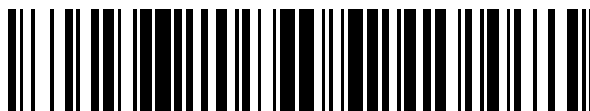


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 873**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2009 PCT/IB2009/006976**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10026488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09786280 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2321429**

54 Título: **Métodos y kits para la secuenciación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

03.09.2008 US 94025 P
03.09.2008 US 94006 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2016

73 Titular/es:

QUANTUMDX GROUP LIMITED (100.0%)
Lugano Building, 57 Melbourne Street
Newcastle upon Tyne, NE1 2JQ, GB

72 Inventor/es:

O'HALLORAN, JONATHAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 594 873 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 kits para la secuenciación de ácido nucleico

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere a métodos moleculares biológicos, equipamiento y reactivos para la secuenciación de moléculas de ácido nucleico diana (DNA, RNA, cDNA, etc) para permitir la secuenciación de nucleótidos tanto altamente en paralelo como de larga "longitud de lectura".

Descripción de la técnica relacionada

- 10 El DNA es un largo polímero que consiste en unidades llamadas nucleótidos. Los polímeros de DNA son largas cadenas de unidades individuales, que juntas forman moléculas llamadas ácidos nucleicos. Los nucleótidos pueden ser una de cuatro subunidades (adenina (A), citosina (C), guanina (G) & timina (T)) y, cuando están en un polímero, pueden llevar la información genética en la célula. El DNA comprende dos largas cadenas de nucleótidos que comprenden las cuatro bases de nucleótidos diferentes (p. ej. AGTCATCGTAGCT...etc) con un esqueleto de azúcares y grupos fosfato unidos mediante enlaces éster, girados en una doble hélice y unidos mediante puentes de hidrógeno entre los nucleótidos complementarios (A se une por puente hidrógeno con T y C con G en la cadena opuesta). La secuencia de bases de nucleótidos a lo largo del esqueleto puede determinar las características hereditarias individuales.

- 15 El dogma central de la biología molecular generalmente describe el flujo normal de la información biológica: el DNA se puede replicar a DNA, la información genética en el DNA se puede "transcribir" en mRNA, y se puede traducir a proteínas a partir de la información en el mRNA, en un proceso llamado "traducción", en el cual las subunidades de proteína (aminoácidos) se acercan lo suficiente para unirse, en orden (según dicta la secuencia de mRNA y por lo tanto el DNA) mediante la unión del tRNA (cada tRNA lleva un aminoácido específico dependiente de su secuencia) al mRNA.

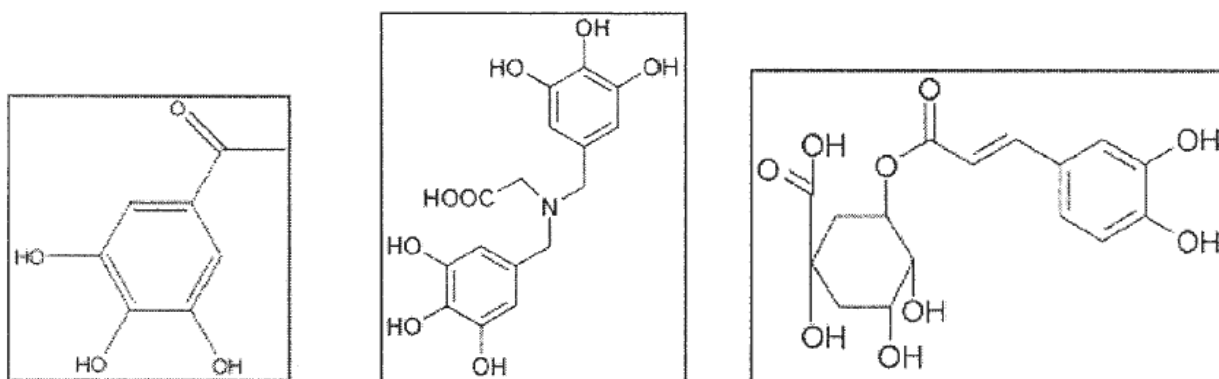
Compendio de la invención

- 25 Se describe un método de secuenciación de un polinucleótido diana según las realizaciones de la presente invención. El método comprende: proporcionar dentro de una región de ensayo una nanoestructura sensible de detección que genere una señal relacionada con una propiedad de la nanoestructura dentro de la región de ensayo, en donde la nanoestructura está acoplada a un medio para detectar la señal; hibridar dentro de la región de ensayo un iniciador con la región del extremo 5' terminal del polinucleótido diana, de tal manera que el polinucleótido diana iniciador resultante está acoplado de manera operativa a la nanoestructura; añadir uno o más nucleótidos y una polimerasa al polinucleótido diana iniciador dentro de la región de ensayo en condiciones que favorezcan la polimerización de una cadena naciente cuando al menos uno de los nucleótidos añadidos es complementario a la base en el polinucleótido diana corriente abajo del iniciador; y detectar dentro de la región de ensayo un cambio en la señal que sea característica de al menos un nucleótido añadido a la cadena naciente.

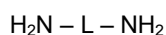
- 35 En realizaciones preferidas del método, la propiedad de la nanoestructura es una carga eléctrica.

- 40 En ciertas realizaciones del método, el nucleótido añadido comprende además una fracción indicadora de carga masa que comprende una porción de masa de alta carga y un enlazador. En algunas realizaciones, la fracción indicadora de carga masa se elimina del nucleótido añadido después de detectar la señal. En algunas otras realizaciones, la fracción indicadora de carga masa se configura para que no afecte a la polimerización de la cadena naciente por la polimerasa. En aún otras realizaciones, la fracción indicadora de carga masa se configura para sobresalir hacia fuera de la cadena naciente con el fin de prolongarse hasta la nanoestructura sensible de detección.

- 45 En algunas realizaciones, la fracción de alta carga masa comprende un esqueleto aromático y/o alifático que comprende uno o más grupos amino terciarios, un grupo alcohol hidroxilo, un grupo hidroxyfenólico, o cualquier combinación de los mismos. La fracción de alta carga masa puede comprender uno o más de los siguientes grupos o derivados de los mismos:



En ciertas realizaciones del método, el enlazador comprende una molécula de la siguiente fórmula general:



- 5 en donde L comprende una cadena lineal o ramificada que comprende un grupo alquilo, un grupo oxialquilo, o una combinación de los mismos.
- En algunas realizaciones, L puede comprender una cadena lineal que comprende un grupo alquilo, un grupo oxialquilo, o una combinación de los mismos. El número de átomos de carbono en la cadena lineal puede ser de 1 a 100.
- 10 En algunas realizaciones, el nucleótido añadido puede también comprender una molécula cap escindible en el fosfato 5' de modo que se evita la adición de otro nucleótido hasta que se elimina la cap escindible. En algunas otras realizaciones, el enlazador se puede unir al grupo fosfato 5' del nucleótido añadido, actuando así como una cap.
- En variaciones del método, se puede añadir más de un nucleótido a la región de ensayo, pero no se añade un siguiente nucleótido a la cadena naciente hasta después de detectar la señal que es característica del nucleótido precedente añadido.
- 15 En algunas realizaciones, el acoplamiento a practicar entre el polinucleótido diana iniciador y la nanoestructura comprende la inmovilización del iniciador a una nanoestructura sensible de detección. En otras realizaciones, el acoplamiento a practicar entre el polinucleótido diana iniciador y la nanoestructura comprende la inmovilización del polinucleótido diana a la nanoestructura sensible de detección.
- 20 En ciertas realizaciones, la hibridación del iniciador a la región extremo 5' del polinucleótido diana comprende la hibridación del iniciador con un oligonucleótido que ha sido ligado al extremo 5' del polinucleótido diana.
- En ciertas realizaciones, la nanoestructura sensible de detección se selecciona de un grupo que consiste en un nanoalambre, un nanotubo, un nanoespacio, una nanopera, un nanoporo, un biosensor transistor de efecto de campo tipo-FET, un transistor de efecto de campo planar, y cualquier estructura conductora.
- 25 El polinucleótido diana y el iniciador comprenden preferiblemente moléculas seleccionadas del grupo que consiste en DNA, RNA, ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicol (GNA), ácido nucleico treosa (TNA), polímero sintético de nucleótidos, y derivados de los mismos. El nucleótido añadido comprende preferiblemente una molécula seleccionada del grupo que consiste en un desoxirribonucleótido, un ribonucleótido, un nucleótido peptídico, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un nucleótido glicol, un nucleótido treosa, un nucleótido sintético, y derivados de los mismos.
- 30 En algunas realizaciones, los medios para detectar la señal se seleccionan del grupo que consiste en detección piezoeléctrica, detección electroquímica, detección electromagnética, fotodetección, detección mecánica, detección acústica y detección gravimétrica.
- Se describe en la presente invención un aparato para secuenciar un polinucleótido diana según otras realizaciones. El aparato comprende: una región de ensayo que comprende una nanoestructura sensible de detección capaz de
- 35 generar una señal relacionada con la carga eléctrica de la nanoestructura, y un medio de detección de la señal acoplado a la nanoestructura sensible de detección. En algunas realizaciones, el aparato puede comprender además un canal pico-pocillo o de microfluidos, dispuesto con las nanoestructuras sensibles de detección, en donde la muestra biológica comprende cualquier fluido corporal, células y sus extractos, tejidos y sus extractos, y cualquier otra muestra biológica que comprende nucleótidos. En algunas otras realizaciones, el aparato puede comprender un casete de microfluidos. El casete de microfluidos puede comprender un elemento de recepción de muestra para
- 40 introducir una muestra biológica que comprende el polinucleótido diana dentro del casete; una cámara de lisis para

desorganizar la muestra biológica para liberar una fracción soluble que comprende ácidos nucleicos y otras moléculas; una cámara de separación de ácido nucleico para separar los ácidos nucleicos de las otras moléculas en la fracción soluble; una cámara de amplificación para amplificar el polinucleótido diana; una región de ensayo que comprende una disposición de una o más nanoestructuras sensibles de detección, en donde la región de ensayo se configura para permitir el acoplamiento operativo del polinucleótido diana a las nanoestructuras; y un elemento conductor para conducir la señal al detector. En algunos ejemplos, el aparato se puede usar para la muestra biológica, que puede ser cualquier fluido corporal, células y sus extractos, tejidos y sus extractos, y cualquier otra muestra biológica que comprende el polinucleótido diana. El aparato para secuenciar descrito en algunas realizaciones en esta memoria puede ser dimensionado y configurado para ser portátil.

10 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 A y B son representaciones de una realización ilustrativa de inmovilización de una secuencia sonda y una medida de un DNA diana.

La Figura 2 es una representación de una realización ilustrativa de alguna parte de la secuenciación mediante reacción de síntesis.

15 La Figura 3 es una representación de una realización ilustrativa de la adición de una base de nucleótido sintético a la cadena naciente.

La Figura 4 proporciona una ilustración de algunas realizaciones de la escisión del enlazador y la fracción indicadora de alta carga masa ligada al nucleótido.

20 La Figura 5 ilustra una representación de los posibles resultados de las medidas de las nanoestructuras sensibles de detección en algunas realizaciones.

La Figura 6 ilustra un ejemplo de un complejo polimerasa.

La Figura 7 ilustra un ejemplo de casete de microfluidos diseñado para secuenciación portátil en algunas realizaciones.

Descripción detallada de la realización preferida

25 El término secuenciación de nucleótidos engloba generalmente métodos para determinar el orden de las bases de nucleótidos, adenina, guanina, citosina y timina, en moléculas de DNA o RNA. La secuencia de DNA constituye la información genética heredable en genomas, plásmidos, mitocondria, y cloroplastos que forman la base de los programas de desarrollo de organismos vivos. Las variaciones genéticas pueden causar enfermedad, o conferir un aumento del riesgo de enfermedad (aunque también es cierto que ciertas variaciones genéticas confieren rasgos beneficiosos). Estas variaciones se pueden heredar (transmitidas por los padres) o adquirir (desarrolladas como adulto). Es por lo tanto de significativa importancia conocer la secuencia de estas moléculas genéticas para obtener una mejor comprensión de la vida, sistemas moleculares y la enfermedad.

30 El aparición de la secuenciación de DNA ha acelerado significativamente la investigación y el descubrimiento biológicos. La rápida velocidad de secuenciación accesible con la tecnología de secuenciación de DNA moderna ha sido fundamental en la secuenciación a gran escala del genoma humano, en el Proyecto Genoma Humano. Proyectos relacionados han generado las secuencias completas de DNA de muchos genomas animales, de plantas, virales y microbianos.

35 La secuenciación de RNA, que por razones técnicas es más fácil de realizar que la secuenciación de DNA, fue una de las primeras formas de secuenciación de nucleótidos. El principal punto emblemático de la secuenciación de RNA, que data de la era del DNA pre-recombinante, es la secuencia del primer gen completo y después del genoma completo del bacteriófago MS2, identificado y publicado por Walter Fiers y sus colaboradores en la Universidad de Gante (Gante, Bélgica), publicados entre 1972 y 1976.

