótidos dúplex. Los oligonucleótidos complementarios pueden liberarse en solución dentro de la gota y recogerse. Como alternativa, los oligonucleótidos complementarios se pueden secar sobre las características discretas para el almacenamiento o procesamiento adicional. Sin embargo, los oligonucleótidos complementarios se pueden someter a otras reacciones tales como filtración de errores o ensamblaje. En algunas realizaciones, un conjunto o subconjunto diferente de características puede hidratarse y un conjunto o subconjunto diferente de oligonucleótidos molde puede amplificarse tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede dispensar una gota (por ejemplo, mediante chorro de tinta) sobre un soporte. La gota puede contener diversos reactivos, tales como enzimas, tampones, dNTP, cebadores, etc. La gota cubre una característica discreta (una característica corresponde a una secuencia predefinida) sobre el soporte. PCR puede llevarse a cabo para sintetizar oligonucleótidos complementarios a los oligonucleótidos molde que se unen a la característica. En el caso de la amplificación enzimática, la solución incluye, pero no se limita a, cebadores, nucleótidos, tampones, cofactores y enzimas. Por ejemplo, una reacción de amplificación incluye ADN polimerasa, nucleótidos (por ejemplo, dATP, dCTP, dTTP, dGTP), cebadores y tampón.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden comprender sitios de unión para el cebador universales (comunes a todos los oligonucleótidos), semiuniversales (comunes a al menos una parte de los oligonucleótidos) o individuales o únicos (específicos para cada oligonucleótido) en cualquiera de los extremos 5' o 3' o en ambos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término sitio de unión al cebador o cebador "universal" significa que una secuencia usada para amplificar el oligonucleótido es común a todos los oligonucleótidos de forma que dichos oligonucleótidos se pueden amplificar utilizando un único conjunto de cebadores universales. En otras circunstancias, un oligonucleótido contiene un sitio de unión al cebador único. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sitio de unión al cebador único" se refiere a un conjunto de secuencias de reconocimiento de cebadores que amplifica selectivamente un subconjunto de oligonucleótidos. En otras circunstancias, un oligonucleótido contiene secuencias de amplificación tanto universales como únicas, que opcionalmente se pueden utilizar de forma secuencial.

En algunas realizaciones, el sitio de unión al cebador/cebadores puede estar diseñado para ser temporal. Por ejemplo, los cebadores temporales pueden eliminarse mediante escisión química, basada en luz o enzimática. Por

ejemplo, sitios de unión al cebadores/cebadores pueden diseñarse para incluir un sitio de escisión de endonucleasa de restricción. En una realización de ejemplo, un sitio de unión al cebador/cebador contiene un sitio de unión y/o de escisión de un tipo de endonucleasa de restricción. En tal caso, las secuencias de amplificación pueden diseñarse de manera que una vez que un conjunto deseado de oligonucleótidos se amplifica hasta una cantidad suficiente, se puede escindir mediante el uso de una enzima de restricción de tipo IIs adecuada que reconoce una secuencia de enzima de restricción de tipo IIs interna del oligonucleótido. En algunas realizaciones, después de la amplificación, el conjunto de los ácidos nucleicos puede ponerse en contacto con una o más endonucleasas para producir roturas de la doble cadena, lo que elimina los sitios de unión al cebador/cebadores. En ciertas realizaciones, la cebadores directos e inversos pueden eliminarse mediante las mismas endonucleasas de restricción o diferentes. Se puede usar cualquier tipo de endonucleasa de restricción para eliminar los sitios de unión al cebador/cebadores de secuencias de ácido nucleico. Una amplia variedad de endonucleasas de restricción que tienen sitios de unión y/o escisión específicos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de New England Biolabs (Beverly, Mass.). En diversas realizaciones se pueden usar endonucleasas de restricción que producen salientes en 3', salientes en 5' o extremos romos. Cuando se utiliza una endonucleasa de restricción que produce un saliente, se puede usar una exonucleasa (por ejemplo, RecJ_r, Exonucleasa I, Exonucleasa T, S₁ nucleasa, P₁ nucleasa, nucleasa de judía mungo, ADN polimerasa de T4, nucleasa de CEL I, etc.) para producir extremos romos. Como alternativa, los extremos cohesivos formados por la endonucleasa de restricción específica se pueden usar para facilitar el ensamblaje de los subconjuntos en una disposición deseada. En una realización de ejemplo, un sitio de unión al cebador/cebador que contiene un sitio de unión y/o de escisión de un tipo de endonucleasa de restricción se puede usar para eliminar el cebador temporal. El término "endonucleasa de restricción de tipo IIs" se refiere a una endonucleasa de restricción que tiene una secuencia de reconocimiento no palindrómica y un sitio de escisión que se produce fuera del sitio de reconocimiento (por ejemplo, de 0 a aproximadamente 20 nucleótidos distales al sitio de reconocimiento). Las endonucleasas de restricción de tipo IIs pueden crear una muesca en una molécula de ácido nucleico de cadena doble o pueden crear una rotura de doble cadena que produce extremos romos o cohesivos (por ejemplo, salientes en 5' o 3'). Los ejemplos de endonucleasas de tipo IIs incluyen, por ejemplo, enzimas que producen un saliente en 3', tales como, por ejemplo, Bsr I, Bsm I, BstF5 I, BsrD I, Bts I, Mnl I, BclI, Hph I, Mbo II, Eci I, Acu I, Bpm I, Mme I, BsaX I, Bcg I, Bae I, Bfi I, TspDT I, TspGW I, Taq II, Eco57 I, Eco57M I, Gsu I, Ppi I, y Psr I; enzimas que producen un saliente en 5' tal como, por ejemplo, BsmA I, Ple I, Fau I, Sap I, BspM I, SfaN I, Hga I, Bvb I, Fok I, BceA I, BsmF I, Ksp632 I, Eco31 I, Esp3 I, Aar I; y enzimas que producen un extremo romo, tal como, por ejemplo, endonucleasas de tipo IIs Mly I y Btr I, están disponibles comercialmente y son bien conocidos en la técnica (New England Biolabs, Beverly, Mass.).

En algunas realizaciones, el cebador es un cebador que contiene uracilo múltiple (U). El cebador se hibrida primero con un oligonucleótido monocatenario unido al soporte y se extiende con la adición de dNTP y una polimerasa apropiada y en condiciones y temperatura apropiadas. En una etapa posterior, se retira el cebador. En algunas realizaciones, se puede usar la uracilo ADN glicosilasa (UDG) para hidrolizar un enlace uracil-glicosídico en un ácido nucleico, eliminando de este modo el uracilo y creando un sitio básico sensible a álcali en el ADN que pueden hidrolizarse después mediante tratamiento con endonucleasa, calor o álcali. Como resultado, puede eliminarse una porción de una cadena de un ácido nucleico bicatenario, exponiendo de este modo la secuencia complementaria en la forma de un saliente monocatenario. Este enfoque requiere la incorporación deliberada de una o más bases de uracilo en una cadena de un fragmento de ácido nucleico de doble cadena. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la amplificación de un fragmento de ácido nucleico usando un cebador de amplificación que contiene uracilo terminal en 3'. Después del tratamiento con UDG, la región del cebador 5' del uracilo puede liberarse (por ejemplo, después de la dilución incubación, exposición a condiciones desnaturalizantes suaves, etc.), exponiendo de este modo la secuencia complementaria como un saliente monocatenario. Se debe apreciar que la longitud del saliente puede venir determinada por la posición del uracilo en el cebador de amplificación y por la longitud del cebador de amplificación. En algunas realizaciones, se usa la mezcla de uracilo ADNA glicosilasa (UDG) y endonucleasa de ADN glicosilasa-liaza VIII, tales como USERTM (reactivo de escisión específico de uracilo). La UDG cataliza la escisión de una base uracilo, formando un sitio abásico, dejando intacto el esqueleto de fosfodiéster. La actividad liaza de la endonucleasa VIII rompe el esqueleto de fosfodiéster en los extremos 3' y 5' lados del sitio abásico de modo que se libera la desoxirribosa libre de base.

Después de la amplificación, la polimerasa puede desactivarse para evitar la interferencia con las etapas siguientes. Una etapa de calentamiento (por ejemplo, de temperatura alta) puede desnaturalizar y desactivar la mayoría de las enzimas que no son térmicamente estables. Las enzimas pueden desactivarse en presencia (por ejemplo, dentro de la gota) o en ausencia de líquido (por ejemplo, matriz seca). La desactivación con calor sobre un soporte seco tiene la ventaja para desactivar las enzimas sin ningún efecto perjudicial sobre los oligonucleótidos. En algunas realizaciones, se puede usar una versión no termolabile de la ADN polimerasa para PCR térmicamente estable, aunque la enzima está menos optimizada para la tasa de error y la velocidad. Alternativamente, se puede usar epoxi dATP para inactivar la enzima.

En algunas realizaciones, las características discretas pueden contener oligonucleótidos que son sustancialmente complementarios (por ejemplo 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 %). Los oligonucleótidos molde pueden tener errores inherentes, ya que generalmente se sintetizan químicamente (por ejemplo, deleciones a una velocidad de 1 en 100 bases y apareamientos erróneos e inserciones en aproximadamente 1 de cada 400 bases). Suponiendo una tasa de error promedio de 1 en 300 bases y un tamaño medio del oligonucleótido molde de

70 bases, cada 1 de 4 oligonucleótidos molde contendrán un error en comparación con una secuencia de referencia (por ejemplo, la secuencia de tipo silvestre de un gen de interés). Por ejemplo, un oligonucleótido molde puede contener un error que puede ser un apareamiento erróneo, delección o inserción. En la síntesis por PCR, el error se mantiene en el oligonucleótido sintetizado. Durante las reacciones de PCR se pueden introducir errores adicionales.

- 5 En consecuencia, se necesitan métodos para la corrección de errores para la síntesis/ensamblaje de genes de alta fidelidad.

En consecuencia, algunos aspectos de la divulgación están relacionados con el reconocimiento y la eliminación local de oligonucleótidos bicatenarios que contienen errores de apareamiento erróneo en la secuencia en características específicas. En una realización preferida, el reconocimiento de apareamientos erróneos se puede utilizar para controlar los errores generados durante la síntesis de oligonucleótidos, el ensamblaje de genes, y la construcción de polinucleótidos más largos. Después de la amplificación, la totalidad de las características o un conjunto de las características que comprenden dúplex de oligonucleótidos se someten primero a ronda(s) de fusión e hibridación como se ha descrito anteriormente. En un aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos que tienen secuencias predefinidas se ensamblan después amplificarse y filtrarse los errores. En algunas realizaciones, dos gotas adyacentes que contienen dos copias múltiples de diferentes oligonucleótidos o polinucleótidos en solución se combinan mediante la fusión de gotas adecuadas en el soporte sólido. El soporte sólido comprende moléculas diferentes y únicas soportadas o unidos a la superficie, una única molécula soportada o fijada a la superficie en múltiples posiciones, otras moléculas únicas soportadas o unidas a la superficie. En la superficie del soporte sólido se puede encontrar un patrón existente de moléculas. Diferentes moléculas u oligonucleótidos pueden existir en diferentes posiciones. Se apreciará que la disposición de estas moléculas únicas puede diseñarse para permitir estratégicamente la posterior combinación de los contenidos de estos sitios. Por ejemplo, estas moléculas únicas pueden estar dispuestas en un patrón de tablero de ajedrez.