40 El método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores en 1975 fue el primer método de secuenciación de DNA para ser empleado a gran escala. Anteriormente al desarrollo de métodos de secuenciación rápida de DNA a principios de 1970 por Sanger en Inglaterra y Walter Gilbert y Allan Maxam en Harvard, se usaron un número de laboriosos métodos. Por ejemplo, en 1973 Gilbert y Maxam comunicaron la secuencia de 24 pares de bases usando un método conocido como análisis de punto corrido.

45 En 1976-1977, Allan Maxam y Walter Gilbert desarrollaron un método de secuenciación de DNA basado en la modificación química del DNA y la escisión posterior a bases específicas. El método requiere marcaje radioactivo en un extremo de la cadena de DNA y la purificación del fragmento de DNA a ser secuenciado. En rupturas frecuentes se generan una y algunas veces dos de las cuatro bases de nucleótidos y esto se repite en cuatro reacciones (G, A+G, C, C+T). Esto produce una serie de fragmentos marcados, desde el extremo marcado al primer sitio de corte en cada molécula y se separan por tamaño mediante electroforesis en gel, con las cuatro reacciones dispuestas una al lado de la otra. La secuenciación de Maxam-Gilbert no se empezó a hacer de inmediato debido a su complejidad

técnica, a un uso amplio de productos peligrosos, y a dificultades con la ampliación. Además, el método no se puede personalizar fácilmente para usar en un kit estándar de biología molecular.

El método de terminación de la cadena o de Sanger requiere un molde de DNA de cadena sencilla, un DNA iniciador, una DNA polimerasa, nucleótidos marcados radioactiva o fluorescentemente, y nucleótidos modificados, dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs) que terminen la elongación de la cadena de DNA. La muestra de DNA se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas, que contienen los cuatro dideoxynucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y la DNA polimerasa. A cada reacción se añade solamente uno de los cuatro dideoxynucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP). Estos dideoxynucleótidos son los nucleótidos que terminan la cadena, que carecen del grupo 3'-OH requerido para la formación de un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos durante la elongación de la cadena de DNA. La incorporación de un dideoxynucleótido en la cadena de DNA naciente (que se está elongando) termina, por lo tanto, la extensión de la cadena de DNA, dando como resultado varios fragmentos de DNA de longitud variada. Los dideoxynucleótidos se añaden a concentración más baja que los dideoxynucleótidos estándar para permitir una elongación de la cadena suficiente para el análisis de secuencia.

Los fragmentos de DNA recién sintetizado y marcados se desnaturalizan por calor y se separan por tamaño (con una resolución de solo un nucleótido) mediante una electroforesis en gel en un gel de urea-poliacrilamida desnaturalizante. Cada una de las cuatro reacciones de síntesis de DNA se hacen migrar en una de las cuatro calles individuales (calles A, T, G, C); las bandas de DNA se visualizan entonces mediante autoradiografía o luz ultravioleta, y la secuencia de DNA se puede leer directamente a partir de la radiografía de rayos X o de la imagen del gel. En la imagen de la derecha, se expuso la placa de rayos X al gel y las bandas oscuras corresponden a los fragmentos de DNA de diferentes longitudes. Una banda oscura en una calle indica un fragmento de DNA que es el resultado de una terminación de cadena después de la incorporación de un dideoxynucleótido (ddATP, ddGTP, ddCTP, o ddTTP). La base de nucleótido terminal se puede identificar según qué dideoxynucleótido se añadió en la reacción que da esa banda. Las posiciones relativas de las diferentes bandas entre las cuatro calles se usan luego para leer (de abajo a arriba) la secuencia de DNA como se indica.

Los fragmentos de DNA se pueden marcar usando una etiqueta radioactiva o fluorescente sobre el indicador, en la nueva cadena de DNA con un dNTP marcado, o con un ddNTP marcado. Existen algunas variaciones técnicas de la secuenciación por terminación de cadena. En un método, los fragmentos de DNA son etiquetados con nucleótidos que contienen fósforo radioactivo para el radiomarcaje. Alternativamente, se usa para el etiquetado un iniciador marcado en el extremo 5' con tinte fluorescente. Se requieren aún cuatro reacciones separadas, pero se pueden leer los fragmentos de DNA con etiquetas de tinte usando un sistema óptico, que facilita un análisis y automatización más rápida y más económica. Esta aproximación se conoce como "secuenciación con iniciador de tinte". El desarrollo posterior por L Hood y colaboradores de ddNTPs e iniciadores marcados fluorescentemente sentaron las bases para la secuenciación de DNA automatizada y de alto rendimiento.

Los diferentes de métodos de terminación de la cadena han simplificado extremadamente la cantidad de trabajo y planificación que se necesitaba para la secuenciación de DNA. Por ejemplo, el kit "Sequenase" basado en la terminación de la cadena de USB Biochemicals contiene la mayoría de los reactivos que se necesitan para la secuenciación, pre-alicuatados y listos para usar. Pueden ocurrir algunos problemas de secuenciación con el método de Sanger, como la unión no específica del iniciador al DNA, que afecta a la lectura precisa de la secuencia de DNA. Además, las estructuras secundarias dentro del molde de DNA, o la iniciación aleatoria de RNA contaminante al DNA molde también pueden afectar a la fidelidad de la secuencia obtenida. Otros contaminantes que afectan a la reacción pueden consistir en DNA extraño o inhibidores de la DNA polimerasa.

Una alternativa al marcaje del iniciador es el marcaje de los terminadores de cadena, un método comúnmente llamado "secuenciación con terminador de tinte". Una de las mayores ventajas de este método es que la secuenciación se puede realizar en una única reacción, mejor que cuatro reacciones como en el método de iniciador marcado. En la secuenciación con terminador de tinte, cada uno de los cuatro dideoxynucleótidos terminadores de cadena está marcados con un tinte fluorescente diferente, cada uno con fluorescencia a distinta longitud de onda. Este método es atractivo debido a su mayor conveniencia y velocidad y es ahora el pilar de la secuenciación automatizada con analizadores de secuencia controlados por ordenador (advírtase abajo). Sus potenciales limitaciones incluyen efectos del tinte debido a diferencias en la incorporación de los terminadores de cadena marcados con tinte en el fragmento de DNA, dando como resultado alturas de pico y formas desiguales en el cromatograma electrónico trazado de la secuencia de DNA después de la electroforesis capilar. El método de terminador de tinte, junto con analizadores de secuencia de DNA automatizados de alto rendimiento se están usando ahora por la gran mayoría de los proyectos de secuenciación, ya que es a la vez más fácil de realizar y más bajo en costo que la mayoría de los métodos previos de secuenciación.

La secuenciación moderna con terminador de tinte o la de terminación de la cadena pueden generar una secuencia que puede tener pobre calidad en las primeras 15-40 bases, una región de alta calidad de 700-900 bases, y después un rápido deterioro de la calidad. Los instrumentos de secuenciación automatizada de DNA (secuenciadores de DNA) que manejan estos métodos pueden secuenciar hasta 384 muestras marcadas fluorescentemente en un único lote (carrera) y realizar tantas como 24 carreras al día. Sin embargo, los secuenciadores automatizados de DNA pueden llevar a cabo la separación de DNA solo en base al tamaño (mediante electroforesis capilar), detección y registro del tinte fluorescente, y la salida de datos como cromatogramas de trazo del pico fluorescente. Se puede

realizar por separado las reacciones de secuenciación por termociclado, limpiado y re-suspensión en una solución tampón antes de cargar en el secuenciador.

Las últimas tecnologías de secuenciación llamadas NextGen se basan en pirosecuenciación. Estos nuevos métodos de alto rendimiento usan métodos cuyos procesos de secuenciación discurren en paralelo, generando miles o millones de secuencias a un mismo tiempo.

Como los métodos de detección moleculares no son a menudo lo suficientemente sensibles para la secuenciación de una sola molécula, el método de Helicos puede ser una excepción, la mayoría de las aproximaciones usan una etapa de clonaje in vitro para generar muchas copias de cada molécula individual. La PCR de emulsión es un método, que aísla moléculas de DNA individuales junto con perlas recubiertas con iniciador en burbujas acuosas dentro de un fase oleosa. Una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) recubre entonces cada perla con copias clonales de la molécula aislada de la librería y estas perlas se inmovilizan posteriormente para posterior secuenciación. La PCR de emulsión se usa en los métodos publicados por Marguilis et al. (comercializada por 454 Life Sciences, adquirida por Roche), Shendure y Porreca et al. (también conocido como "secuenciación polony") y la secuenciación SOLiD, (desarrollada por Agencourt y adquirida por Applied Biosystems). Otro método para la amplificación clonal in vitro es la "PCR puente", donde los fragmentos se amplifican sobre iniciadores anclados a una superficie sólida, desarrollada y usada por Solexa (ahora propiedad de Illumina). Ambos métodos producen muchos lugares físicamente aislados que contienen cada uno muchas copias de un único fragmento. El método de molécula individual desarrollado por el laboratorio de Stephen Quake (comercializado más tarde por Helicos) omite esta etapa de amplificación, fijando directamente las moléculas de DNA a una superficie.

Una vez que las secuencias clonales de DNA son físicamente localizadas para separar posiciones en una superficie, se pueden usar diversos enfoques de secuenciación para determinar las secuencias de DNA de todas las localizaciones, en paralelo. La "secuenciación por síntesis", como la popular secuenciación por electroforesis de terminación de tinte, usa el proceso de síntesis de DNA por DNA polimerasa para identificar las bases presentes en la molécula de DNA complementaria. Los métodos reversibles con terminador (usados por Illumina y Helicos) usan versiones reversibles de los terminadores de tinte, que añaden un nucleótido de uno en uno, detectan la fluorescencia correspondiente a esa posición, quitando después el grupo de bloqueo para permitir la polimerización de otro nucleótido. La pirosecuenciación (usada por 454) también usa la polimerización de DNA para añadir nucleótidos, añadiendo un tipo de nucleótido de uno en uno, detectando y cuantificando luego el número de nucleótidos añadidos a una localización dada a través de la luz emitida por la liberación de los fosfatos unidos. La "secuenciación por ligación" es otro método enzimático de secuenciación, que usa una enzima DNA ligasa mejor que una polimerasa para identificar la secuencia diana. Usado en el método polony y en la tecnología SOLiD ofrecida por Applied Biosystems, este método usa un grupo de todos los oligonucleótidos posibles de una longitud fija, marcados según la posición secuenciada. Los oligonucleótidos se anillan y se ligan; la ligación preferencial por la DNA ligasa para las secuencias que se emparejan da como resultado una señal que corresponde a la secuencia complementaria a esa posición.

Otros métodos de secuenciación de DNA pueden tener ventajas en términos de eficiencia o exactitud. Como la secuenciación tradicional de terminador de tinte, están limitados a la secuenciación de fragmentos de DNA individuales aislados. La "secuenciación por hibridación" es un método no enzimático que usa un chip de DNA. En este método, un único grupo de DNA desconocido puede hibridar fuertemente con un punto dado en el chip, haciendo que se "encienda", entonces se infiere que esa secuencia existe dentro del DNA desconocido que está siendo secuenciado. Se puede también usar la espectrometría de masas para secuenciar moléculas de DNA; las reacciones convencionales de terminación de la cadena generan moléculas de DNA de diferentes longitudes y se puede entonces determinar la longitud de estos fragmentos por diferencias de masa entre ellos (mejor que usando la separación en gel).

Existen nuevas propuestas para la secuenciación de DNA, que están en desarrollo, pero aún no se han demostrado. Estas incluyen marcaje de la DNA polimerasa (Visigen), lectura de la secuencia como una cadena de DNA que transita a través de nanoporos, o uso de chips de nanosondas de vanguardia que se miden con una resolución sub-Angstrom sobre un ssDNA estirado e inmovilizado (Reveo), una técnica que usa detección de fotón único, marcaje fluorescente y electroforesis de DNA con detección que usa nanoestructuras plasmónicas (base4innovation), y técnicas basadas en microscopía, como microscopía AFM o electrónica que se usan para identificar las posiciones de nucleótidos individuales dentro de fragmentos largos de DNA mediante marcaje de nucleótido con elementos pesados (p. ej. halógenos) para la detección y registro visuales.

Con la excepción de métodos que usan mass spec, nanoporos y técnicas basadas en microscopía, varios métodos disponibles actualmente, o en desarrollo requieren generalmente el uso de equipos ópticos caros y software complejo. Además, mass spec, nanoporos y las técnicas basadas en microscopía pueden requerir equipos voluminosos que pueden limitar su despliegue y sin duda pueden dar lugar a costos. Varias realizaciones usadas en relación con la presente descripción miran hacia la secuenciación de moléculas potencialmente únicas, de longitud larga de lectura, altamente paralela, en un dispositivo portátil y económico que usa una secuenciación novedosa mediante técnica de síntesis.

La secuenciación del genoma humano y los estudios posteriores desde entonces han demostrado el gran valor en saber la secuencia del DNA de una persona. La información obtenida mediante el análisis de la secuencia del DNA genómico puede proporcionar información sobre el riesgo relativo de un individuo de desarrollar ciertas enfermedades (como, cáncer de mama y los genes BRCA 1&2). Además, el análisis de DNA de tumores puede proporcionar información sobre el estadio y el grado.

Enfermedades infecciosas, como aquellas causadas por virus o bacterias llevan también información genética en los genomas de polímeros de nucleótidos (ya sea DNA o RNA). Muchos de estos se han secuenciado ahora, (o secuenciado bastante de su genoma para permitir que se genere una prueba de diagnóstico) y el análisis de los genomas de la enfermedad infecciosa de muestras clínicas (un campo llamado diagnóstico molecular) se ha convertido en uno de los métodos importantes de diagnosticar la enfermedad de forma sensible y específica.

Las medidas de la presencia o ausencia, así como de la abundancia de especies de mRNA en muestras puede proporcionar información sobre el estado de salud de individuos, el estadio de la enfermedad, pronóstico e información farmacogenética y farmacogenómica. Estos chips de expresión se están convirtiendo rápidamente en herramientas en la lucha frente a enfermedades complejas y pueden ganar en popularidad a medida que los precios comiencen a bajar.

En síntesis, el análisis de polímeros de nucleótidos (DNA & RNA) ha llegado a ser importante en la rutina clínica, sin embargo, el coste sigue siendo una barrera para la adopción global generalizada. Una razón para esto es la complejidad de los análisis que requieren dispositivos caros que son capaces de medir de modo sensible hasta cuatro canales de fluorescencia diferentes según progresa la RT-PCR. Las alternativas más baratas pueden requerir técnicos expertos en la técnica para ejecutar e interpretar equipos de baja tecnología, como geles de electroforesis, aunque esto y la falta de técnicos expertos en la técnica puede ser caro y es prohibitiva en países en desarrollo.

Para solucionar esto, se puede necesitar un método de análisis de polímeros de nucleótidos que pueda requerir dispositivos baratos y fáciles de usar. Algunas realizaciones de la presente descripción describen reactivos químicos, nucleótidos sintéticos, que pueden ser generalmente utilizados en tales dispositivos. Varias realizaciones usadas en relación con la presente descripción describen nuevos nucleótidos sintéticos que comprenden al menos algunos nucleótidos estándar (o cualquier modificación, o isoformas), con una fracción indicadora de alta carga masa negativa unida a través de una molécula enlazadora (por ejemplo, unida al grupo fosfato 5'), con la longitud del enlazador de tal longitud que sobresalga del complejo de polimerasa durante la polimerización, con el fin de no causar un efecto perjudicial significativo sobre la acción de la polimerasa.

Los términos ácido nucleico u oligonucleótido o equivalentes gramaticales en esta memoria se refieren a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente juntos. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se indica a continuación, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener esqueletos alternos, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) y referencias en el mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzi et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; y Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), fosforotioato (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y Pat. E.E.U.U. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321, uniones O-metilfosforamidita (advírtase en Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y esqueletos y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (advírtase en Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365:566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; esqueletos no iónicos (Pat. E.E.U.U. N°s 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; *Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; capítulos 2 y 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y esqueletos no ribosa, incluyendo aquellos descritos en las Pat. E.E.U.U. N°s 5.235.033 y 5.034.506, y capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook. También se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (advírtase en Jenkins et al. (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, *C & E News Jun. 2, 1997* página 35. Se pueden hacer estas modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato para facilitar la adición de fracciones adicionales como etiquetas, o para aumentar la estabilidad y la vida media de tales moléculas en ambientes fisiológicos.

Como se usa en varias realizaciones en esta memoria, un nucleótido puede ser, pero no se limita a, uno de los siguientes compuestos, Adenina, Guanina, Citosina, Timina, Uracilo e Inosina así como cualquier nucleótido modificado, cualquier derivado de nucleótido y cualquier base de nucleótido degenerada.

Algunos ejemplos no limitantes de tales nucleótidos pueden comprender un desoxiribonucleótido, un ribonucleótido, un nucleótido peptídico, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un nucleótido glicol, un nucleótido treosa, cualquier nucleótido sintético, cualquier isoforma de los mismos, y cualquier derivado de los mismos. Además, el ácido

desoxirribosa nucleico de cadena sencilla (ssDNA) puede ser generalmente una molécula de polímero de nucleótidos de cadena sencilla, que comprende nucleótidos y ácido desoxirribosa nucleico de doble cadena (dsDNA) puede ser generalmente una doble cadena que comprende dos moléculas de ssDNA unidas juntas a través, por ejemplo, de uniones de hidrógeno, en una orientación inversa complementaria.

5 Los nucleótidos generalmente se pueden sintetizar a través de una variedad de métodos tanto in vitro como in vivo. Esto puede implicar síntesis de salvamento (la reutilización de partes de nucleótidos para re-sintetizar nuevos nucleótidos a través de reacciones de ruptura y de síntesis con el fin de intercambiar partes útiles), o el uso de grupos protectores en un laboratorio. En el último caso, se puede proteger un nucleósido o nucleobase purificado para crear una fosforamidita, y se puede usar para obtener análogos no presentes en la naturaleza y/o crear un oligonucleótido.

10 En algunas realizaciones, la síntesis de nucleótidos comprende la formación de un nucleósido (la base nitrogenada unida a un azúcar). El azúcar involucrado en la síntesis y estructura de un nucleótido puede ser o bien ribosa o bien deoxyribosa; en el último caso, el prefijo "deoxy" se puede añadir antes del nombre del nucleósido en todos los casos excepto Uracilo. Luego se puede esterificar un grupo de fosfato funcional a un azúcar, creando un nucleótido. El grupo fosfato puede comprender uno, dos, o tres fosfatos, que forman mono-fosfatos, di-fosfatos, o tri-fosfatos, respectivamente.

15 Algunas otras realizaciones de la presente descripción describen el diseño, síntesis y uso de nucleótidos sintéticos especiales que comprenden un nucleótido y una fracción indicadora, en el que la fracción indicadora no podrá actuar como una fracción bloqueante de la enzima polimerasa anclada a través de un enlazador.

20 En varias realizaciones, los nucleótidos sintéticos pueden tener al menos algunos de los siguientes aspectos:

1. Las fracciones indicadoras se presentan en base a carga masa, sin actividad enzimática, fluorescencia, etc. por lo que pueden ser generalmente más flexibles;
2. Cada nucleótido sintético puede llevar una carga masa diferente, aunque por simplicidad se puede usar inicialmente la misma carga masa para prueba del principio;
- 25 3. Las fracciones indicadoras pueden ser escindidas fácilmente; y/o
4. Los nucleótidos pueden ser baratos y sencillos de sintetizar en masa.

30 La única de las posibles posiciones disponibles para el anclaje de enlazadores y de las fracciones indicadoras, con el fin de no interferir con la polimerización o las uniones de hidrógeno entre las bases de nucleótidos cuando hibridan con su base complementaria en otro polímero de nucleótidos (es decir, cuando dos cadenas de DNA complementario inverso hibridan para formar una molécula de DNA de doble cadena), puede ser el enlace fosfato en el nucleótido.

Algunas otras realizaciones describen métodos de uso en los que el enlazador y la fracción indicadora se pueden escindir del nucleótido sintético de manera repetitiva tras la detección; uno de los posibles lugares para anclar el enlazador puede ser el extremo 5'-fosfato del enlace fosfato.

35 La naturaleza del enlace con el 5'-fosfato: Hay al menos dos opciones disponibles que pueden facilitar la síntesis en el 5'-fosfato terminal:

1. Tiofosfato; y/o
2. Fosforamidato.

El enlazador propuesto puede tener por lo tanto la siguiente estructura al menos en algunas realizaciones.

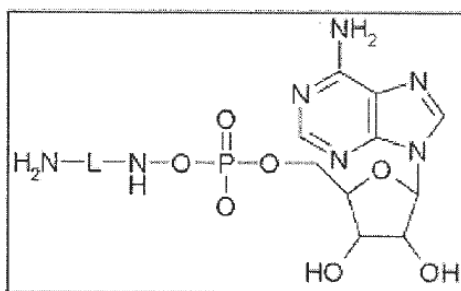


Donde, L puede ser, pero no se limita a, cualquier cadena molecular lineal o ramificada que se configura para enlazarse con un nucleótido así como a una fracción de alta carga masa, ambos de los cuales están presentes en un nucleótido sintético. En algunas realizaciones, L comprende una multitud con varias longitudes de un grupo alquilo, un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos. En una realización, el número de L de un grupo alquilo, un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos es de 1 a 100. En otra realización, el número de L de un grupo alquilo, un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos es de 1 a 75. En aún otra realización, el número de L de un grupo alquilo, de un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos es de 1 a 50. En una realización todavía, el número de L de un grupo alquilo, un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos es de 1 a 25. En algunas otras realizaciones, el número de L de un grupo alquilo, un grupo oxi alquilo o la combinación de los mismos puede ser más de 100. Mientras NH₂ se presenta con el propósito de ilustración, este NH₂ se puede sustituir con cualquier otro grupo funcional que se puede entrecruzar con un nucleótido o su derivado así como también a una fracción de alta carga masa, las cuales están presentes en un nucleótido sintético. Algunos ejemplos ilustrativos que se pueden usar en lugar de NH₂ incluyen, pero no se limitan a, cualquier grupo alquilo (p. ej. C_nH_{2n+1}, en donde n representa un

- 5 número entero positivo como 1, 2, 3, y etc.), cualquier grupo alcohol (p. ej. $C_nH_{2n}OH$, en donde n representa un número entero positivo como 1, 2, 3 y etc), cualquier grupo carboxilo (p. ej. $COOH$), cualquier grupo amida (p. ej. $CONH$), y derivados de los mismos. Como las moléculas enlazadoras pueden variar en longitud y en estructura química en parte para posibilitar a la fracción indicadora extenderse hacia fuera de un complejo nucleótido polimerasa (p. ej. DNA polimerasa, RNA polimerasa y otras) de modo que no se pueden influenciar por completo o parcialmente algunos aspectos de la polimerización.

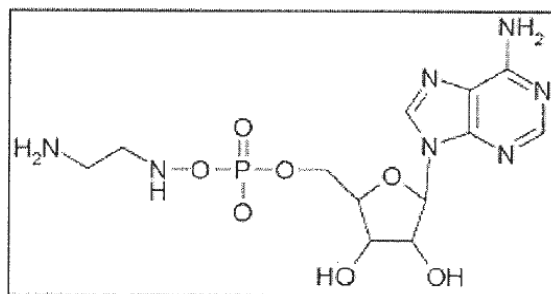
El fácil acceso a los enlazadores de varias longitudes se puede considerar como un beneficio en una situación donde la longitud deseada del enlazador puede no ser completa o parcialmente conocida. Esto puede hacer fácil la optimización de experimentos.

- 10 El enlazador con el nucleótido (dígase Adenosina como un ejemplo ilustrativo) puede tener por lo tanto la siguiente estructura al menos en algunas realizaciones. Mientras que la adenosina se presenta en algunos ejemplos a continuación, esta adenosina puede sustituirse con cualquier otro nucleótido natural o sintético, cualquier modificación del mismo y cualquier derivado del mismo en algunas otras realizaciones.

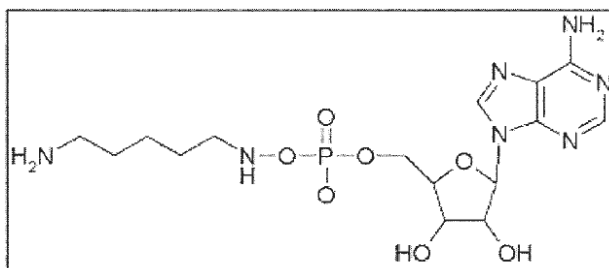


- 15 En algunas realizaciones, los enlazadores de varias longitudes en esta posición pueden tener las siguientes estructuras (ejemplificado con la Adenosina):

1. Etiléndiamina (2 enlaces de carbono de longitud de separación)

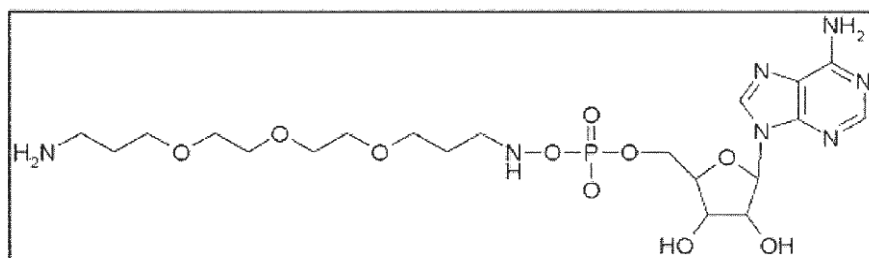


2. Pentanodiamina (5 enlaces de carbono de longitud de separación)



20

3. Longitud equivalente a 13 enlaces de carbono de longitud de separación



Así, en algunas realizaciones, los enlazadores así seleccionados pueden ser:

1. Fácilmente disponibles;
2. Fáciles de enlazar y escindir (por favor consulte los siguientes protocolos probables más adelante); y/o
- 5 3. Que no interactúen con la polimerasa y la cadena de ácido polinucleico y/o que no afecten a la polimerización de nucleótidos y al crecimiento del polímero de nucleótidos naciente.