- 25 Un aspecto de la divulgación se refiere también a métodos para mezclar moléculas dentro de una o más características de una biblioteca de diversidad alta en un soporte sólido. Se pueden usar varios métodos de fluidos para lograr el barajado. En algunas realizaciones, el barajado se puede realizar con microvolúmenes depositados o sin microvolúmenes. Por ejemplo, con referencia a la figura 5, el barajado se puede implementar en microvolúmenes individuales (502) creadas en la deposición de uno o más fluidos. Los miembros de la biblioteca de alta diversidad (504) se pueden inmovilizar en una superficie (501). El barajado se puede lograr por calentamiento y enfriamiento de los microvolúmenes (502), provocando la fusión localizada y la renaturalización en cada ubicación en la que se encuentra un miembro de la biblioteca (Figura 5A). Estos microvolúmenes se pueden crear de una manera en serie, como se ilustra en la Figura 5B, que muestra un proceso que progresa de derecha a izquierda. Para cada miembro de la biblioteca, primero se deposita un líquido adecuado para la reacción de barajado (505), lo que da lugar a microvolúmenes (502); después del depósito de (505), un segundo fluido (506) que es inmiscible a (505) se deposita sobre los microvolúmenes (502), formando una manta (503) a través de los microvolúmenes (502). Este proceso puede llevarse a cabo hasta que todos los miembros deseables de la biblioteca de alta diversidad (504) están cubiertos por microvolumen (502) y/o una manta (503).

- 40 En otro ejemplo, las propiedades de la superficie del sustrato (501) pueden usarse para conseguir la estructura de la figura 5A a escala global. Como se ilustra en la Figura 5C, el sustrato (501) se inicia completamente sumergido en un fluido (511) contenido en un recipiente (510), de manera que todos los miembros de la biblioteca de alta diversidad están en contacto con el fluido (511), como se muestra en la figura 5C1. Líquido (511) es tal que tiene un ángulo de contacto bajo con la superficie del sustrato, en la que los miembros de la biblioteca residen. Se añade un segundo fluido (512) al recipiente (510) que es inmiscible con el primer fluido (511), formando una interfaz (513). El segundo fluido (512) es tal que tiene un ángulo de contacto diferente (preferentemente mayor) con la superficie del sustrato, en la que residen los miembros de la biblioteca. Sin embargo, entre los miembros de la biblioteca, el segundo fluido (512) puede tener un ángulo de contacto inferior con la superficie. Cuando el sustrato se mueve desde totalmente inmerso en (511) a través de la interfaz (513), los pequeños volúmenes del primer fluido (511) se retienen en la superficie del sustrato (510) en la que residen los miembros de la biblioteca de alta diversidad, formando microvolúmenes (504). Además, una vez que la superficie pasa la interfaz (513), los microvolúmenes están cubiertos por una manta formada por fluido (512). La estructura resultante de las microvolúmenes se muestra en la figura 5C2.

- 55 El proceso ilustrado en la Figura 5C se puede llevar a cabo sin el recipiente (510) mediante el uso de una disposición que se muestra en la Figura 5D. Dos cabezas capilares de menisco (520, 512) se bajan hasta casi contactar con el sustrato (501). Los fluidos (511) y (512) se suministran a las cabezas capilares del menisco (520, 521) para formar un pequeño volumen (522, 523) que entra en contacto con las cabezas capilares del menisco (520, 521) y el sustrato (501). El movimiento relativo de las cabezas y el sustrato se muestra en la dirección de la flecha. Los volúmenes (522, 523) pueden colocarse lo suficientemente cerca para formar una interfaz, o separados lo suficiente como para formar un espacio entre los volúmenes. Se crean microvolúmenes a medida que los miembros de la biblioteca (504) pasan primero por debajo del menisco del fluido de reacción (522), el menisco del fluido de la manta (523), lo que da lugar a las características encapsuladas como se muestra en la Figura 5^a.

- 65 El barajado también puede lograrse sin microvolúmenes. En un ejemplo, como se indica en la Figura 6, el control preciso de cortos períodos de tiempo durante el cual la temperatura del sustrato (601) y el líquido (600) se eleva

para provocar fusión se utiliza para lograr la fusión localizada y renaturalización a través del límite de difusión. La Figura 6A1 muestra el ajuste antes de la fusión, en la que los homodúplex (602, 603) se unen a la superficie a través de unión covalente de la cadena molde. Cuando la temperatura se eleva por encima de la temperatura de fusión de los homodúplex, la fusión se lleva a cabo y las copias de una sola hebra (604, 605) se liberan en el fluido (600). La figura 6B1 muestra la fusión en un momento inmediatamente después de que la temperatura aumente, y la Figura 6C1 muestra el punto de fusión en un momento posterior al de la figura 6B1, y la Figura 6D1 muestra la fusión en un momento posterior al de la figura 6C1. Las copias de una sola cadena fundidas (604, 605) se difunden fuera de su lugar de origen y la difusión se rige por la ecuación de difusión. Con las Figuras 6A2, 6B2, 6C2 y 6D2 se pretende ilustrar el proceso de difusión a medida que el tiempo progresa mostrando la concentración de los dúplex (por ejemplo, intensidad de la señal) en dos posiciones adyacentes sobre el sustrato (601). Cuanto más tiempo se deja para la difusión, más moléculas viajarán. La distancia de difusión (L_d) característica está relacionada con el coeficiente de difusión (D) y el tiempo (t):

$$L_d = \sqrt{4 D t}$$

El tiempo que se permite para la difusión puede controlarse y, por lo tanto, la distancia de difusión característica se puede controlar también, ya que el coeficiente de difusión está determinado por la especie molecular. Como se muestra en la Figura 6E, cuando se induce la renaturalización (mediante la reducción de la temperatura) después de un breve período de tiempo de fusión, los heterodúplex renaturalizados se recuperan de nuevo a las posiciones originales (606, 607), con lo se consigue una operación de barajado. Si se permite que el tiempo de fusión proceda durante más tiempo, más moléculas (608) se difundirán en la masa del fluido (600) y será menos probable que se recapturen de nuevo a la posición original.

En algunas realizaciones, el barajado se puede lograr con una gota que se está evaporando activamente. En el ejemplo mostrado en la Figura 7, la superficie (701) se eleva primero a una temperatura por encima de la temperatura de fusión de los homodúplex formados por el molde (702) y copias (703). Un volumen (704) se deposita para cubrir los homodúplex, y puesto que la superficie ya está a la temperatura de fusión elevada, se funden las copias (706) en el líquido (705) que cuyo volumen se está reduciendo rápidamente debido a la evaporación. La gota se deja secar completamente depositando las copias (707) sobre la superficie. Después, el sustrato se enfría hasta por debajo de la temperatura de fusión de la población en particular, y se rehidrata para resuspender las copias (707) en el volumen de fluido (708). La posterior renaturalización de las copias (707) en los moldes (702) da como resultado un grupo heterodúplex barajado, completando la operación de barajado.

Después de la fusión y renaturalización, los heterodúplex pueden eliminarse mediante diversos métodos descritos anteriormente. Después, los dúplex restantes pueden ser objeto de fusión de nuevo para desnaturalizar todos o algunos de los dúplex. En algunas realizaciones, algunos dúplex (por ejemplo, los dúplex escindidos o truncados) se funden selectivamente, dejando a los demás (por ejemplo, los dúplex de longitud completa) intactos. Las condiciones para esta fusión estricta (por ejemplo, una temperatura de fusión precisa) se pueden determinar mediante la observación de una curva de fusión en tiempo real. En un análisis de la curva de fusión a modo de ejemplo, los productos de la PCR se calientan lentamente en presencia de colorantes fluorescentes específicos de ADN de doble cadena (ADNdc) (por ejemplo, SYBR Green, LCGreen, SYTO9 o EvaGreen). Con el aumento de temperatura, el ADNdc se desnaturaliza (funde), liberando el colorante fluorescente con una disminución resultante de la señal fluorescente. La temperatura a la que se funde el ADNdc se determina mediante factores tales como la secuencia de nucleótidos, la longitud del ADN y la relación GC/AT. Normalmente, se estima que los pares de bases G-C en un dúplex contribuyen en aproximadamente 3 °C. a la T_m , mientras que se estima los pares de bases A-T contribuyen aproximadamente 2 °C., hasta un máximo teórico de aproximadamente 80 a 100 °C. Sin embargo, se dispone de modelos más sofisticados de T_m y pueden ser en los que se tienen en cuenta las interacciones G-C de apilamiento, los efectos del disolvente, la temperatura de ensayo deseada y similares. El análisis de las curvas de fusión puede detectar una única diferencia de base. Pueden usarse varios métodos para el control preciso de la temperatura en las características individuales, como se ha descrito anteriormente.

Algunos aspectos de la divulgación se refieren a la selección de destino y el enrutamiento de los volúmenes aislados y, por lo tanto, para el control de la ubicación o la huella de los volúmenes fusionados. Se apreciará que a medida que las regiones individuales del soporte son direccionables, los volúmenes aislados individuales, tales como las gotas, pueden controlarse individualmente. En algunas realizaciones, es preferible colocar volúmenes aislados en regiones o características adyacentes para permitir la fusión de los volúmenes. Sin embargo, en otras realizaciones, los volúmenes aislados están dirigidos o enviados a un destino seleccionado. En algunas realizaciones, el sustrato del soporte es sustancialmente plano y las gotas se dirigen mediante una trayectoria de dos dimensiones (por ejemplo ejes x, y). Se puede mover a las gotas para llevarlas a lugares seleccionados para su posterior procesamiento, para fusionar con un segundo volumen aislado en una gota de segunda etapa en lugares preseleccionados y/o durante el transporte, para eliminar algunos reactivos de la gota denominado proceso de "lavado durante el transporte", tal como se describe en el presente documento), etc.