La fracción indicadora: En algunas realizaciones, las fracciones indicadoras se pueden asociar con las otras propiedades como la naturaleza cromofórica para permitir la detección mediante detector de UV o visible o la naturaleza fluorescente que les hace ser detectados mediante detección fluorimétrica.

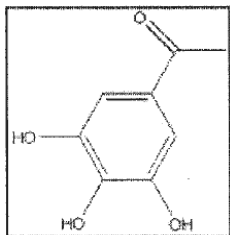
- 10 La carga en el indicador: ciertas realizaciones de la presente invención describen que la fracción indicadora lleva una gran carga masa. En una realización, la fracción indicadora puede introducir una mayor carga masa al nucleótido sintético que la carga masa del nucleótido o su derivado, que está presente en el nucleótido sintético. Sin embargo, en otra realización, la carga masa introducida por la fracción indicadora puede ser sustancialmente igual a o menor que la carga masa del nucleótido o de su derivado, que está presente en el nucleótido sintético. En esta especificación se proporcionan algunos ejemplos no limitantes e ilustrativos de una fracción indicadora. Solamente se proporcionan estos ejemplos con el fin de la ilustración y por lo tanto no se debe considerar que limita el alcance de la invención. La estructura química y/o dimensión (p. ej. longitud, tamaño, y masa de una molécula usada como una fracción indicadora) de una fracción indicadora no podrá restringirse en tanto que la fracción indicadora se configura para proporcionar una carga masa al nucleótido sintético y también para no afectar parcial o totalmente a la reacción de polimerización de nucleótidos.

- La carga en la fracción puede ser positiva o negativa. Tomando en consideración la naturaleza del enlace, a continuación se ofrecen algunos aspectos de la selección de carga que se puede posiblemente usar en algunas realizaciones de la presente descripción. En realizaciones preferidas, la carga es suficiente para causar un cambio detectable en una propiedad (p. ej., resistencia eléctrica) de una nanoestructura sensible de detección (p. ej., un nanoalambre) que está operativamente acoplado a la secuencia molde a la que se añade un nucleótido sintético que comprende la fracción indicadora, p. ej., durante la secuenciación por síntesis.

- 30 Carga positiva: En algunas realizaciones, se pueden inducir en general el gran número de cargas positivas en la fracción indicadora a través de la incorporación de grupos amino terciarios en el esqueleto aromático o alifático. En dichas realizaciones, estos grupos pueden adquirir las cargas positivas, uno por uno en el pH ácido (menos de 7), haciéndoles detectables.

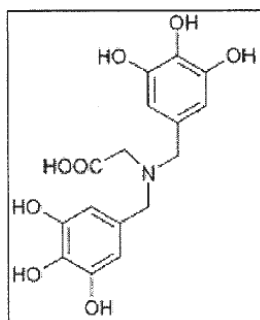
- 35 Cargas negativas: En algunas otras realizaciones, se pueden inducir en general las cargas negativas en la fracción indicadora a través de la incorporación de funcionalidades de alcohol hidroxilo y/o hidroxifenólicas en el esqueleto aromático o alifático. A continuación se presentan algunas de las fracciones indicadoras propuestas que cumplen el criterio arriba mencionado. Los fragmentos que se enumeran a continuación pueden estar disponibles y capaces de unirse al enlazador a través del amino terminal. La ventaja añadida puede ser que los reactivos que se proponen para la formación del enlace fosforamido pueden ser los mismos que para la formación del enlace amina (Por lo tanto reduciendo aún más los costes del sistema).

- 40 Además, al menos debido en parte a la estabilidad de este enlace a pH alcalino (superior a 7), el proceso de inducción de cargas negativas no sería de ninguna o de pequeña interferencia. Con el propósito de ilustración, se presentan los siguientes tres ejemplos no limitantes. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con el propósito de ilustración y por lo tanto no deben considerarse que limiten el alcance de la invención. De por sí, cualquier modificación sobre los siguientes ejemplos está ciertamente incluida en el alcance de la invención. Por ejemplo, se puede practicar cualquier sustitución de uno o más grupos (p. ej. -OH, =O, COOH, y otros) vinculados con los ejemplos. También puede estar permitida la oligomerización o polimerización de uno o más de los siguientes ejemplos. Además se puede usar como una fracción indicadora cualquier otra estructura química con varias dimensiones (p. ej. longitud, tamaño, y masa de la fracción indicadora) si dicha estructura química o molécula se configura para proporcionar una carga masa al nucleótido sintético y también no afectar parcial o totalmente a la reacción de polimerización de nucleótidos.



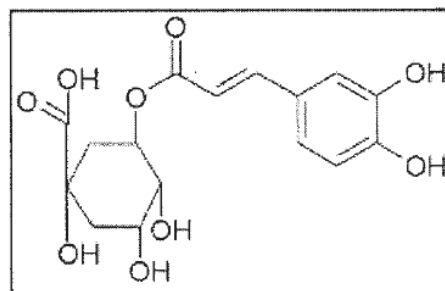
Indicador-1

Carga potencial -3



Indicador-2

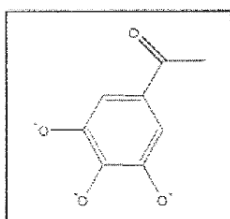
Carga potencial -6



Indicador-3

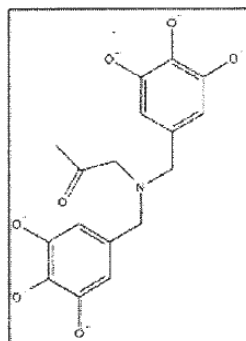
Carga potencial -5

Después de adquirir las cargas, en ciertas realizaciones algunos de los indicadores pueden existir como siguen,



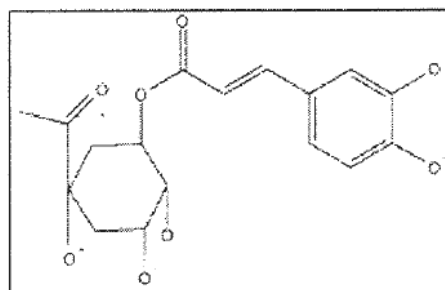
Indicador-1

Carga potencial -3



Indicador-2

Carga potencial -6



Indicador-3

Carga potencial -5

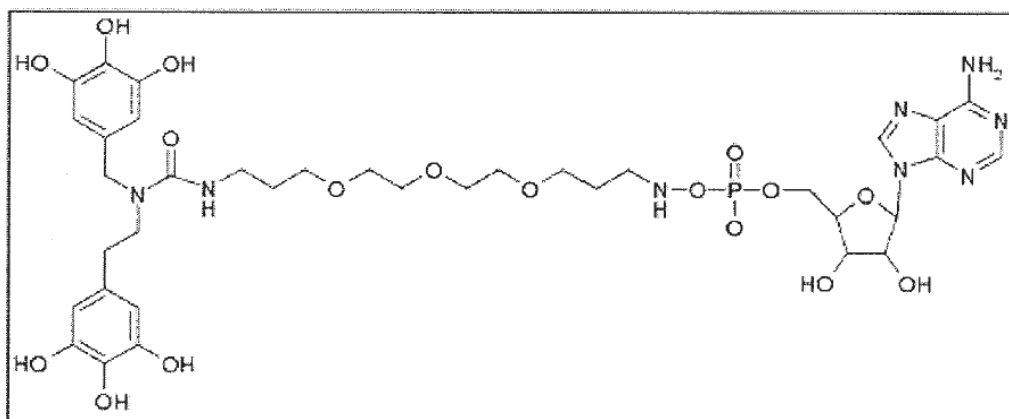
Mientras, el indicador-1 y el indicador-3 pueden estar disponibles para la venta directa al público, el indicador-2 se puede sintetizar de encargo.

Las fracciones indicadoras propuestas generalmente pueden (ser) por lo tanto:

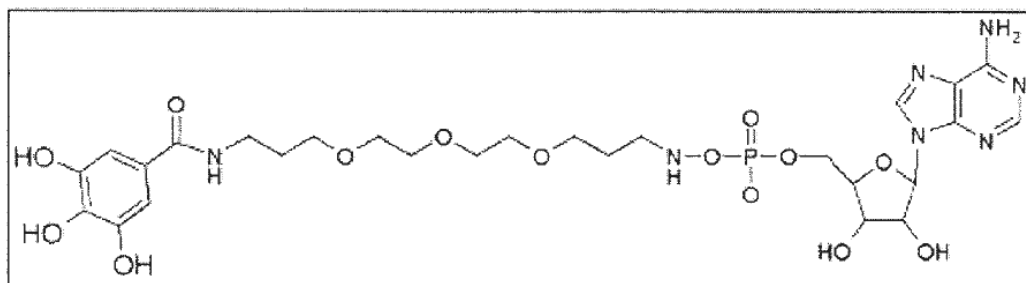
- 5 1. Fácilmente disponibles o sintetizables;
2. Soportar una gran carga;
3. No ser costosas; y/o
4. Fáciles de unir y escindir.

- 10 Los compuestos finales (monómeros): En base a las anteriores proposiciones, las estructuras finales de los nucleótidos junto con los enlazadores y los indicadores serían las siguientes, al menos en ciertas partes de realizaciones. Se proporcionan también con el propósito de ilustración los siguientes ejemplos de algunos compuestos finales y por lo tanto no se debe considerar que limiten el alcance de la invención. Como se describió anteriormente, se permiten, cualquier variación permitida para un nucleótido o su derivado, también para un enlazador y una fracción indicadora de carga masa para un compuesto final. Así, para la adenosina como un nucleótido en el 5' fosfato terminal en algunos ejemplos, si el enlazador es, digamos, equivalente a C 13 (opción 3 anteriormente), los distintos enlazadores harían que las estructuras finales se vean como a continuación:
- 15

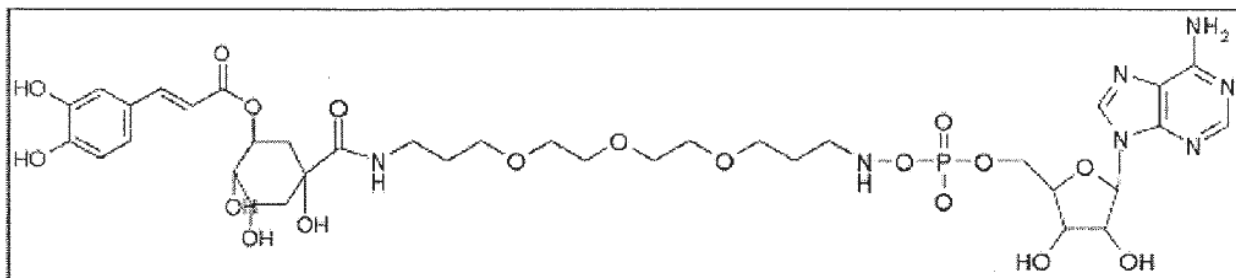
Un nucleótido-1 sintético final propuesto (téngase en cuenta que el indicador está en forma monomérica y esto se puede aumentar agregando de estos monómeros para aumentar la carga masa según se necesite):



Otro nucleótido-2 sintético propuesto (téngase en cuenta que el indicador está en forma monomérica y esto se puede aumentar agregando estos monómeros para aumentar la carga masa según se necesite):



5 Aún otro nucleótido-3 sintético propuesto (téngase en cuenta que el indicador está en forma monomérica y esto se puede aumentar agregando estos monómeros para aumentar la carga masa según se necesite):



El siguiente es un ejemplo no limitante e ilustrativo de protocolos de síntesis usados en al menos algunas realizaciones:

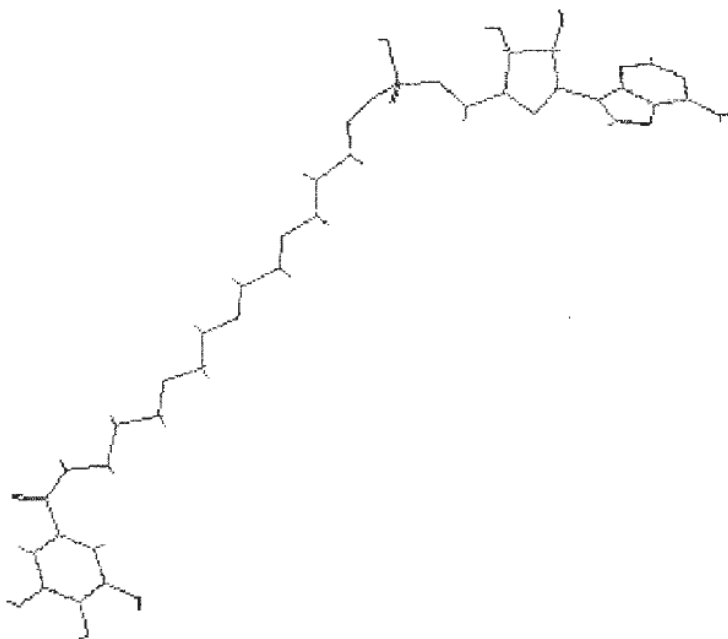
- 10 1. Síntesis de 5'-fosforamidatos de Adenosina: (Unión de Nucleótido con el enlazador diamina). Se puede usar el método de Chu et al. para sintetizar 5'-amino derivados de fosforamidato de adenosina en el que se pueden disolver en agua diamantes y adenosina monofosfato (AMP). Más tarde se añadió EDAC y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante. Se registró la reacción hasta su finalización.
- 15 2. Síntesis de estructuras finales propuestas: (Unión del enlazador diamina con la fracción indicadora). Se puede usar el método de Chu et al. para sintetizar 5'-amino derivados de fosforamidato de adenosina en el que se pueden disolver en agua diaminas y adenosina monofosfato (AMP). Más tarde se añadió EDAC y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante. Se registró la reacción hasta su finalización.