En algunas realizaciones, el conjunto jerárquico y/o secuencial escalonado se puede utilizar para ensamblar oligonucleótidos y polinucleótidos más largos. En una realización preferida, los métodos utilizan ensamblaje jerárquico de dos o más oligonucleótidos o dos o más fragmentos de polinucleótidos de subensamblaje a la vez. La

gotas vecinas pueden manipularse (mover y/o combinar, como se ha descrito anteriormente) para fusionar siguiendo una estrategia jerárquica, mejorando de este modo la eficiencia del ensamblaje. En algunas realizaciones, cada gota contiene oligonucleótidos con secuencias de ácido nucleico predefinidas y diferentes. En algunas realizaciones, dos gotas se mueven siguiendo un camino predefinido hasta una posición libre de oligonucleótido. En una realización preferida, las moléculas de ensamblaje (por ejemplo oligonucleótidos) están previamente dispuestas sobre la superficie del soporte en características discretas predeterminadas. Debe apreciarse que los volúmenes aislados se pueden dirigir independientemente de una manera secuencial o altamente paralela. Las gotas pueden ser dirigidas utilizando técnicas basadas en electrohumectación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.911.132 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0054503). El principio de electrohumectación se basa en la manipulación de gotas sobre una superficie que comprende una matriz de electrodos y el uso de tensión para cambiar la tensión interfacial. En algunas realizaciones, las gotas se mueven usando un gradiente de humectabilidad. Se ha demostrado que las gotas colocadas en las superficies del gradiente de humectabilidad normalmente se mueven en la dirección de aumentar la capacidad de humectación (véase Zielke y Szymczyk, Eur. Phys. J. J. Special Topics, 166, 155-158 (2009)). En otras realizaciones, las gotas se pueden mover usando un gradiente térmico. Cuando se colocan en un gradiente térmico, las gotas se mueven desde ubicaciones de mayor temperatura hacia las ubicaciones de temperatura más baja. El movimiento de las gotas utilizando electrohumectación, gradientes de temperatura y gradientes de humectabilidad depende del líquido (por ejemplo, concentración de soluto acuoso, no acuoso), el tamaño de las gotas y/o la inclinación del gradiente.

Otro de los beneficios de la operación de movimiento descrita en el presente documento es la implementación de una operación de "lavado". El movimiento del líquido lejos de una característica de la superficie permite la separación de las moléculas unidas a la superficie (por ejemplo, oligonucleótidos) de las moléculas en solución. Por lo tanto, se implementa una operación de lavado. Por ejemplo, el transporte durante el lavado se puede utilizar para eliminar los oligonucleótidos molde forman los oligonucleótidos complementarios después de la amplificación. En algunas realizaciones, las características del "transporte durante el lavado" o la aplicación de manchas del lavado pueden colocarse junto a las características cuando se produce el procesamiento del oligonucleótido. Las manchas de lavado se pueden colocar adyacentes a las características. Los productos indeseados liberados en la solución de gotas en las características se pueden mover a las manchas de lavado, respectivamente. En algunas realizaciones, el soporte proporciona una mancha de lavado por cada operación de ensamblaje o una mancha de lavado común para dos o más operaciones de ensamblaje. El proceso del transporte en lavado también se puede utilizar para eliminar los oligonucleótidos que contienen errores no deseados de dúplex estables después de la hibridación y de fusión estricta. Por ejemplo, las características de fusión rigurosas se pueden colocar a lo largo del camino de la progresión de ensamblaje, lo que permite una corrección de errores de fusión rigurosa, como se ha descrito anteriormente. Del mismo modo, el soporte puede comprender una mancha SM para cada etapa de ensamblaje o una mancha SM común para dos o más operaciones de ensamblaje.

En algunas realizaciones, el contenido de dos microvolúmenes tales como gotas se combina para permitir el ensamblaje de polinucleótidos. Por ejemplo, dos gotas de la primera etapa se pueden combinar formando una gota de segunda etapa más grande. En algunas realizaciones, se añaden gotas "de fusión" o gotas "ancla" que pueden contener o no contener la enzima (por ejemplo, polimerasa, ligasa, etc.), los oligonucleótidos adicionales y todos los reactivos para permitir el ensamblaje por PCR o por ligadura (enzimática o química) o mediante una combinación de la reacción enzimática. Por ejemplo, los oligonucleótidos en una gota dada pueden hibridar entre sí y pueden ensamblarse mediante PCR o ligadura. Las gotas fusionadas o gotas de segunda etapa contienen subconjuntos de polinucleótidos y se pueden fusionar posteriormente para formar gotas más grandes o gotas tercera etapa que contienen fragmentos más grandes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término subconjunto se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha ensamblado a partir de un conjunto de oligonucleótidos. Preferiblemente, un subconjunto es al menos 2 veces más largo que los oligonucleótidos. Por ejemplo, un subconjunto puede ser de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más bases de longitud. Debe apreciarse que el uso de gotas como volumen de reacción aislado permite un sistema altamente paralelo. En algunas realizaciones, al menos 100, al menos 1.000 reacciones pueden tener lugar en paralelo. En algunas realizaciones, los cebadores se inmovilizan sobre el soporte en las proximidades de las manchas que contienen los oligonucleótidos para ensamblar. En algunas realizaciones, los cebadores se escinden *in situ*. En algunas realizaciones, los cebadores están soportados sobre el soporte sólido. Después, los cebadores pueden escindirse *in situ* y se eluyen dentro de una gota que posteriormente se fusiona con una gota que contiene oligonucleótidos eluidos o en un soporte sólido.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están diseñados para proporcionar las cadenas de sentido completo (cadena positiva) y antisentido (cadena menos) de la construcción de polinucleótido. Después de la hibridación de los oligonucleótidos de cadenas más y menos, dos oligonucleótidos bicatenarios se someten a ligadura con el fin de formar un primer producto de subensamblaje. Los productos de subensamblaje se someten después a la ligadura para formar un ácido nucleico más grande o la secuencia de ácido nucleico completa.

Las técnicas de ensamblaje a base de ligasa pueden implicar uno o más enzimas ligasa adecuadas que pueden catalizar la unión covalente de los extremos 3' y 5' adyacentes del ácido nucleico (por ejemplo, un fosfato en 5' y un hidroxilo en 3' del o los ácidos nucleicos en una ácido nucleico molde complementario de forma que el extremo 3' está inmediatamente adyacente al extremo 5'). En consecuencia, una ligasa puede catalizar una reacción de

ligadura entre el fosfato en 5' de un primer ácido nucleico al hidroxilo del extremo 3' de un segundo ácido nucleico si el primero y el segundo ácidos nucleicos se hibridan uno al lado del otro en un ácido nucleico molde). Una ligasa se puede obtener a partir de fuentes recombinantes o naturales. Una ligasa puede ser una ligasa termoestable. En algunas realizaciones, puede usarse una ligasa termoestable de un organismo termófilo. Ejemplos de ADN ligasas termoestables incluyen, pero no se limitan a: Tth ADN ligasa (de *Thermus thermophilus*, disponible de, por ejemplo, Eurogentec y GeneCraft); ADN ligasa de Pfu (una ligasa hipertermófila de *Pyrococcus furiosus*); Taq ligasa (de *Thermus aquaticus*), cualquier otra ligasa termoestable adecuada, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una o más ligasas de temperatura menor pueden ser útiles (por ejemplo, ADN ligasa de T4). Una ligasa de temperatura más baja puede ser útil para salientes más cortos (por ejemplo, salientes de aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, o aproximadamente 6 bases) que pueden no ser estables a temperaturas más altas.

Se pueden usar técnicas no enzimáticas para ligar los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un extremo 5' (por ejemplo, el grupo fosfato del extremo 5') y un extremo 3' (por ejemplo, el hidroxilo del extremo 3') de uno o más ácidos nucleicos pueden estar unidos covalentemente entre sí sin necesidad de utilizar enzimas (por ejemplo, sin necesidad de utilizar una ligasa). En algunas realizaciones, las técnicas no enzimáticas pueden ofrecer ciertas ventajas sobre las uniones mediante enzimas. Por ejemplo, las técnicas no enzimáticas pueden tener una alta tolerancia de análogos de nucleótidos no naturales en sustratos de ácido nucleico, pueden usarse para unir sustratos de ácidos nucleicos cortos, pueden usarse para unir sustratos de ARN, y/o pueden ser más baratas y/o más adecuadas para ciertas aplicaciones automatizadas (por ejemplo, de alto rendimiento).

La ligadura no enzimática puede implicar una ligadura química. En algunas realizaciones, los extremos de ácido nucleico de dos o más ácidos nucleicos diferentes pueden unirse químicamente. En algunas realizaciones, los extremos de ácido nucleico de un único ácido nucleico pueden unirse químicamente (por ejemplo, para circularizar el ácido nucleico). Se debe apreciar que las dos cadenas en una primera terminal de ácido nucleico de doble cadena se pueden ligar químicamente a ambas cadenas en un segundo terminal de ácido nucleico de doble cadena. Sin embargo, en algunas formas de realización solamente una hebra de un primera terminal de ácido nucleico se puede ligar químicamente a un solo filamento de un segundo terminal del ácido nucleico. Por ejemplo, el extremo 5' de una hebra de un primera terminal de ácido nucleico se puede ligar a el extremo 3' de una cadena de un segundo terminal de ácido nucleico sin los extremos de las hebras complementarias que químicamente se ligaron.

En consecuencia, se puede usar una ligadura química para formar un enlace covalente entre un extremo 5' de un primer ácido nucleico y un extremo 3' de un segundo ácido nucleico, en el que los extremos de los ácidos nucleicos primero y segundo pueden ser extremos de un solo ácido nucleico o extremos de ácidos nucleicos separados. En un aspecto, la ligadura química puede implicar al menos un sustrato de ácido nucleico que tiene un extremo modificado (por ejemplo, un extremo 5' y/o 3' modificado) que incluye uno o más restos químicamente reactivos que facilitan o estimulan la formación de la unión. En algunas realizaciones, la ligadura química se produce cuando uno o más terminales de ácido nucleico se unen en estrecha proximidad (por ejemplo, cuando los extremos se unen debido a la hibridación entre secuencias de ácidos nucleicos complementarios). Por consiguiente, la hibridación entre salientes en 3' o 5' complementarios (por ejemplo, salientes generados por escisión con enzimas de restricción de un ácido nucleico de doble cadena) o entre cualquier combinación de ácidos nucleicos complementarios que se traduce en que un extremo 3' se lleva muy cerca de un extremo 5' (por ejemplo, los extremos 3' y 5' son adyacentes entre sí cuando los ácidos nucleicos se hibridan a un ácido nucleico molde complementario) puede estimular una ligadura química dirigida por moldes. Ejemplos de reacciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a, reacciones de condensación, reducción y/o de unión foto-química. Se debe apreciar que en algunas realizaciones, la ligadura química se puede utilizar para producir enlaces fosfodiéster internucleotídicos de origen natural, enlaces internucleotídicos pirofosfato fosfamida que no son de origen natural y otros enlaces internucleotídicos no naturales.