Una ventaja del procedimiento similar es que puede funcionar para ambas etapas que conducen a la formación de los compuestos finales como monómeros.

- 20 En algunos ejemplos ilustrativos de algunas realizaciones, se puede necesitar hacer la escisión de los enlazadores y fracciones indicadoras (advértase a continuación). Los enlaces como fosforamidatos generalmente pueden ser escindidos más fácilmente por el uso de ácidos como ácido trifluoroacético a temperatura ambiente.

A modo de ejemplo ilustrativo, se muestra a continuación el nucleótido-2 sintético propuesto como una probable vista 3D. El anillo aromático abajo a la izquierda de la molécula soporta tres funciones hidroxí que potencialmente se

pueden convertir en carga negativa en condiciones ligeramente alcalinas. A continuación está la conformación 3D de la Adenosina unida con el indicador-1 a través del enlazador 3 y los datos relacionados.



- 5 La distancia aproximada entre el fosforamidato y el átomo terminal cargado puede ser de aproximadamente 20 angstroms, que sería en general suficiente para inducir el potencial de carga en la superficie para la detección. Esta distancia se puede además alterar con modificaciones adicionales en la fase al menos en parte cambiando las longitudes del enlazador. También se pueden cambiar la carga en las fracciones indicadoras terminales mediante las variaciones en la química de fracciones indicadoras.
- 10 Un aspecto de la presente descripción describe una secuenciación novedosa mediante tecnología de síntesis. La secuenciación por síntesis puede ser el término general usado para determinar la secuencia de una molécula de DNA de cadena sencilla mediante el crecimiento de la cadena naciente, complementaria inversa y la detección de la adición de cada nucleótido nuevo en el polímero creciente. Usando los más modernos métodos descritos anteriormente (métodos empleados por Helicos, 454 Life Sciences & Solexa), esto se puede realizar añadiendo cada nucleótido suelto (adenina, guanina, citosina o timina) por separado, en presencia de una polimerasa y otros elementos requeridos para la polimerización, con una fracción indicadora fluorescente ligada al nucleótido y después observando la fluorescencia usando equipo de detección óptica sensible. Si hay fluorescencia en los espectros correctos para esa etapa de adición de nucleótido, entonces el programa bioinformático "llamada de base" puede añadir la base apropiada en la secuencia. Después, se puede lavar la reacción y se puede añadir el siguiente nucleótido en el ciclo (en donde se añaden secuencialmente cada uno de los cuatro nucleótidos Adenina, Guanina, citosina y Timina (o uracilo para el RNA)). Este ciclo se puede repetir hasta entre aproximadamente 25bp hasta 900 bp o se obtiene más valor de los datos de secuencia para cada reacción (por ejemplo, dependiendo de qué método se use), (Informes del mercado sugieren que ahora son posibles longitudes de lectura de hasta 900bp usando el secuenciador genómico de Roche (ex 454)). Para permitir la secuenciación del genoma completo, se pueden realizar muchos miles de estas reacciones en paralelo.
- 15
- 20
- 25 En algunas realizaciones, los métodos y componentes de secuenciación presentes pueden detectar la adición de nucleótidos detectando sus cargas eléctricas innatas, o la carga de una fracción indicadora de alta carga masa ligada, usando chips de microfluidos, o "placas" de reacción dispuestas con nanoestructuras sensibles que son capaces de detectar unas diferencias en densidad de carga en o cerca de sus superficies (nanoalambre o biosensores de nanotubo FET, películas piezo-eléctricas, etc.), o como moléculas que pasan a través de ellas (nanoporos), en lugar de usar equipos de detección de fluorescencia y ópticos caros. Así, cuando un nucleótido se añade al polímero creciente en una secuenciación por reacción de síntesis, puede aumentarse la carga en, o cerca de la superficie (o a través de un nanoporo) de la nanoestructura sensible (debido a la adición del nucleótido negativo y en algunas realizaciones siendo añadido el nucleótido negativo y su fracción indicadora de alta carga masa) y esto se puede detectar (por ejemplo, si se fuera a utilizar un nanoalambre como la estructura detectora, se detectará un aumento en la carga causado por la adición de un nucleótido cerca de su superficie mediante un cambio en la resistencia del alambre, debido a un fenómeno llamado el efecto de campo) mediante un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible de detección. Sin embargo, según crece el polímero, puede disminuir la señal porque las cargas que llevan los nucleótidos que se añaden pueden estar demasiado lejos de la nanoestructura sensible (p. ej. nanoalambre) para obtener un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible
- 30
- 35

de detección y no se puede observar ninguna señal. Por lo tanto, la “longitud de lectura” (cantidad de datos de secuencia que es capaz de obtenerse por este método de secuenciación de nucleótido) puede ser limitada.

Algunas realizaciones de la presente descripción abordan esta limitación, al menos en parte usando nucleótidos sintéticos que comprenden nucleótidos normales, con una fracción indicadora de alta carga masa negativa ligada a través de una molécula de enlazador (por ejemplo, ligada a un grupo 5' fosfato, o el grupo de base), con la longitud del enlazador creciente a medida que avanza la reacción. En general esta alta carga masa se puede diseñar para “estirarse” hasta la nanoestructura sensible (p. ej. nanoalambre) para ocasionar un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible de detección (p. ej. un efecto de campo u otro cambio piezo-eléctrico en la estructura de la nanoestructura sensible de detección que se use). Para permitir una buena medida de control de calidad y asegurar largas longitudes de lectura eliminando la acumulación de muchas fracciones indicadoras que generarían un efecto de campo cada vez mayor, se pueden escindir estas fracciones indicadoras para permitir la adición del siguiente nucleótido en la secuenciación por síntesis de secuencia. La escisión de la fracción indicadora “restaura” el sistema de manera efectiva permitiendo señales claras y una señal-ruido más mejorada que si se usan nucleótidos naturales sin el enlazador más la fracción indicadora de alta carga masa.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la reacción cíclica comprende al menos alguno de las siguientes series de eventos:

1. La molécula DNA molde (DNA, RNA, u otra molécula de polímero de nucleótidos sintéticos como PNA u oligos morfolino) a secuenciar o bien se puede ligar a la nanoestructura sensible de detección y a un primer añadido, unirse a una secuencia de un iniciador pre-inmovilizado en la nanoestructura sensible de detección, o bien desenrollar y alargar en un canal de microfluidos dispuesto con la nanoestructura sensible de detección;
2. Las nanoestructuras sensibles de detección se pueden lavar con agua, o con un tampón bajo en sal (como SSC 1X);
3. Se puede hacer una medida de la nanoestructura sensible de detección (medición basal);
4. Se puede añadir una mezcla que contiene un nucleótido sintético, la polimerasa y otros elementos requeridos para la reacción de polimerización. Si el nucleótido añadido es complementario a la base en la molécula molde inmediatamente después de la secuencia del iniciador, se puede incorporar dentro de la cadena creciente “naciente” por la polimerasa;
5. La reacción se puede entonces lavar, por ejemplo ya sea con agua o con un tampón bajo en sal (como, pero no se limita a, SSC 1X);
6. Se puede hacer una medida de la nanoestructura sensible de detección que puede notar el efecto causado por la fracción indicadora de alta carga masa (medición intermedia);
7. La fracción indicadora puede entonces ser escindida (por ejemplo por una solución ácida o enzimáticamente);
8. La reacción se puede lavar a continuación, por ejemplo ya sea con agua o con un tampón bajo en sal (como, pero no se limita a, SSC 1X);
9. Se puede hacer una medida de la nanoestructura sensible de detección que puede notar el efecto de justo el nucleótido añadido sin el enlazador y la fracción indicadora de alta carga masa (medición basal+1); y/o
10. Los puntos de 2 a 9 se pueden repetir para cada uno de los nucleótidos. Y esto se puede repetir repetidamente hasta que disminuya una señal clara.

Para algunas realizaciones en donde la molécula molde está inmovilizada, o unida a una sonda que se puede inmovilizar a su vez a la nanoestructura sensible de detección, se pueden aumentar las longitudes del enlazador que se une a la fracción indicadora de alta carga para permitir que la carga “se estire” hacia la nanoestructura sensible de detección para ejercer su efecto. Esto puede ser necesario al menos en algunas realizaciones según el polímero creciente de nucleótidos se puede mover al siguiente sitio de adición de nucleótidos más y más lejos de la nanoestructura sensible de detección según progresa la reacción de secuenciación por síntesis. Incrementando la longitud de las longitudes del enlazador según progresa la reacción, la fracción indicadora de carga masa aún seguirá “estirándose” hacia la nanoestructura sensible de detección para obtener un cambio, a pesar que la adición de nucleótidos está más lejos de la nanoestructura sensible de detección de lo que normalmente permitiría una señal, según crece la cadena naciente.

Para algunas otras realizaciones en donde las moléculas molde no están inmovilizadas a la nanoestructura sensible de detección, o hibridadas a un iniciador/sonda que puede estar a su vez inmovilizado a la nanoestructura sensible de detección, y puede mejor estar libre o inmovilizado horizontalmente a través de un grupo de nanoestructuras sensibles de detección, se puede usar una única longitud de enlazador para cada una de las reacciones del ciclo.

Algunos aspectos de realizaciones de la presente descripción describen un método de secuenciación de polímeros de nucleótidos (DNA o RNA) incorporando nucleótidos sintéticos, ligados, a través de un enlazador a una fracción indicadora, en una reacción de "secuenciación por síntesis". Como se emplea en esta memoria en varias realizaciones, la "secuenciación por síntesis" generalmente describe un método de secuenciación de nucleótidos en donde se puede detectar en tiempo real la adición de cada nucleótido a la cadena naciente (es decir, el polímero creciente de nucleótidos, complementario inverso del polímero nucleótido molde). Algunas otras realizaciones, en lugar de detectar las adiciones de nucleótidos monómeros a la cadena naciente usando la detección óptica tradicional de las etiquetas fluorescentes (como se usa en la secuenciación actualmente disponible por técnicas de síntesis), pueden detectar la adición de cada nucleótido basándose en la carga masa del nucleótido monómero. En algunas otras realizaciones, puede cambiar en las cargas superficiales la carga masa de una fracción indicadora de carga masa ligada covalentemente, que usa una nanoestructura de sensible de detección, u otra estructura capaz de detectar minutos.

Como se usa en esta memoria en algunos aspectos de realizaciones, una "nanoestructura sensible de detección" puede generalmente ser cualquier estructura (nanoescala o no) capaz de generar una señal en respuesta a un cambio en una propiedad de la nanoestructura dentro de una región de ensayo. Como se usa en esta memoria una "región de ensayo" generalmente se refiere al área o región en la que al menos reside parcialmente la nanoestructura o nanoestructuras, y en la que la(s) nanoestructura(s) está(n) acopladas operativamente a una biomolécula (ácido nucleico, iniciador, secuencia diana, etc.) p. ej. a través de una unión o enlace directo o indirecto, covalente o no, justo a la proximidad física lo suficientemente cerca para exhibir un cambio en propiedad y generar una señal en respuesta a un cambio en la biomolécula. En realizaciones preferidas, tal cambio en propiedad puede ser causado por un cambio en la carga de una molécula biológica acoplada operativamente a la nanoestructura dentro de la región de ensayo. Típicamente, la nanoestructura es sensible a los cambios en o cerca de su superficie (como con nanoalambres o biosensores de nanotubo FET de carbono), o como moléculas que pasan a través de ella (como biosensores de nanoporo), aunque la región de ensayo puede extenderse más allá de la superficie de la nanoestructura para incluir toda la región dentro del campo de sensibilidad de la nanoestructura. Preferiblemente la nanoestructura está también acoplada a un detector que se configura para medir la señal y proporcionar un resultado relacionado con la señal medida. En cualquier punto a lo largo de la longitud de la nanoestructura, puede tener al menos una dimensión de la sección transversal menor que aproximadamente 500 nanómetros, típicamente menor que aproximadamente 200 nanómetros, más típicamente menor que aproximadamente 150 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 100 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 50 nanómetros, incluso más típicamente menor que aproximadamente 20 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 10 nanómetros, e incluso menos que aproximadamente 5 nanómetros. En otras realizaciones, al menos la dimensión de la sección transversal puede ser menor que aproximadamente 2 nanómetros, o aproximadamente 1 nanómetro. En un conjunto de realizaciones la nanoestructura sensible de detección puede ser al menos de una dimensión de la sección transversal que va desde aproximadamente 0,5 nanómetros hasta aproximadamente 200 nanómetros.

Como se usa en otras realizaciones, un nanoalambre es un semiconductor elongado a nanoescala que, en cualquier punto a lo largo de su longitud, tiene al menos una dimensión de la sección transversal y, en algunas realizaciones, dos dimensiones de sección transversal ortogonales menores que 500 nanómetros, preferiblemente menor que 200 nanómetros, más preferiblemente menor que 150 nanómetros, aún más preferiblemente menor que 100 nanómetros, incluso más preferiblemente menor que 70 nanómetros, aún más preferiblemente menor que 50 nanómetros, incluso más preferiblemente menor que 20 nanómetros, aún más preferiblemente menor que 10 nanómetros, e incluso menor que 5 nanómetros. En otras realizaciones, la dimensión de la sección transversal puede ser menor que 2 nanómetros o 1 nanómetro. En un conjunto de realizaciones el nanoalambre tiene al menos una dimensión de la sección transversal que va desde 0,5 nanómetros hasta 200 nanómetros. Las dimensiones anteriores se refieren a aquellas del núcleo donde se describen nanoalambres que tienen un núcleo y una región exterior. La sección transversal del semiconductor estirado puede tener cualquier forma arbitraria, que incluye, pero no se limita a, circular, cuadrada, rectangular, elíptica y tubular. Están incluidas las formas regulares e irregulares. Aparece a continuación una lista no-limitada de ejemplos de materiales a partir de la cual se pueden hacer los nanoalambres de la invención. Los nanotubos son una clase de nanoalambres que encuentran su uso en la invención y, en una realización, los dispositivos de la invención incluyen alambres de escala acorde con los nanotubos. Como se usa en esta memoria, un "nanotubo" es un nanoalambre que tiene un núcleo ahuecado, e incluye aquellos nanotubos conocidos por aquellos que de ordinario son expertos en la técnica. Un "nanoalambre no nanotubo" es cualquier nanoalambre que no es un nanotubo. En un conjunto de realizaciones de la invención, se usa un nanoalambre no nanotubo que tiene una superficie no modificada (que no incluye una entidad de reacción auxiliar no inherente al nanotubo en el entorno en el que se sitúa) en cualquier disposición de la invención descrita en esta memoria en la que se puede usar un nanoalambre o un nanotubo. Un "alambre" se refiere a cualquier material que tiene una conductividad al menos aquella de un semiconductor o metal. Por ejemplo, el término "eléctricamente conductivo" o un "conductor" o un "conductor eléctrico" cuando se usa en referencia a un alambre o nanoalambre de "conducción" se refiere a la habilidad de que el alambre deje pasar la carga a través de sí mismo. Los materiales eléctricamente conductivos preferidos tienen una resistividad inferior que aproximadamente 10^{-3} , más preferiblemente inferior que aproximadamente 10^{-4} , y más preferiblemente inferior que aproximadamente 10^{-6} o 10^{-7} ohm-metros.

Los nanoporos tienen generalmente uno o más pequeños agujeros en una membrana eléctricamente aislante. El nanoporo es generalmente una estructura esférica en un tamaño a nanoescala con uno o más poros en éste. Según algunos aspectos, un nanoporo está hecho de carbono o de cualquier material que conduce.

5 La nanoperla es generalmente una estructura esférica en un tamaño a nanoescala. La forma de la nanoperla es generalmente esférica pero puede ser también circular, cuadrada, rectangular, elíptica y tubular. Se incluyen formas regulares e irregulares. En algunos ejemplos, la nanoperla puede tener un poro dentro.

El nanohuevo se usa generalmente en un biosensor que consiste en la separación entre dos contactos en la distancia nanométrica. Se detecta cuando una molécula diana, o un número de moléculas diana hibridan o se unen entre los dos contactos lo que permite que se transmita la señal eléctrica a través de las moléculas.

10 Las nanoestructuras anteriores, llamadas, nanoalambre, nanotubo, nanoporo, nanoperla, y nanohuevo se describen para proporcionar la ilustración instantánea de algunas realizaciones, y no para limitar el alcance de la presente invención. Además de los ejemplos anteriores, se debería considerar también cualquier nanoestructura que tenga un tamaño nanoescala y sea adecuado para ser aplicado a los métodos y aparatos de secuenciación de ácidos nucleicos como se describe en la aplicación, para ser incluida en el alcance de la invención.

15 En general, las estrategias de secuenciación de nucleótidos para usar con nanoestructuras o nanosensores son para detectar la carga en, o cerca de las superficies, o a través de un nanohuevo o nanoporo, que origina un cambio medible en sus propiedades (como transistores de efecto de campo, nanohuecos, o nanosensores piezoeléctricos). La carga detectada por la nanoestructura se puede originar a partir del nucleótido complementario al nucleótido del molde que se añade durante la reacción de secuenciación. En algunas realizaciones, el nucleótido complementario
20 añadido durante la reacción de secuenciación está ligado a un enlazador y a una fracción indicadora de alta carga masa, que se describen en detalle en otra parte en la especificación.

El efecto de campo generalmente se refiere a un efecto experimentalmente observable simbolizado por F (en velocidades de reacción, etc.) de interacción molecular de colomb entre el centro de interés y un unipolo o dipolo distante, por acción directa a través del espacio más que a través de enlaces. La magnitud del efecto de campo (o "efecto directo") puede depender de la carga unipolar/momento dipolar, orientación del dipolo, la distancia más corta entre el centro de interés y el unipolo o dipolo distante, y de la constante dieléctrica efectiva. Esto se aprovecha en transistores para ordenadores y más recientemente en transistores de DNA de efecto de campo usados como nanosensores.

30 El transistor de efecto de campo (FET) es generalmente un transistor de efecto de campo, que puede usar el efecto de campo debido a las cargas parciales de las biomoléculas para funcionar como un biosensor. La estructura de los FET puede ser similar a aquella del transistor de efecto de campo semiconductor-óxido-metal (MOSFETs) con la excepción de la estructura de entrada que, en los biosensores FET, se puede reemplazar por una capa de moléculas sonda inmovilizadas que actúan como receptores de superficie.

35 En algunas realizaciones, la reacción de secuenciación puede empezar por hibridación de una "sonda" corta o molécula de ácido nucleico "iniciadora", frecuentemente referida como un oligonucleótido, en donde una "sonda" o "iniciador" puede ser generalmente una molécula de polímero de nucleótidos de cadena sencilla, ssDNA, RNA, PNA, Morfolino, u otros nucleótidos sintéticos, con el extremo 5' de la molécula de nucleótidos "diana", en donde la molécula "diana" puede ser generalmente un polímero de nucleótidos de interés. Es la secuencia de nucleótidos de esta molécula de polímero de nucleótidos de cadena sencilla, ssDNA o RNA la que se puede determinar. Además, la
40 secuencia de la "sonda" o del "iniciador" puede ser generalmente complementaria inversa de la molécula de ácido nucleico "diana" a secuenciar y suficientemente larga para facilitar la hibridación- el diseño del iniciador es bien conocido por aquellos expertos en la técnica y están disponibles muchas plataformas de software comercial y de software gratuito para facilitar el diseño del iniciador o de la sonda.

45 En algunas realizaciones, se pueden generalmente ligar adaptameros cortos (otros oligonucleótidos cortos de secuencia conocida) a un polímero de nucleótidos diana y se puede diseñar el iniciador o sonda para que sea complementario inverso a esta secuencia de oligonucleótidos. En algunas realizaciones el iniciador o molécula sonda se puede inmovilizar en una nanoestructura sensible de detección y la molécula de nucleótidos diana se puede hibridar con el iniciador. En otras realizaciones, la molécula diana se puede inmovilizar primero a la nanoestructura sensible de detección y se pueden hibridar los iniciadores o sondas. En aún otra realización, tanto la
50 molécula de nucleótidos diana como las moléculas iniciador y sonda pueden estar libres y no inmovilizadas, pero colocadas cerca de las nanoestructuras sensibles de detección, y al menos en algunas realizaciones las moléculas diana e iniciador o sonda hibridadas pueden estar suficientemente cerca para ejercer un cambio medible en las propiedades de la nanoestructura sensible de detección. Esto podría ser colocando las moléculas en un entorno de microfluidos, u otras metodologías no definidas. El siguiente es un ejemplo ilustrativo no limitante de ciertas realizaciones de la presente descripción. En un ejemplo, la primera etapa en la técnica puede ser tomar una serie de medidas (por ejemplo una medida de resistencia en un nanoalambre u otro transistor de efecto de campo) de la nanoestructura sensible de detección en el aire, la presencia de agua, o un tampón bajo en sal (como SSC 1X). Esto puede proporcionar el nivel basal para la propiedad de la nanoestructura sensible de detección que puede ser
55 medida en respuesta a la reacción en curso (p. ej. la resistencia eléctrica en el nanoalambre). La secuenciación por

reacciones de síntesis se puede iniciar añadiendo una sola especie de nucleótido a la reacción (junto con una polimerasa y otros productos químicos requeridos para la polimerización), como Adenina. Como todos los nucleótidos pueden poseer una carga natural, tras la adición de la Adenina en la cadena naciente (asumiendo que el siguiente nucleótido en el polímero de nucleótidos diana es una Timina) la carga en, o cerca de, una nanoestructura sensible de detección, creada por esta Adenina adicional en la cadena naciente, puede causar un cambio medible en las propiedades en la nanoestructura sensible de detección, que se puede registrar, seguido de una etapa de lavado para eliminar el ruido de fondo de la alta ionicidad de la mezcla de reacción de PCR.

Por lo tanto, en ciertos ejemplos, si hay un nucleótido siguiente de Timina (o Uracilo si se secuencia RNA) en el nucleótido molde, entonces una vez que se ha añadido Adenina a la secuenciación por reacción de síntesis, se puede incorporar en la cadena naciente, por la polimerasa (que se puede también añadir como parte de la reacción) y se detecta una señal, al menos en parte debida al cambio en la carga eléctrica en, o cerca de la superficie de la nanoestructura sensible de detección, causada por el nucleótido adicional en la cadena naciente. Sin embargo, debería haberse añadido en su lugar o bien Citosina, Guanina o Timina, después no se habría añadido ningún nucleótido a la cadena naciente y no se habría observado ningún cambio de señal en la nanoestructura sensible.

En otras ciertas realizaciones, se puede añadir cada nucleótido, uno detrás de otro, a la mezcla de reacción, con polimerasa y $MgCl_2$, H_2O y tampón para permitir la polimerización de la adición de un nucleótido complementario a la secuencia diana en la cadena naciente. Después de cada adición de nucleótido, se puede lavar la reacción y añadir el siguiente nucleótido. Este ciclo se puede repetir para todos los cuatro nucleótidos. Una vez que se pueden añadir todos los cuatro nucleótidos, se puede repetir el ciclo hasta que pueda ser elucidada la secuencia deseada, o pueda deteriorarse la señal.

En varias realizaciones, los nucleótidos sintéticos pueden comprender uno o más nucleótidos, Adenina, Guanina, Citosina & Timina, más isoformas de estas bases (como Inosina) con una fracción indicadora unida, por ejemplo, a través de un enlazador con el grupo 5' fosfato. Si la nanoestructura sensible de detección no puede ser lo suficientemente sensible para detectar cambios causados por nucleótidos individuales, algunas realizaciones de la presente descripción describen el uso de nucleótidos sintéticos que comprende nucleótidos con una molécula indicadora de carga masa ligada al nucleótido a través de una molécula enlazadora larga, suficientemente larga para asegurar que el indicador no pueda tener un efecto perjudicial significativo sobre la actividad polimerasa. Las moléculas enlazadoras pueden variar en longitud, y permiten que la fracción indicadora se extienda hacia fuera del complejo de DNA polimerasa a fin de que no se pueda prevenir la polimerización (adición de nucleótido), u obstaculizar indebidamente. Además, según progresa la secuenciación por reacción de síntesis, los nucleótidos añadidos a la cadena naciente pueden llegar más y más lejos de la nanoestructura sensible de detección, la cual puede disminuir la señal. Para combatir esto y por lo tanto proporcionar longitudes largas de lectura, se pueden aumentar las longitudes de las moléculas enlazadoras para permitir que las fracciones indicadoras de carga masa se estiren hasta las estructuras sensibles de detección para proporcionar una señal clara.

En algunas realizaciones, como cada nucleótido se puede añadir a la cadena naciente, se pueden acumular las fracciones indicadoras y finalmente sobrecargarían las estructuras sensibles de detección al menos debido en parte a sus cargas agregadas. Para combatir esto, en ciertos ejemplos ilustrativos, algunas realizaciones pueden asumir que se pueden escindir las cargas, ya sea por enzimas, productos químicos, luz, u otros métodos, después de que se pueda unir cada nucleótido y se registre la señal en la fracción indicadora sensible. Una vez que se puedan escindir y quitar por lavado el enlazador y la fracción indicadora, se puede tomar otra medida en la estructura sensible de detección para servir como un control de calidad, o para "restaurar" el sistema para mejorar la relación señal ruido, antes de que se pueda añadir el siguiente nucleótido a la reacción.