En algunas realizaciones, el proceso de ligadura química puede implicar uno o más agentes de acoplamiento para catalizar la reacción de ligadura. Un agente de acoplamiento puede estimular una reacción de ligadura entre grupos reactivos en los ácidos nucleicos adyacentes (por ejemplo, entre un resto 5' reactivo y un resto reactivo en 3' en los sitios adyacentes a lo largo de un molde complementario). En algunas realizaciones, un agente de acoplamiento puede ser un reactivo reductor (por ejemplo, ferricianuro), un reactivo de condensación tal (por ejemplo, cianoimidazol, bromuro de cianógeno, carbodiimida etc.), o irradiación (por ejemplo, irradiación UV para la fotoligadura).

En algunas realizaciones, una ligadura química puede ser una reacción de autoligadura que no implica un agente de acoplamiento separado. En la autoligadura, la presencia de un grupo reactivo en uno o más ácidos nucleicos puede ser suficiente para catalizar una ligadura química entre extremos de ácido nucleico sin la adición de un agente de acoplamiento (véase, por ejemplo, Xu et al., (1997) *Tetrahedron Lett.* 38: 5595-8). Los ejemplos no limitantes de estas reacciones de ligadura libres de reactivos pueden implicar desplazamientos nucleófilos de azufre en grupos de bromoacetilo, tosilo, o de yodo de los nucleósidos (ver, por ejemplo, Xu et al., (2001) *Nat. Biotech.* 19: 148-52). Los ácidos nucleicos que contienen grupos reactivos adecuados para autoligadura se pueden preparar directamente en sintetizadores automatizados (véase, por ejemplo, Xu et al., (1999) *Nuc. Acids Res.* 27: 875-81). En algunas realizaciones, un fosforotioato en un extremo 3' puede reaccionar con un grupo saliente (tal como tosilo o yoduro) en un timidina a un extremo 5' adyacente. En algunas realizaciones, dos cadenas de ácido nucleico unidas en sitios

adyacentes en una cadena diana complementaria pueden sufrir autoligadura por el desplazamiento de un resto de yoduro del extremo 5' (o tosilato) con un resto de azufre en el extremo 3'. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el producto de una autoligadura puede incluir un enlace internucleotídico que no es de origen natural (por ejemplo, un solo átomo de oxígeno puede ser sustituido con un átomo de azufre en el producto ligado).

En algunas realizaciones, un dúplex de ácido nucleico sintético se puede montar a través de la ligadura química en una reacción de una etapa que implica la ligadura química simultánea de ácidos nucleicos en ambas hebras del dúplex. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos fosforilados en 5' correspondientes a ambas cadenas de un ácido nucleico diana puede ligarse químicamente mediante a) exposición al calor (por ejemplo, a 97 °C) y un enfriamiento lento para formar un complejo de oligonucleótidos hibridados, y b) exposición a bromuro de cianógeno o a cualquier otro agente de acoplamiento adecuado en condiciones suficientes para ligar químicamente los extremos 3' y 5' adyacentes en el complejo de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, se puede ensamblar un dúplex de ácido nucleico sintético mediante ligadura química en una reacción de dos etapas que implica la ligadura química separada para las cadenas complementarias del dúplex. Por ejemplo, cada cadena un ácido nucleico diana se puede ligar en una reacción separada que contiene oligonucleótidos fosforilados correspondientes a la cadena que se va a ligar y oligonucleótidos no fosforilados correspondientes a la cadena complementaria. Los oligonucleótidos no fosforilados pueden servir como molde para los oligonucleótidos fosforilados durante una ligadura química (por ejemplo, usando bromuro de cianógeno). El ácido nucleico monocatenario ligado resultante puede purificarse e hibridarse con un ácido nucleico monocatenario complementario para formar el ácido nucleico dúplex diana (véase, por ejemplo, Shabarova et al., (1991) Nucl. Acids Res. 19: 4247-51).

En un aspecto, un fragmento de ácido nucleico puede ensamblarse en una reacción de ensamblaje mediada por polimerasa a partir de una pluralidad de oligonucleótidos que se combinan y se extienden en una o más rondas de extensiones mediadas por polimerasa. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son oligonucleótidos solapantes que cubren la secuencia completa pero dejando huecos de cadena sencilla que pueden rellenarse mediante extensión de la cadena. La pluralidad de diferentes oligonucleótidos puede proporcionar cualquiera de las secuencias positivas (cadena positiva), secuencias negativas (de cadena menos), o una combinación de secuencias positivas y negativas que corresponden a la secuencia completa del fragmento de ácido nucleico que se ha montado. En algunas realizaciones, uno o más oligonucleótidos diferentes pueden tener regiones de secuencia solapantes (por ejemplo, regiones solapantes en 5' o regiones solapantes en 3'). Las regiones de secuencia solapantes pueden ser idénticas (es decir, correspondientes a la misma cadena del fragmento de ácido nucleico) o complementaria (es decir, correspondiente a cadenas complementarias del fragmento de ácido nucleico). La pluralidad de oligonucleótidos puede incluir uno o más pares de oligonucleótidos con regiones de secuencia solapantes idénticas, uno o más pares de oligonucleótidos con regiones de secuencia solapantes complementarias, o una combinación de los mismos. Las secuencias solapantes pueden ser de cualquier longitud adecuada. Por ejemplo, las secuencias solapantes pueden abarcar toda la longitud de uno o más ácidos nucleicos utilizados en una reacción de ensamblaje. Las secuencias solapantes pueden ser de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 500 oligonucleótidos de longitud (por ejemplo, entre aproximadamente 10 y 100, entre aproximadamente 10 y 75, entre aproximadamente 10 y 50, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 45, aproximadamente 50, etc.). Sin embargo, se pueden longitudes solapantes más cortas, más largas o intermedias. Se debe apreciar que las solapantes entre diferentes ácidos nucleicos de entrada utilizados en una reacción de ensamblaje pueden tener diferentes longitudes.

Las técnicas de ensamblaje a base de polimerasa pueden implicar una o más enzimas polimerasas adecuadas que pueden catalizar una extensión basada en un molde de un ácido nucleico en una dirección de 5' a 3' en presencia de los nucleótidos apropiados y un molde hibridado. Una polimerasa puede ser termoestable. Una polimerasa se puede obtener a partir de fuentes recombinantes o naturales. En algunas realizaciones, puede usarse una polimerasa termoestable de un organismo termófilo. En algunas realizaciones, una polimerasa puede incluir una actividad 3'→5' exonucleasa/corrección. En algunas realizaciones, una polimerasa puede no tener actividad de corrección o que esta sea mínima (por ejemplo, una polimerasa puede ser una variante recombinante de una polimerasa natural que ha sido modificada para reducir su actividad correctora). Ejemplos de ADN polimerasas termoestables incluyen, pero no se limitan a: Taq (una ADN polimerasa estable al calor de la bacteria *Thermus aquaticus*); Pfu (una ADN polimerasa termófila con una actividad 3'→5' exonucleasa/corrección de *Pyrococcus furiosus*, disponible de, por ejemplo, Promega); ADN polimerasa VentR® y ADN polimerasa VentRO (exo-) (ADN polimerasas termófilas con o sin actividad 3'→5' exonucleasa/Corrección de *Thermococcus litoralis*, también conocida como Th polimerasa); ADN polimerasa Profundo VentR® y Profundo VentR® Deep VentR® (exo-) (ADN polimerasas termófilas, con o sin actividad 3'→5' exonucleasa/corrección de la especie *Pyrococcus* GB-D, disponible de New England Biolabs); KOD HiFi (una ADN polimerasa KODI de *Thermococcus kodakaraensis* recombinante con actividad de exonucleasa/corrección 3'→5', disponible en Novagen.); BIO-X-ACT (una mezcla de polimerasas que posee 'actividad de ADN polimerasa y 5'-3' y actividad correctora 3'→5); fragmento Klenow (un truncamiento N-terminal de la ADNA polimerasa I, que retiene LA actividad de la polimerasa, pero ha perdido la actividad exonucleasa 5'→3' exonucleasa, disponible en, por ejemplo, Promega y NEB); Sequenase™ (ADN polimerasa de T7 deficiente en la actividad de exonucleasa T-5'); Phi29 (ADN polimerasa del bacteriófago 29, se puede utilizar para la amplificación en círculo rodante, por ejemplo, en un kit de amplificación de molde con secuenciación de ADN TempliPhi™

Plantilla, disponible de Amersham Biosciences); TopoTaq (una polimerasa híbrida que combina los dominios de unión de ADN hiperestable y la actividad de eliminación de enlace de ADN de la topoisomerasa Methanopyrus, sin actividad exonucleasa, disponible en Sistemas Fidelity); TopoTaq de alta fidelidad que incorpora un dominio de corrección con la actividad exonucleasa; Phusion™ (una enzima de tipo Pyrococcus con un dominio de mejora de procesividad, disponible en New England Biolabs); cualquier otra ADN polimerasa adecuada, o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser un SDP (polimerasa de desplazamiento de hebra; por ejemplo, una SDPe, que es una SDP sin actividad exonucleasa). Esto permite una PCR isotérmica (extensión isotérmica, amplificación isotérmica) a una temperatura uniforme. A medida que la polimerasa (por ejemplo, Phi29, Bst) viaja a lo largo de un molde, desplaza la cadena complementaria (por ejemplo, creada en reacciones de extensión anteriores). Dado que los ADN desplazados son de una sola cadena, los cebadores se pueden unir a una temperatura constante, eliminando la necesidad de cualquier termociclado durante la amplificación, evitando así o reduciendo la evaporación de la mezcla de reacción.

Se debe apreciar que la descripción de las reacciones de ensamblaje en el contexto de los oligonucleótidos no se pretende que sean limitante. Por ejemplo, otros polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de cadena sencilla, de doble cadena, fragmentos de restricción, productos de amplificación, polinucleótidos de origen natural, etc.) pueden ser incluidos en una reacción de ensamblaje, junto con uno o más oligonucleótidos, con el fin de generar un polinucleótido de interés.