Los tramos de los homopolímeros pueden tener un problema con las tecnologías de secuenciación basadas en fluorescencia, ya que un tramo dinucleótido puede proporcionar dos veces la intensidad de fluorescencia y el tramo trinucleótido puede alargar tres veces la intensidad de fluorescencia, y así sucesivamente. Esto puede causar dificultades significativas en la interpretación y la llamada de base.

Al igual que algunas tecnologías de secuenciación basadas en fluorescencia, varias realizaciones usadas en conexión con la presente descripción pueden generalmente diferenciar entre tramos de homopolímeros di-, tri-, etc. midiendo la intensidad de la señal (esto puede ser posible si la nanoestructura sensible de detección puede ser capaz de mediciones cuantitativas o semicuantitativas, como son algunos nanoalambres o biosensores de nanotubos FET de carbono).

Alternativamente, si la nanoestructura sensible de detección no puede ser capaz de diferenciar entre dinucleótidos, tri-nucleótidos y otras adiciones de homopolímeros, algunas realizaciones pueden usar nucleótidos sintéticos diseñados para permitir la adición de un nucleótido y por lo tanto prevenir la adición de otros nucleótidos. Un método ilustrativo para lograr esto puede ser unir la fracción indicadora al grupo 5' fosfato, lo que puede prevenir más adiciones de nucleótidos a la cadena naciente. Una vez que se han escindido el indicador y el enlazador, se puede añadir el siguiente nucleótido. Otro método ilustrativo puede ser colocar una molécula cap escindible en el 5' fosfato para prevenir más adiciones de nucleótidos a la cadena naciente, con el enlazador y la fracción indicadora ligada a otro sitio en el nucleótido. La eliminación de cap puede entonces permitir el siguiente nucleótido a añadir y que se repita el proceso.

En algunas realizaciones de esta descripción, se pueden añadir todos los nucleótidos a la mezcla de reacción, por ejemplo, a la misma vez, sin embargo, cada uno de los nucleótidos sintéticos puede tener una fracción indicadora carga masa distinta, al menos en algunas realizaciones. Se pueden tomar las mediciones de las nanoestructuras sensibles de detección aproximadamente cada 2-3 ms, para imitar la velocidad a la que la polimerasa puede añadir nucleótidos a la cadena naciente, que puede ser estimada en aproximadamente 3 ms a una temperatura de aproximadamente 65°C. En dicha realización, las fracciones indicadoras pueden no ser escindidas, por lo que las longitudes de lectura pueden ser más cortas al menos debido en parte a la disminución de la relación señal ruido según puede extenderse la cadena naciente y se van acumulando las fracciones indicadoras de carga, pero el tiempo de secuenciación puede ser más rápido. En ciertas realizaciones, una polimerasa sintética, que se puede diseñar para catalizar más lenta la reacción de polimerización.

Ejemplos

Los siguientes son algunos ejemplos ilustrativos y no limitantes de algunas realizaciones de la presente descripción:

Ejemplo 1. Secuenciación de DNA

En un ejemplo, la metodología de secuenciación puede no usar fluorescencia y cámaras caras sensibles, pero en su lugar puede detectar la adición de los nucleótidos sintéticos descritos en algunos aspectos de la presente descripción, al menos debido en parte detectando la carga eléctrica de la fracción indicadora, que usa nanoestructuras sensibles que pueden ser capaces de detectar un aumento de carga masa dentro de la región de ensayo, p. ej., en o cerca de la superficie de la nanoestructura sensible de detección. Cuando se añade un nucleótido al polímero creciente en una secuenciación por reacción de síntesis, puede aumentar la densidad de carga en, o cerca de la superficie de la nanoestructura sensible de detección y esto se puede detectar por un cambio en la propiedad en la nanoestructura sensible de detección (por ejemplo, si se usa un nanoalambre, o nanotubo de carbono, como estructura de detección, se puede detectar un cambio en la carga causada por la adición de un nucleótido cerca de su superficie mediante un cambio en la resistencia en el alambre, debido a un fenómeno llamado el efecto de campo). Sin embargo, según crece el polímero, la señal puede disminuir ya que las cargas que llevan los nucleótidos que se añaden pueden estar muy lejos de la nanoestructura sensible (p. ej. nanoalambre) para obtener un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible de detección y puede no observarse señal. Por lo tanto, la "longitud de lectura" (cantidad de datos de secuencia que es capaz de obtenerse por este método de secuenciación de nucleótidos) puede ser limitada.

Como se usa en esta memoria, este ejemplo particular, una "nanoestructura sensible de detección" puede ser cualquier estructura (nanoescala o no) que puede ser capaz de detectar cualquier cambio en, o cerca de la superficie y en cualquier punto puede tener al menos una dimensión de la sección transversal menor que aproximadamente 500 nanómetros, típicamente menor que aproximadamente 200 nanómetros, más típicamente menor que aproximadamente 150 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 100 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 50 nanómetros, incluso más típicamente menor que aproximadamente 20 nanómetros, aún más típicamente menor que aproximadamente 10 nanómetros, e incluso menor que aproximadamente 5 nanómetros. En otras realizaciones, al menos una de las dimensiones de sección transversal puede ser generalmente menor que aproximadamente 2 nanómetros, o aproximadamente 1 nanómetro. En un grupo de realizaciones la nanoestructura sensible de detección puede tener al menos una dimensión de la sección transversal que va desde aproximadamente 0,5 nanómetros hasta aproximadamente 200 nanómetros.

Las propiedades de una nanoestructura sensible de detección pueden cambiar en respuesta a la carga de superficie, o de superficie cercana de manera que puedan ser medibles a través de mediciones piezoeléctricas, medición electroquímica, medición electromagnética, fotodetección, medición mecánica, medición acústica, medición gravimétrica y similares. Un ejemplo de una nanoestructura sensible de detección puede incluir, pero no se limita a, transistores de efecto de campo de dos dimensiones, unos voladizos, nanoalambres, nanotubos de carbono, y todas las estructuras piezoeléctricas macro-, micro-, nano-, pico-, femto-, o más pequeñas.

Ciertas realizaciones de la presente descripción pueden referir esta limitación, al menos en parte usando nucleótidos sintéticos que pueden comprender nucleótidos normales, con una fracción indicadora de alta carga masa negativa (o positiva) unida a través de la molécula enlazadora (por ejemplo, unida al grupo 5' fosfato), con la longitud del enlazador en aumento según progresa la reacción. Esta alta carga masa se puede diseñar para "estirarse" hacia la nanoestructura (p. ej. nanoalambre) para causar un cambio en la propiedad de la nanoestructura sensible de detección (p. ej. un cambio en el efecto de campo u otro piezo-eléctrico en la estructura que depende de la nanoestructura sensible de detección usada). Para permitir una buena medida de control de calidad y para asegurar largas longitudes de lectura mediante la eliminación del aumento de muchas fracciones indicadoras que causarían e incluso aumentarían el efecto de campo, se pueden escindir estas fracciones indicadoras al menos en ciertas realizaciones, para permitir la adición del siguiente nucleótido en la secuenciación por síntesis de secuencia.

Por lo tanto, en algunas realizaciones la reacción cíclica puede comprender al menos algunos o todos de la siguiente serie completa o parcial de eventos:

1. La molécula de ssDNA molde a secuenciar puede ser ya sea ligada a la nanoestructura sensible de detección y a un iniciador añadido, unido a una secuencia iniciadora pre-inmovilizada en la nanoestructura sensible de detección, o desenrollada y alargada en un cana de microfluidos dispuesto con nanoestructuras sensibles de detección.
- 5 2. Las nanoestructuras sensibles de detección se pueden lavar con agua, o un tampón bajo en sal (como SSC 1X). Este lavado, sin embargo, puede no ser necesario en algunas realizaciones.
3. Se puede hacer una medida de la nanoestructura sensible de detección.
4. Se puede añadir una mezcla que contiene un nucleótido sintético, la polimerasa y otro elementos requeridos para la reacción de polimerización. En un ejemplo, si el nucleótido añadido es complementario a la base en la cadena menor inmediatamente después de la secuencia iniciadora, se puede incorporar en la cadena naciente por la polimerasa.
- 10 5. La reacción se puede lavar después ya sea con agua o con un tampón bajo en sal (como SSC 1X). Este lavado, sin embargo, puede no ser necesario en algunas realizaciones.
6. Se puede hacer una medida de la nanoestructura sensible de detección que pueda notar el efecto causado por la alta carga masa de la fracción indicadora.
- 15 7. La fracción indicadora se puede escindir después (por ejemplo por una solución ácida o enzimáticamente). Esta escisión de la fracción indicadora, sin embargo, puede no ser necesaria en algunas realizaciones.
8. Los puntos 2 hasta 7 se pueden repetir para cada uno de los nucleótidos. Y esto se puede repetir repetidamente hasta que pueda degradarse una señal clara.

20 Para algunas realizaciones en donde la molécula molde está inmovilizada a, o unida a una sonda que puede ser a su vez inmovilizada a una nanoestructura sensible de detección, se pueden aumentar las longitudes del enlazador que lleva unida la fracción indicadora de alta carga a los nucleótidos sintéticos para permitir que la carga “se estire” hacia la nanoestructura sensible de detección para ejercer un efecto. Esto puede ser necesario al menos en algunas realizaciones mientras el polinucleótido creciente pueda moverse al siguiente sitio de adición de nucleótidos más y más lejos de la nanoestructura sensible de detección mientras pueda progresar la secuenciación por reacción de síntesis.

25 Para algunas otras realizaciones en donde las moléculas molde no están inmovilizadas a la nanoestructura sensible de detección, o hibridadas a un iniciador/sonda que pueda ser a su vez inmovilizado a una nanoestructura sensible de detección, y en su lugar puede estar libre o inmovilizado horizontalmente a través de un grupo de nanoestructuras sensibles de detección, se puede usar un único enlazador para cada una de las reacciones del ciclo.

30 Ejemplo 2. Secuenciación polony en paralelo

En una realización, se puede fragmentar el DNA genómico mediante métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica (como sonicación, digestión con enzimas de restricción, etc.). Se pueden entonces ligar adaptámeros (un oligonucleótido sintético corto-DNA, u otro oligonucleótido sintético) a los fragmentos, un adaptámero A ligado al extremo 5' y un adaptámero B ligado al extremo 3'.

35 El adaptámero A puede contener un sitio de unión de enzimas de restricción y el adaptámero B puede ser complementario a otro oligonucleótido inmovilizado en la nanoestructura, como una nanoesfera. Este oligonucleótido puede ser DNA, o cualquier otro ácido nucleico sintético y se puede generalmente inmovilizar con métodos familiares a aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, que utiliza un recubrimiento de estreptavidina en la nanoestructura y biotina ligada al nucleótido terminal en la cadena de oligonucleótidos). Generalmente se pueden añadir estas nanoestructuras a una librería de pequeños fragmentos genómicos, con adaptámeros A & B ligados, en exceso y luego toda la mezcla, con los reactivos de PCR añadidos, emulsionados en aceite, de modo que pequeños micro-reactores de nanoestructura más una cadena sencilla del genoma fragmentado pueda permitir la enorme amplificación múltiple del genoma que usa la reacción en cadena de la polimerasa. Como las nanoestructuras se pueden añadir en exceso, la dilución puede ser tal que solamente un fragmento se pueda unir a cualquier nanoestructura. Los fragmentos amplificados, dentro de cada micro-reactor pueden unirse de forma natural a las nanoestructuras, según son sintetizados, las cuales pueden estar recubiertas con DNA (u otro nucleótido sintético, como PNA, morfollinos, etc.), complementario a los adaptámeros B. Así cada micro-reactor, siguiendo la reacción en cadena de la polimerasa, puede comprender una nanoestructura recubierta con una sola especie de fragmento genómico amplificado, en ciertas partes de realizaciones.

45 El algunas ocasiones, se pueden añadir entonces estas nanoestructuras, recubiertas con una única especie de fragmento genómico amplificado a una placa especial de pico-titulación, que puede comprender cientos o miles de pocillos de reacción. En la base de cada pocillo puede estar una disposición de nanoestructuras sensibles de detección abordadas de forma individual recubiertas con un “iniciador”, o “sonda” de oligonucleótido complementario

55

al adaptámero A. Los pocillos pueden ser de un tamaño tal que permita solamente una nanoestructura en ciertos casos, recubiertos con un fragmento genómico amplificado para descansar en ella. Una vez que se puede permitir que estas nanoestructuras descansen en los pico-pocillos, se puede lavar la placa de reacción con un tampón bajo en sal (como SSC 1X).