Aspectos de los métodos y dispositivos proporcionados en el presente documento pueden incluir la automatización de uno o más actos descritos en este documento. En algunas realizaciones, una o más etapas de una reacción de amplificación y/o de ensamblaje pueden automatizarse usando uno o más dispositivos de manipulación de muestras automatizados (por ejemplo, uno o más dispositivos automatizados de manipulación de líquido o fluido). Los dispositivos y procedimientos automatizados se pueden utilizar para liberar reactivos de reacción, incluyendo uno o más de los siguientes: ácidos nucleicos de partida, tampones, enzimas (por ejemplo, una o más ligasas y/o polimerasas), nucleótidos, sales, y otros agentes adecuados tales como agentes estabilizantes. Los dispositivos y procedimientos también automatizados se pueden utilizar para controlar las condiciones de reacción. Por ejemplo, puede utilizarse un ciclador térmico automatizado para controlar las temperaturas de reacción y cualquier ciclo de temperatura que se pueden utilizar. En algunas realizaciones, un láser de barrido puede automatizarse para proporcionar una o más temperaturas de reacción o ciclos de temperatura adecuada para la incubación de polinucleótidos. Del mismo modo, el análisis posterior de los productos de polinucleótidos ensamblados puede automatizarse. Por ejemplo, la secuenciación puede automatizarse utilizando un dispositivo de secuenciación y protocolos de secuenciación automatizados. Las etapas adicionales (por ejemplo, amplificación, clonación, etc.) también pueden automatizarse usando uno o más dispositivos adecuados y protocolos relacionados. Se debe apreciar que uno o más de los componentes del dispositivo o dispositivos descritos en el presente documento se pueden combinar en un sistema (por ejemplo, un sistema robótico) o en un microentorno (por ejemplo, una cámara de reacción microfluidica). Las mezclas de reacción de ensamblaje (por ejemplo, muestras de reacción líquidas) pueden transferirse desde un componente del sistema a otro mediante dispositivos y procedimientos automatizados (por ejemplo, manipulación y/o transferencia de muestras y/o recipientes de muestras, incluyendo dispositivos de pipeteo automáticos, microsistemas, etc.). El sistema y todos los componentes del mismo pueden controlarse mediante un sistema de control.

En consecuencia, las etapas del método y/o aspectos de los dispositivos proporcionados en el presente documento pueden automatizarse usando, por ejemplo, un sistema informático (por ejemplo, un sistema controlado por ordenador). Un sistema de ordenador en el que los aspectos de la tecnología proporcionada en el presente documento pueden implementarse pueden incluir un ordenador para cualquier tipo de procesamiento (por ejemplo, análisis de la secuencia y/o de control del dispositivo automatizado como se describe en el presente documento). Sin embargo, se debe apreciar que ciertas etapas de procesamiento pueden ser proporcionadas por uno o más de los dispositivos automatizados que son parte del sistema de ensamblaje. En algunas realizaciones, un sistema de ordenador puede incluir dos o más ordenadores. Por ejemplo, un ordenador puede estar acoplado, a través de una red, a un segundo ordenador. Un ordenador puede llevar a cabo análisis de la secuencia. El segundo equipo puede controlar uno o más de los dispositivos de síntesis y de ensamblaje automatizados en el sistema. En otros aspectos, los equipos adicionales pueden incluirse en la red para controlar uno o más de los análisis o procesamiento de actos. Cada equipo puede incluir una memoria y el procesador. Los ordenadores pueden adoptar cualquier forma, ya que los aspectos de la tecnología proporcionada en el presente documento no se limitan a su implementación en cualquier plataforma informática en particular. Del mismo modo, la red puede tomar cualquier forma, incluyendo una red privada o una red pública (por ejemplo, internet). Los dispositivos de visualización pueden estar asociados con uno o más de los dispositivos y ordenadores. Como alternativa, o además de, un dispositivo de visualización puede estar ubicado en un sitio remoto y conectado para la visualización de la salida de un análisis de acuerdo con la tecnología proporcionada en el presente documento. Las conexiones entre los diferentes componentes del sistema pueden ser a través de cable, fibra óptica, transmisión inalámbrica, transmisión por satélite, cualquier otra transmisión adecuada, o cualquier combinación de dos o más de los anteriores.

Cada uno de los diferentes aspectos, realizaciones, o actos de la tecnología proporcionada en el presente documento se pueden automatizar de forma independiente y aplicarse en cualquiera de numerosas maneras. Por ejemplo, cada aspecto, realización, o acción se pueden implementar de forma independiente utilizando hardware, software o una combinación de los mismos. Cuando se implementa en software, el código de software puede ejecutarse en cualquier procesador adecuado o colección de procesadores, ya sea proporcionado en un solo ordenador o distribuido entre varios ordenadores. Se debe apreciar que cualquier componente o colección de componentes que realizan las funciones descritas anteriormente puede considerarse genéricamente como uno o más controladores que controlan las funciones antes descritas. El uno o más controladores pueden implementarse de muchas maneras, tal como con hardware exclusivo o con hardware de propósito general (por ejemplo, uno o más procesadores) que se programa utilizando microcódigo o software para realizar las funciones citadas anteriormente.

A este respecto, se debe apreciar que una aplicación de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento comprende al menos un medio legible por ordenador (por ejemplo, una memoria de ordenador, un disco flexible, un disco compacto, una cinta, etc.) codificado con un programa de ordenador (es decir, una pluralidad de instrucciones), que, cuando se ejecuta en un procesador, realiza una o más de las funciones antes descritas de la tecnología proporcionada en el presente documento. El medio legible por ordenador puede ser transportable de tal manera que el programa almacenado en el mismo puede cargarse en cualquier recurso del sistema de ordenador para implementar una o más funciones de la tecnología proporcionada en el presente documento. Además, se debe apreciar que la referencia a un programa de ordenador que, cuando se ejecuta, realiza las funciones antes descritas, no se limita a un programa de aplicación que se ejecuta en un ordenador huésped. Más bien, el término programa de ordenador se utiliza en el presente documento en un sentido genérico para hacer referencia a cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que puede emplearse para programar un procesador para implementar los aspectos anteriormente discutidos de la tecnología proporcionada en el presente documento.

Se debe apreciar que, de acuerdo con varias realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento en el que los procesos están almacenados en un medio legible por ordenador, los procesos implementados de ordenador pueden, durante el curso de su ejecución, recibir entradas manuales (por ejemplo, de un usuario).

De acuerdo con lo anterior, el control general a nivel de sistema de los dispositivos o componentes del ensamblaje descritos en el presente documento puede efectuarlo por un controlador de sistema que puede proporcionar señales de control a los sintetizadores de ácidos nucleicos asociados, dispositivos de manipulación de líquidos, termocicladores, dispositivos de secuenciación, componentes robóticos asociados, así como otros sistemas adecuados para llevar a cabo las funciones de entrada/salida u otro control deseados. Por lo tanto, el controlador del sistema junto con todos los controladores de dispositivos juntos forman un controlador que controla el funcionamiento de un sistema de ensamblaje de ácido nucleico. El controlador puede incluir un sistema de procesamiento de datos de objetivo general, que puede ser un ordenador de propósito general, o la red de ordenadores de propósito general, y otros dispositivos asociados, incluyendo los dispositivos de comunicación, módems, y/o otros circuitos o componentes para realizar la entrada/salida deseada u otras funciones. El controlador también puede implementarse, al menos en parte, como un circuito integrado de propósito especial único (por ejemplo, ASIC) o una matriz de ASIC, teniendo cada uno una sección de procesador principal o central para el control general a nivel de sistema, y separar las secciones dedicadas a la realización de diversos cálculos concretos diferentes, funciones diferentes y otros procesos bajo el control de la sección de procesador central. El controlador también puede implementarse utilizando una pluralidad de circuitos electrónicos separados integrados programables dedicados u otros dispositivos, por ejemplo circuitos cableados electrónicos o de lógica, tales como circuitos de elementos discretos o dispositivos lógicos programables. El controlador también puede incluir otros componentes o dispositivos, tales como dispositivos de entrada/salida del usuario (monitores, pantallas, impresoras, un teclado, un dispositivo señalador de usuario, pantalla táctil, u otra interfaz de usuario, etc.), dispositivos de almacenamiento de datos, unidad motores, conexiones, controladores de válvulas, dispositivos robóticos, bombas de vacío y de otros tipos, sensores de presión, detectores, fuentes de alimentación, fuentes de impulsos, dispositivos de comunicación u otros circuitos o componentes electrónicos, y así sucesivamente. El controlador también puede controlar el funcionamiento de otras partes de un sistema, como el procesamiento automatizado de solicitudes al cliente, control de calidad, envasado, envío, facturación, etc., para realizar otras funciones adecuadas conocidas en la técnica, pero que no se describen en detalle en este documento.

Varios aspectos de la presente divulgación se pueden utilizar solos, en combinación, o en diversas disposiciones no tratadas específicamente en las realizaciones descritas en lo anterior y, por lo tanto, no está limitada en su aplicación a los detalles y la disposición de los componentes expuestos en la anterior descripción o ilustrados en los dibujos. Por ejemplo, los aspectos descritos en una realización se pueden combinar de cualquier manera con los aspectos descritos en otras realizaciones.

El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de la reivindicación no por sí mismo connota cualquier prioridad, precedencia u orden de un elemento de la reivindicación sobre otro o el orden temporal orden en el que se realizan actos de un método, pero se utilizan simplemente como marcadores para distinguir un elemento reivindicado que tiene un cierto nombre de otro elemento que tiene un mismo nombre (pero para el uso del término ordinal) para distinguir los elementos reivindicados.

Asimismo, debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en el presente documento se usan con una finalidad descriptiva y no deben considerarse limitantes. El uso de "incluyendo", "que comprende", "que tiene", "que contiene", "que implica" y variaciones de los mismos en el presente documento pretende abarcar los elementos enumerados a partir de ellos y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: Escisión y eliminación de apareamientos erróneos usando Surveyor™

- 10 Un ejemplo de escisión y eliminación de de apareamiento erróneo se muestra en las figuras 2 y 3. Con referencia a la figura 2, las manchas de las micromatrices de 20 fueron objeto de marcaje con en 0,005 % de Triton X-100, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM, ditiotreitól (DTT) 7,5 mM, dATP 0,4 mM, dGTP 0,4 mM, dTTP 0,4 mM, Cy3CdCTP 4μM, 0,4μM del cebador universal, 0,04U/μl de fragmento Klenow de la ADN polimerasa exo a 37 °C durante 60 minutos. En el experimento de control (panel izquierdo), la micromatriz barajada 21 no recibió tratamiento enzimático. El panel central muestra la micromatriz barajada 22 que recibió 0,5μl de Surveyor™ por 20 μl de volumen de reacción. El panel derecho es la micromatriz barajada 23 que recibió 1,5 μl de Surveyor™ por 20 μl de volumen de reacción. 24, 25, y 16 son una representación esquemática de la micromatriz barajada 21, 22, y 23, respectivamente.
- 20 La imagen de la micromatriz barajada 21 es la más brillante, lo que sugiere que la mayor cantidad de pigmento Cy3 permaneció en la micromatriz barajada 21 de 22 y 23. Esto se fundamenta además en la medición directa de la intensidad de la señal de Cy3 en la micromatriz barajada 21, 22 y 23. Con referencia a la figura 3, los números de referencia 31, 32, y 33 corresponden a la intensidad media de la mancha de la micromatriz barajada 21, 22, y 23, respectivamente. Por lo tanto, el tratamiento Surveyor™ eliminó de forma efectiva los dúplex que contienen apareamientos erróneos, lo que resulta en una cantidad menor de señales Cy3.
- 25

Ejemplo 2: Producción de oligonucleótidos de alta fidelidad utilizando la escisión Surveyor™

- 30 El flujo molecular de reacción, el flujo de proceso, y el flujo de reactivo de ejemplo para la producción de oligonucleótidos de alta fidelidad utilizando la escisión Surveyor™ se muestran en la Figura 4. Se usaron siete (7) etapas en este ejemplo.

- 35 Etapa 1: Prehibridación en el chip. La micromatriz se prehibridó con 0,005 % de Triton X-100, 0,2 mg/ml de seroalbúmina bovina acitilada, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM, ditiotreitól (DTT) 7,5 mM a 37 °C durante 30 minutos.
- Etapa 2: Extensión del cebador. Las cadenas complementarias en el chip se sintetizaron en 0,005 de Triton X-100, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), MgCl₂ 5 mM, ditiotreitól (DTT) 7,5 mM, dNTP 0,4 mM, cebador universal 0,4 μM, 0,04U/μl de fragmento Klenow ADN polimerasa exo- a 37 °C durante 60 minutos.
- 40 Etapa 3: Lavado Hybe Surveyor™. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron con NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 60 mM y 0,005 % de Triton X-100. El Chip se lavó en tampón Surveyor™ Hybe tres veces a temperatura ambiente.
- Etapa 4: Lavado de reacción con Surveyor™. El chip se lavó en tampón de reacción Surveyor™ tres veces a temperatura ambiente. Composición del tampón de reacción surveyor™: Tris-HCl 20mM (pH 7,4), MgCl₂ 10mM y KCl 25mM.
- 45 Etapa 5: Barajado. El chip se calentó a 94 °C en un tampón de reacción Surveyor™ durante 3 minutos para la fusión del ADN, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos para la formación de heterodúplex.
- Etapa 6: Tratamiento con Surveyor™. El tampón de reacción Surveyor™ de la etapa 5 se retiró y el chip se trató con Surveyor™/potenciador en Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), MgCl₂ 10 mM y KCl 25 mM y se incubó a 42 °C durante 20 minutos. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de Surveyor™/potenciador. 1). 0,5 μl/20 μl de reacción y 1,5 μl /20 μl de reacción. Surveyor™ y el potenciador se utilizaron en volúmenes iguales.
- 50 Etapa 7: Surveyor™ tras lavado de reacción. El chip se lavó con NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 60 mM, 0,005 % de Triton X-100 y EDTA 6 mM tres veces a temperatura ambiente para eliminar los heterodúplex propensos a errores escindidos.

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir oligonucleótidos de alta fidelidad en un soporte sólido, comprendiendo el método:

- 5 a) exponer una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios unidos al soporte que comprenden una secuencia predefinida a una enzima polimerasa en condiciones adecuadas para una reacción de síntesis dependiente de molde, con lo que para producir una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios, cada uno de los cuales comprende un oligonucleótido unido a soporte y un oligonucleótido complementario sintetizado;
- 10 b) desnaturalizar la pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios de manera que los oligonucleótidos sintetizados se liberan en una solución desde los oligonucleótidos unidos al soporte;
- c) renaturalizar los oligonucleótidos sintetizados a los oligonucleótidos unidos al soporte, con lo que se producen oligonucleótidos bicatenarios renaturalizados; y
- 15 d) exponer los oligonucleótidos bicatenarios renaturalizados a un componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos en condiciones adecuadas para la escisión de oligonucleótidos bicatenarios renaturalizados que contienen un apareamiento erróneo.

2. Un método para producir oligonucleótidos de alta fidelidad en un soporte sólido, comprendiendo el método:

- 20 a) sintetizar una primera pluralidad de oligonucleótidos en una reacción de extensión de la cadena usando, como molde, una segunda pluralidad de oligonucleótidos, en donde la segunda pluralidad de oligonucleótidos están inmovilizados sobre un soporte sólido y comprenden oligonucleótidos libres de errores y, opcionalmente, uno o más oligonucleótidos que contienen errores, en donde la reacción de extensión de la cadena produce una primera pluralidad de dúplex;
- 25 b) desnaturalizar la primera pluralidad de dúplex para liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de la segunda pluralidad de oligonucleótidos;
- c) poner en contacto la primera pluralidad de oligonucleótidos con la segunda pluralidad de oligonucleótidos en condiciones de hibridación para formar una segunda pluralidad de dúplex, en donde, cuando la segunda pluralidad de oligonucleótidos comprende uno o más oligonucleótidos que contienen errores que tienen una posición que contiene errores, la segunda pluralidad de dúplex comprende un heterodúplex que contiene
- 30 apareamientos erróneos;
- d) escindir al menos una parte del heterodúplex que contiene apareamientos erróneos mediante un componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos, produciendo de este modo oligonucleótidos bicatenarios de alta fidelidad; y
- 35 e) opcionalmente desnaturalizar de forma selectiva los oligonucleótidos bicatenarios de alta fidelidad.

3. Un método de ensamblaje de polímeros de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

- a) producir dos o más conjuntos de oligonucleótidos bicatenarios de alta fidelidad de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
- 40 b) desnaturalizar conjuntos deseables de oligonucleótidos de alta fidelidad, liberando de este modo los oligonucleótidos de cadena simple de alta fidelidad en una solución;
- c) combinar los conjuntos deseables de oligonucleótidos de cadena simple de alta fidelidad en un volumen de reacción; y
- 45 d) someter el volumen de reacción a condiciones adecuadas para una o más de hibridación, ligadura y extensión de la cadena.

4. El método de la reivindicación 2, en el que la segunda pluralidad de oligonucleótidos se sintetizan químicamente sobre el soporte sólido y se inmovilizan dentro de una o más características en el soporte sólido.

50 5. El método de la reivindicación 2, en el que la segunda pluralidad de oligonucleótidos están unidos a dos o más características en el soporte sólido y en el que después de la etapa b), uno o más de la primera pluralidad de oligonucleótidos se difunden lejos de un punto de unión.

55 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que el componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos comprende una endonucleasa de apareamientos erróneos.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que el componente de reconocimiento y escisión de apareamientos erróneos realiza escisión química.

60 8. Un método para producir al menos un oligonucleótido que tiene una secuencia predefinida sobre un soporte sólido, comprendiendo el método:

- a) sintetizar sobre un soporte sólido una primera pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios utilizando, como molde, una segunda pluralidad de oligonucleótidos;
- 65 b) liberar la primera pluralidad de oligonucleótidos de la segunda pluralidad de oligonucleótidos dentro de un microvolumen aislado;

- c) poner en contacto la segunda pluralidad de oligonucleótidos con la primera pluralidad de oligonucleótidos en condiciones de hibridación para formar una segunda pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios dentro del microvolumen aislado;
- 5 d) poner en contacto y escindir la segunda pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios con un agente de unión a apareamientos erróneos, en donde el agente de unión a apareamientos erróneos se une de forma selectiva y escinde los oligonucleótidos bicatenarios que comprenden un apareamiento erróneo; y
- e) eliminar los oligonucleótidos bicatenarios que comprenden el apareamiento erróneo, produciendo de este modo oligonucleótidos libres de errores.
- 10 9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente de unión a apareamientos erróneos es una endonucleasa específica de apareamiento erróneo y escinde en la región de apareamiento erróneo.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la endonucleasa específica de apareamientos erróneos es una enzima CEL.
- 15 11. El método de la reivindicación 8, en el que la etapa de liberación de la primera pluralidad de oligonucleótidos es en condiciones de desnaturalización.
- 20 12. El método de la reivindicación 8, en el que la segunda pluralidad de oligonucleótidos se une a una característica discreta del soporte sólido y en el que la característica se hidrata selectivamente, proporcionando de ese modo la segunda pluralidad de oligonucleótidos dentro del volumen aislado.
- 25 13. El método de la reivindicación 12, en el que la característica se hidrata selectivamente aplicando una solución que comprende una polimerasa, dNTP, una solución de estimulación de la extensión del cebador, al menos un cebador en donde el cebador es complementario a un sitio de unión del cebador en la segunda pluralidad de oligonucleótidos.
14. El método de la reivindicación 8, que libera además oligonucleótidos libres de errores en solución.
- 30 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8, en el que el soporte sólido es una micromatriz.
16. El método de la reivindicación 2, en el que el heterodúplex que contiene apareamientos erróneos se forma entre el oligonucleótido que contiene errores de la segunda pluralidad de oligonucleótidos y uno de los oligonucleótidos libres de errores de la primera pluralidad de oligonucleótidos.
- 35

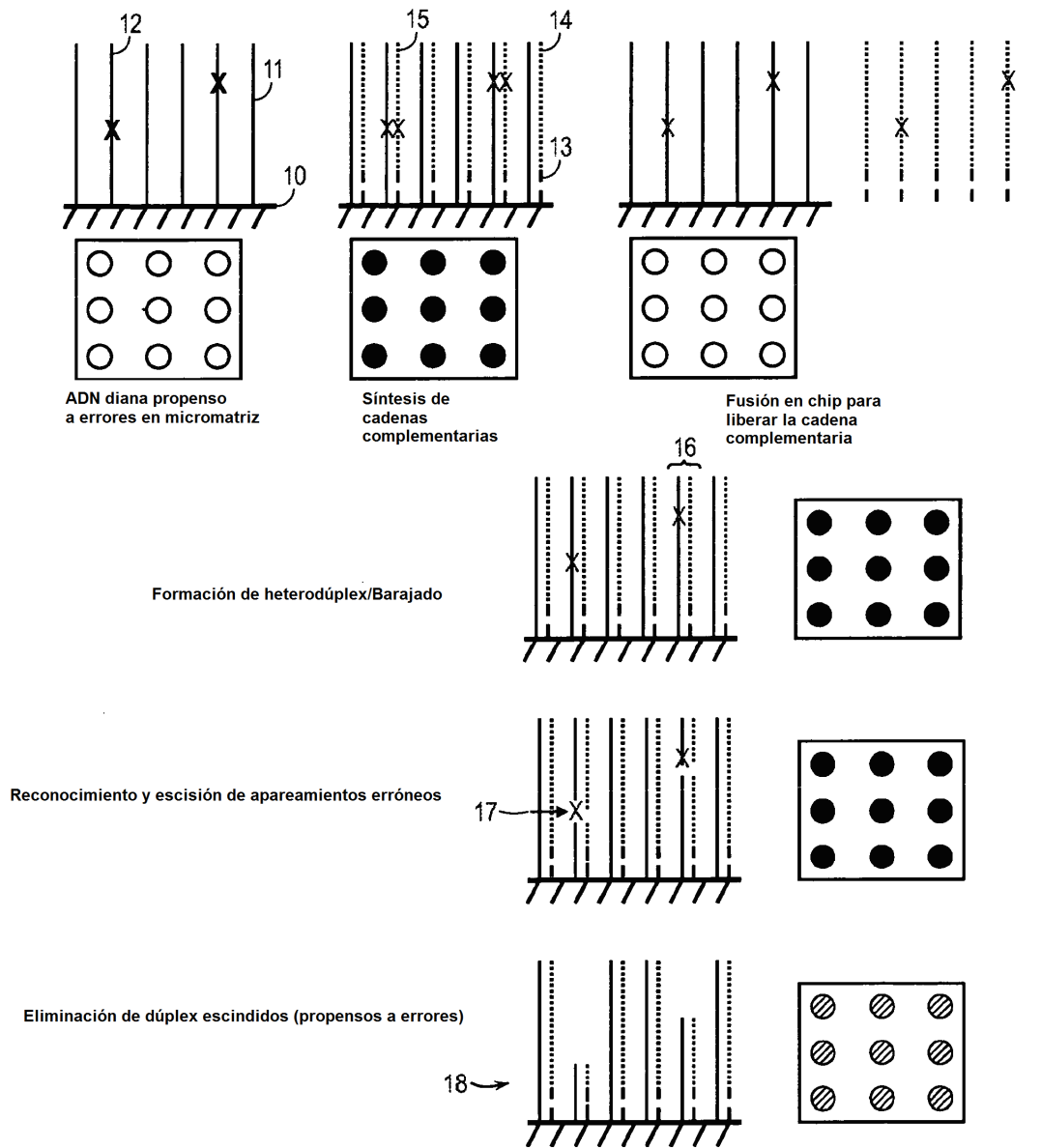


FIG. 1

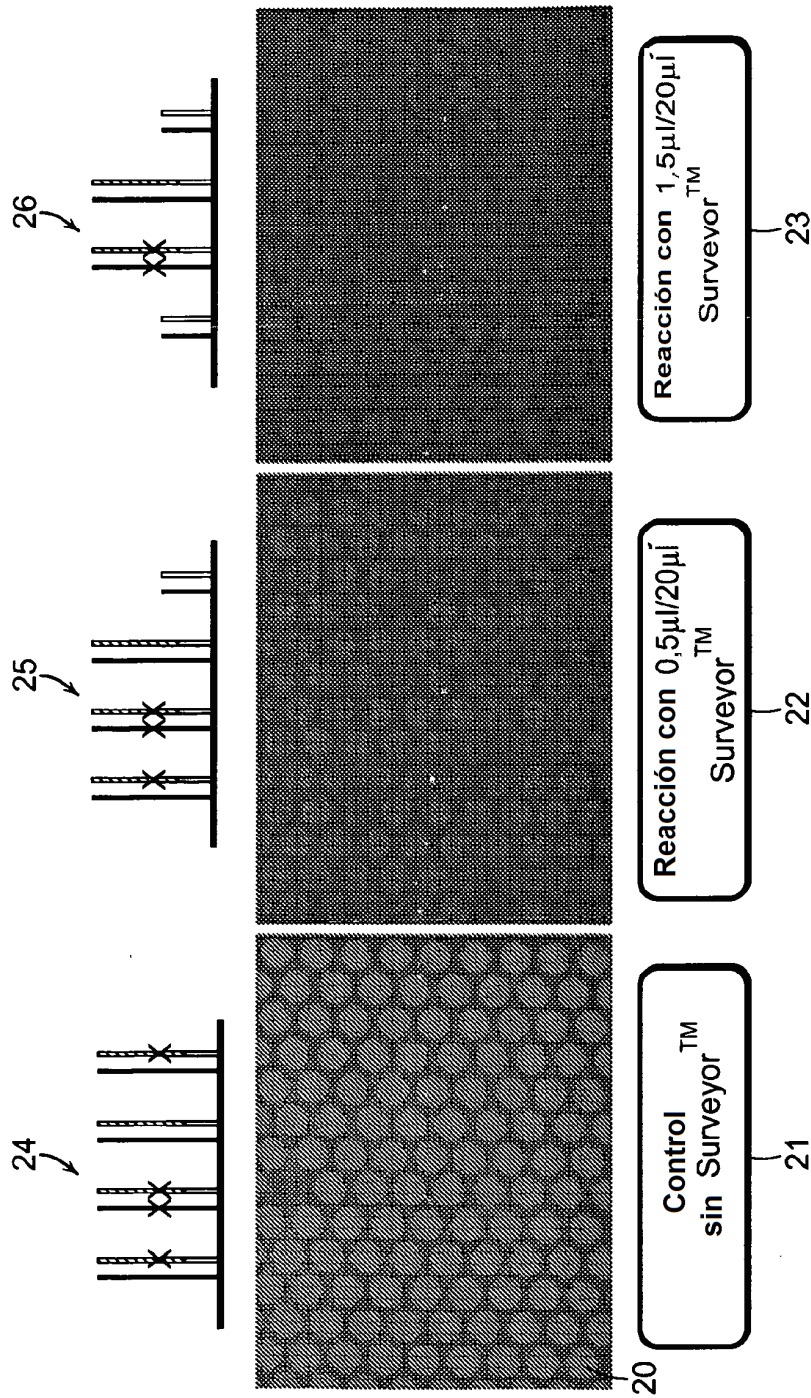


FIG. 2

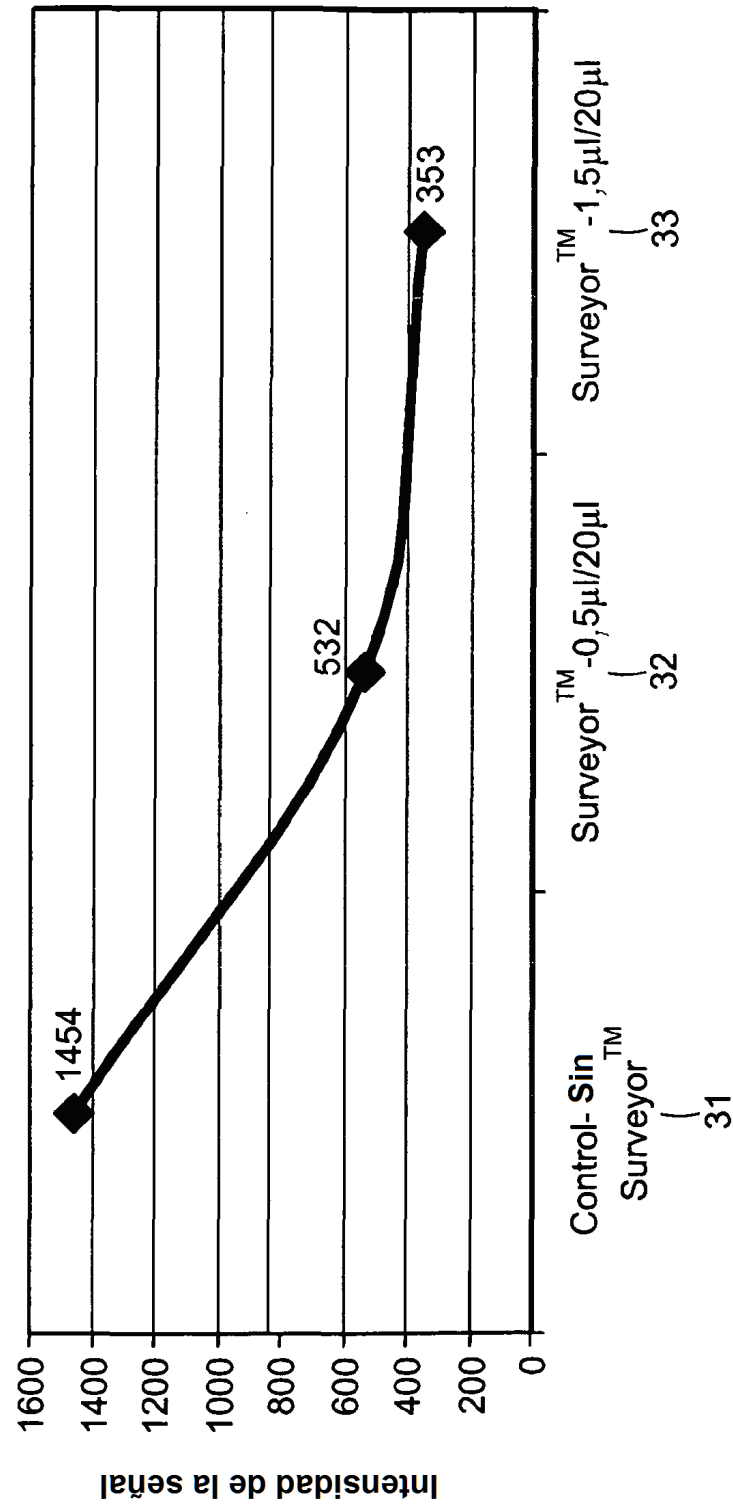


FIG. 3

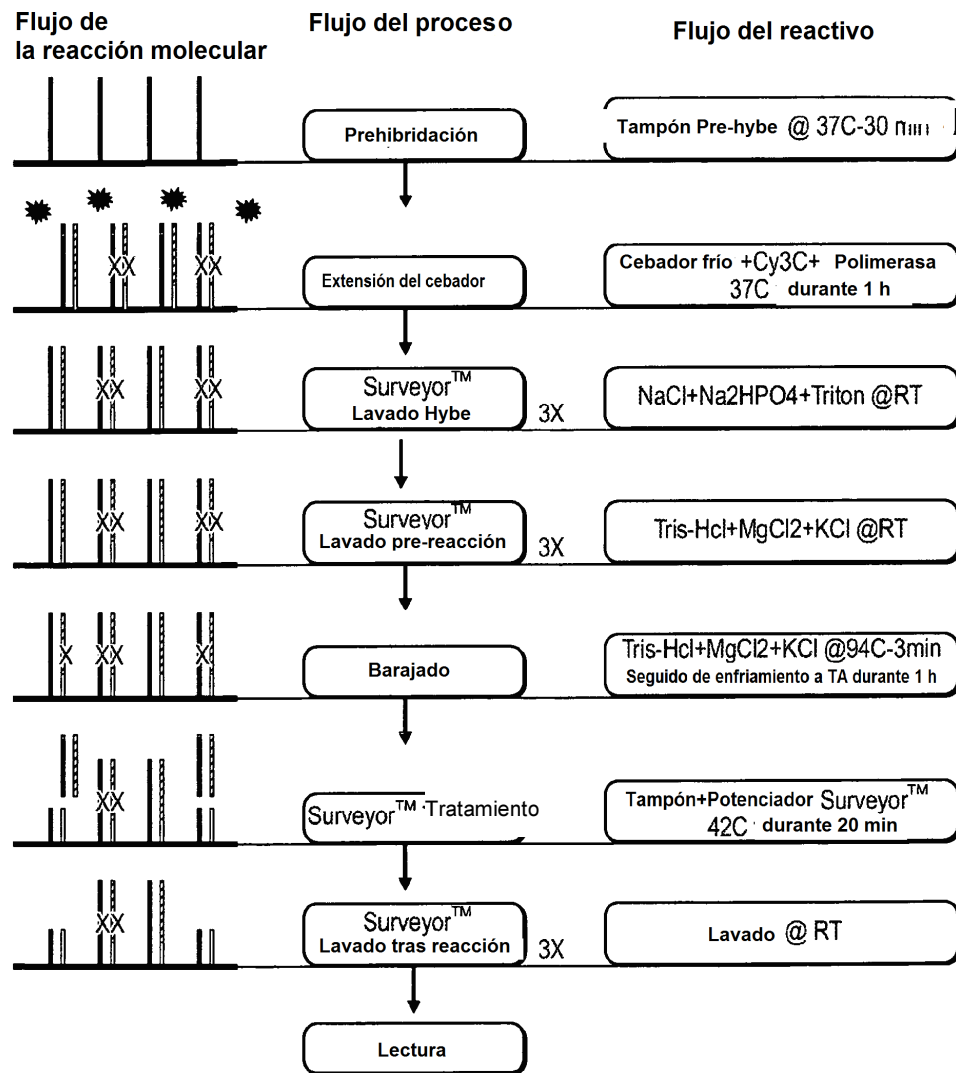


FIG. 4

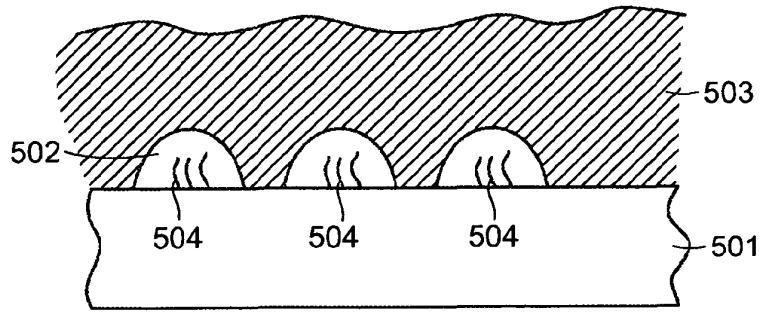


FIG. 5A

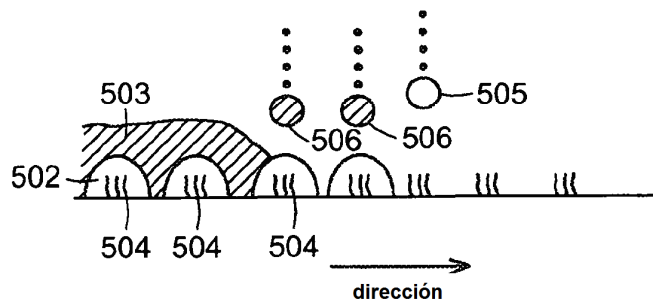


FIG. 5B

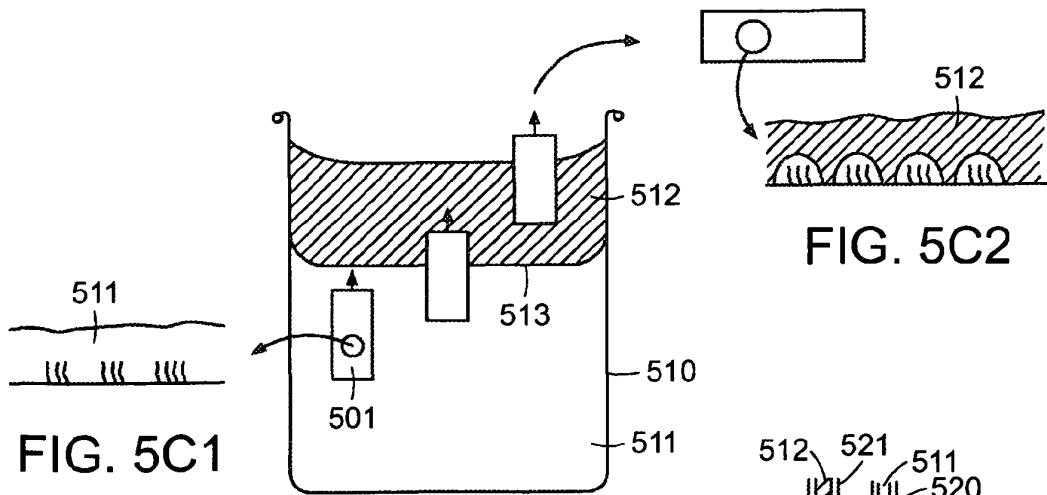


FIG. 5C1

FIG. 5C

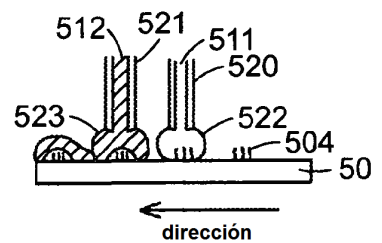
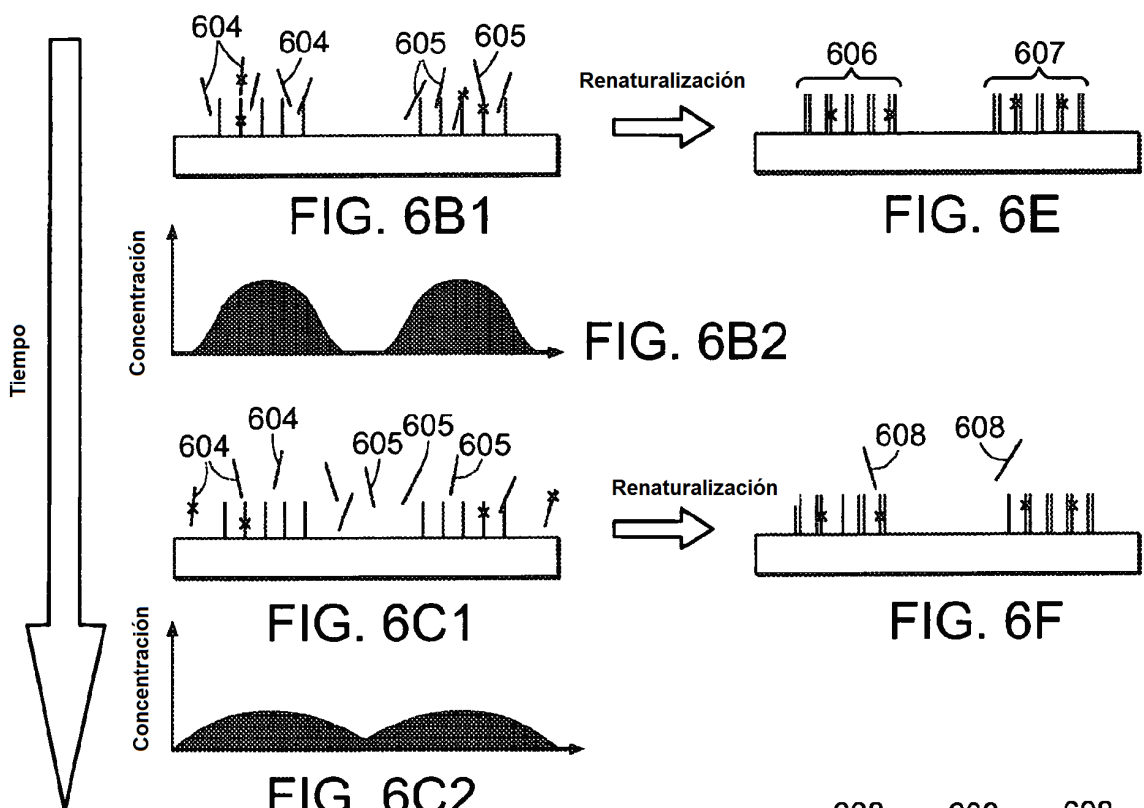
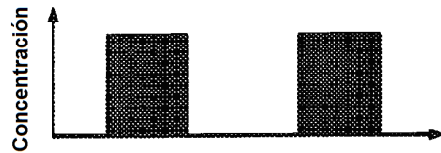
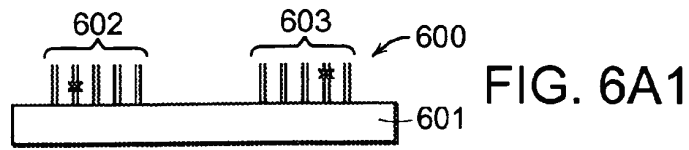


FIG. 5D



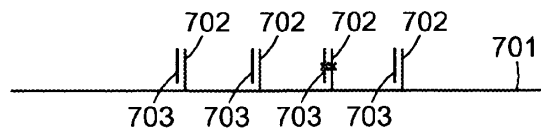


FIG. 7A

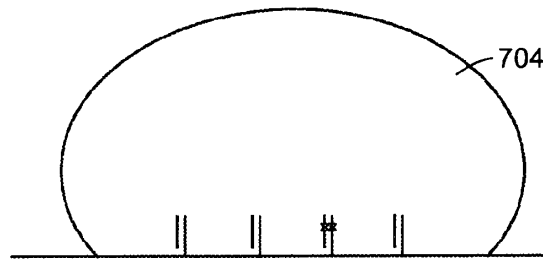


FIG. 7B

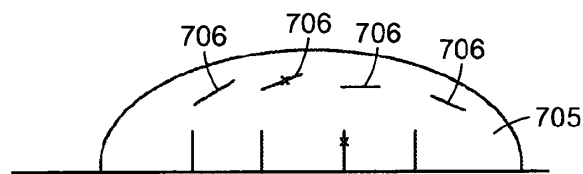


FIG. 7C

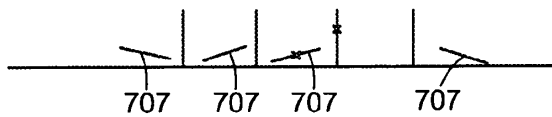


FIG. 7D

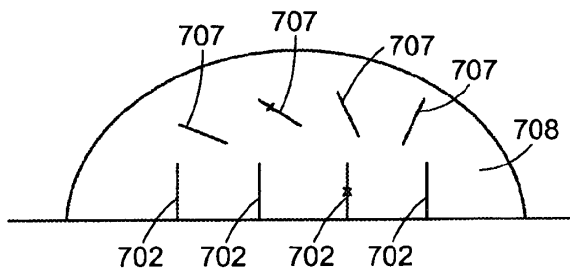


FIG. 7E