- 5 En una realización, se puede tomar una medida de la resistencia de la nanoestructura sensible de detección como señal de línea de base. Se puede añadir polimerasa (la enzima que puede leer el DNA y añadir bases complementarias), con un único nucleótido (ya sea Adenina, Guanina, Citosina o Timina) y reactivos químicos (como MgCl₂) requeridos para la actividad polimerasa, y se puede realizar la secuenciación por reacción de síntesis, como se describió anteriormente, en paralelo, en cada pocillo de la placa de pico-titulación.
- 10 En algunas realizaciones, se pueden usar nucleótidos sintéticos, que tienen una fracción de carga añadida -como se describió anteriormente- para amplificar la señal. Además, según progresa la secuenciación por reacción de síntesis y el siguiente nucleótido a añadir a la cadena naciente se aleja más de la nanoestructura sensible de detección, se puede aumentar la longitud de las moléculas enlazadoras para “estirarse” para inducir una señal en la nanoestructura sensible de detección desde lejos, permitiendo así longitudes de lectura más largas.
- 15 En otras realizaciones, después de la etapa de lavado, se puede realizar una digestión restringida con una enzima de restricción cortando en el sitio en el adaptámero A. Esto puede liberar la nanoestructura, que puede ser arrastrada por lavado. Entonces se puede realizar la secuenciación por reacción de síntesis, como anteriormente, pero sin la presencia de la nanoestructura en el pico-pocillo.

Ejemplo 3. Secuenciación de larga longitud de lectura en canales de microfluidos o células de flujo

- 20 En algunas realizaciones, se pueden secuenciar secuencias de DNA diana en un canal de microfluidos dispuesto con nanoestructuras sensibles de detección.

La muestra genómica, u otra molécula de polímero de nucleótidos se puede fragmentar en fragmentos aproximadamente > de 1kb, pero por debajo aproximadamente de 10 kb y pueden tener un adaptámero (inversamente complementario al iniciador de la secuenciación) ligado al extremo 5'. Estos fragmentos se pueden entonces colocar dentro del canal de microfluidos, uno por canal, ya sea hibridando la secuencia 5' del adaptámero a una sonda inmovilizada en la boca del canal de microfluidos y haciendo fluir un tampón bajo en sal a través del canal para atraer dentro del canal al fragmento de polímero de nucleótidos, o permitiendo que difunda el polímero de nucleótidos de modo natural y se desenrolle dentro del canal de microfluidos, u otro método.

25 En dicha realización, una vez que puede estar el fragmento de polímero de nucleótidos en el canal de microfluidos puede empezar la secuenciación por reacción de síntesis, con cada nanoestructura sensible dispuesta que toma una medición. No solamente detectan las adiciones de bases estas nanoestructuras sensibles, sino que, según puede extenderse la cadena naciente se pueden determinar las posiciones espaciales de cada adición de base, mientras cada nanoestructura sensible de detección posterior puede comenzar a detectar una señal, y aquellas río arriba pueden parar de detectar la señal.

30 Uno de los aspectos clave de tales realizaciones puede ser asegurar que la química de superficie dentro del canal de microfluidos previene la unión y la agregación de las fracciones indicadoras cargadas o nucleótidos no incorporados, ya que esto puede causar ruido de fondo.

Ejemplo 4. Dispositivo de secuenciación portátil

40 En alguna realización, se pueden secuenciar secuencias de DNA diana específicas en un canal de microfluidos dispuesto con nanoestructuras sensibles de detección como anteriormente. Sin embargo, se puede almacenar la secuenciación por reactivos de síntesis en un canal de microfluidos, cada mezcla de nucleótidos, solución de lavado y tampón de escisión de la fracción indicadora de carga, separada por una burbuja de aire, u otro método de separación de reactivos.

45 En alguna realización, se pueden llevar a secuenciar pequeñas regiones específicas de un DNA diana viral, bacteriano, o genómico para ser diagnosticadas por la presencia o ausencia de un virus, bacteria, o secuencia (como un SNP) específico.

Varias realizaciones usadas en conexión con la presente descripción se prestan a secuenciación portátil ya que no requeriría cámaras o láseres voluminosos y caros para detectar la reacción de secuenciación. Además, colocando los reactivos uno detrás del otro en secuencia, se pueden manipular fácilmente dentro del ambiente de microfluidos.

50 Se presentan las siguientes figuras para proporcionar algunos ejemplos ilustrativos y no limitantes de varias realizaciones,

Figura 1 A. En una realización, se puede inmovilizar una secuencia sonda en una nanoestructura sensible de detección (en este caso un nanoalambre) y la molécula de ssDNA molde a secuenciar puede hibridar con la secuencia sonda y la secuencia sonda puede actuar como un iniciador para la secuenciación por reacción de

síntesis. B. En esta realización, la molécula de ssDNA molde se puede inmovilizar a la nanoestructura sensible de detección y se puede iniciar para su secuenciación con un oligonucleótido iniciador libre.

5 En tales realizaciones, una vez que el DNA diana se ha unido al iniciador/sonda inmovilizado, o el iniciador hibrida con el DNA diana inmovilizado, se puede tomar una medición de la (nanoestructura) sensible de detección (por ejemplo, en un nanoalambre o nanotubo de carbono, se toma una lectura de resistencia).

La Figura 2 ilustra la siguiente etapa en la secuenciación por reacción de síntesis en algunas realizaciones, en donde se pueden añadir una solución que comprende al menos algunos nucleótidos sintéticos de una sola especie, polimerasa y productos químicos requeridos para la polimerización.

10 La Figura 3 ilustra la adición de una base de nucleótido sintética a la cadena naciente en algunas realizaciones. La fracción indicadora de alta carga masa negativa ligada puede extenderse desde la secuencia de nucleótidos sintética y "estirarse" para originar un cambio en las propiedades en la nanoestructura sensible de detección (en este caso un efecto de campo en un nanoalambre).

Se puede tomar una segunda medición de la nanoestructura sensible de detección en este punto.

15 La Figura 4 ilustra que se puede escindir el enlazador y la fracción indicadora de alta carga masa ligada al nucleótido añadido, ya sea enzimáticamente, con un ácido, o con otro producto químico o método, y quitar por lavado, en algunas realizaciones.

Se puede tomar una segunda medición de la nanoestructura sensible de detección en este punto.

Se puede repetir el ciclo de la Figura 2 a la 4 para los otros tres nucleótidos y luego otra vez repetitivamente para todos los cuatro hasta que se pueda obtener la secuencia deseada o la señal se degrade.

20 La Figura 5 ilustra una representación de los resultados de las mediciones de las nanoestructuras sensibles de detección después de siete ciclos que consiste en seguir las siguientes adiciones de nucleótidos Adenina, Citosina, Timina, Guanina, Adenina, Citosina, y finalmente Timina, en algunas realizaciones. Los ciclos primero y segundo que pueden causar un cambio en las propiedades de la nanoestructura sensible de detección, que se puede interpretar como CT como las dos primeras pares de bases en la cadena naciente. El tercer ciclo que puede proporcionar una gran señal, dos veces el orden de magnitud de los dos primeros ciclos (esto puede ser posible si la nanoestructura sensible de detección puede ser capaz de mediciones cuantitativas o semi-cuantitativas para diferenciar entre un tramo dinucleótido, un tramo trinucleótido y otros tramos homopolímeros).

25 Alternativamente, en algunas otras realizaciones, si la nanoestructura sensible de detección no es capaz de diferenciar entre adiciones de di-nucleótidos, tri-nucleótidos y otros homopolímeros, se pueden diseñar los nucleótidos sintéticos para permitir la adición de, en un ejemplo, un solo nucleótido y por lo tanto, puede prevenir la adición de otros nucleótidos. Tras la escisión del enlazador y la fracción indicadora, se puede restaurar la habilidad de añadir más nucleótidos a la cadena naciente. Por lo tanto, al menos en este ejemplo, la secuencia de este ciclo dará como resultado ACTT solamente.

30 La Figura 6 ilustra un complejo polimerasa añadiendo una base de nucleótido sintético a la cadena naciente como parte de la reacción de polimerización en algunas realizaciones. Téngase en cuenta que la molécula enlazadora sobresale hacia fuera del complejo polimerasa en este ejemplo particular, que no afecta perjudicialmente, por lo tanto, su acción, y "se estira" hacia la nanoestructura sensible de detección (en este caso un nanoalambre o un nanotubo) para ejercer su efecto en la estructura, a su vez puede ser medida y registrada seguido de eliminar por lavado el complejo polimerasa y los productos químicos requeridos para permitirle trabajar.

35 Una vez que se pueden tomar las mediciones, se pueden eliminar el enlazador y la fracción indicadora y se puede tomar otra medición (línea de base nucleótido + 1), antes de que se pueda unir el siguiente nucleótido en la secuenciación por reacción de síntesis.

La Figura 7 ilustra un diseño de casete de microfluidos diseñado para secuenciación portátil en algunas realizaciones.

40 a. Recepción de la muestra. Este elemento puede actuar como una barrera para la muestra para escapar y puede, sin embargo, ser capaz de aceptar muestras, al igual que la goma que puede tapar los tubos al vacío de sangre.

45 b. Cámara de lisis. Esta ilustra un micro-reactor simple, cámara que comprende un reactivo de lisis para romper las células y liberar el DNA genómico. Esta sección también se podría asemejar a un filtro que elimina las células sanguíneas si el polímero nucleótido diana puede estar libre en el suero sanguíneo.

50 c. Preparación de la muestra de ácido nucleico. Se puede aislar la fracción de polímero de nucleótidos de la muestra y extraer del resto de los constituyentes de la muestra (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.). Esto se puede lograr mediante algunos métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, esta cámara de microfluidos podría contener tecnología de filtro de Nexttec.

- 5
- d. Amplificación del polímero de nucleótidos diana. Esta sección puede amplificar el polímero de nucleótidos diana, que usa la reacción en cadena de la polimerasa, que podría emplear elementos de calentamiento u otras estrategias bien conocidas de ciclación de una mezcla de reacción a través de temperaturas diferentes requeridas para la PCR, para realizar la ciclación térmica requerida, o métodos isotérmicos de amplificación (como LAMB, RPA, etc.), que podrían no requerir calentamiento de la muestra.
- 10
- e. Procesamiento de la muestra. Esto se podría requerir al menos en algunas realizaciones para concentrar los ácidos nucleicos, o eliminar las cadenas de nucleótidos “sobresalientes” que podrían causar señal de fondo, antes de la secuenciación.
- f. General de microfluidos. Este describe el tamaño de los canales, flujo del fluido, válvulas y control, materiales y válvulas usados en algunas realizaciones.
- 15
- g. Conexiones metálicas. Estas conectan las nanoestructuras sensibles de detección (en este caso, nanoalambres) con el dispositivo de detección en algunas realizaciones.
- h. Disposiciones de nanoestructuras sensibles de detección. El canal de microfluidos puede estar estrechamente dispuesto con las nanoestructuras sensibles de detección (como nanoalambres, o nanotubos de carbono). Se pueden emplear dos métodos de colocación del DNA en el canal; 1. canales estrechos pueden permitir a tramos largos de DNA el desenrollamiento, migración & estiramiento hacia abajo de los canales lo que puede permitir largas longitudes de lectura si es necesario, y 2. se pueden localizar en los grupos de nanoalambres sondas/iniciadores teseladas y realizar múltiples reacciones cortas de secuenciación en paralelo a través de los canales.
- 20
- i. Este canal tejido de microfluidos se puede llenar, en algunas realizaciones, con reactivos separados por burbujas de aire. Como este canal de microfluidos se puede bombear, o un pequeño impulsor mueve los reactivos a lo largo, la secuencia de reactivos en el canal de microfluidos puede ejecutar la secuenciación por reacción de síntesis.

REIVINDICACIONES

1. Un método de secuenciación de un polinucleótido diana, que comprende:

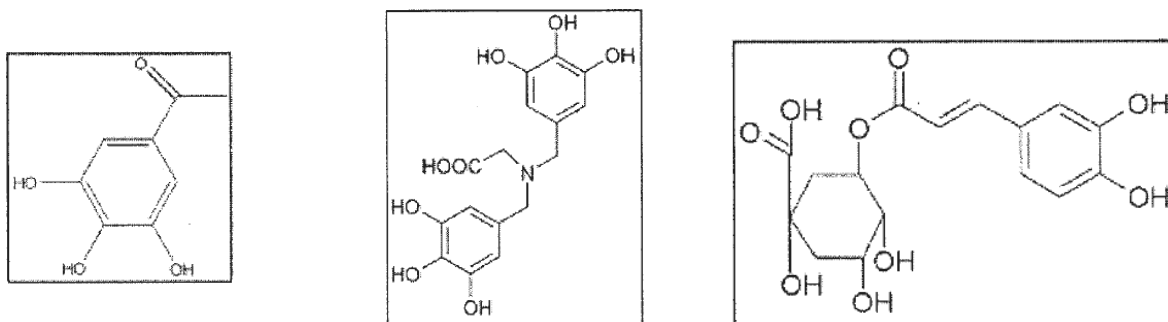
proporcionar dentro de una región de ensayo una nanoestructura sensible de detección que genera una señal relacionada con una propiedad de la nanoestructura dentro de la región de ensayo, en donde la nanoestructura está acoplada a un medio de detección de la señal;

hibridar dentro de la región de ensayo un iniciador con un polinucleótido diana, de tal manera que el polinucleótido diana-iniciador resultante está operativamente acoplado a la nanoestructura;

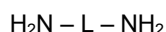
añadir uno o más nucleótidos y una polimerasa al polinucleótido diana-iniciador dentro de la región de ensayo en condiciones que mantengan la polimerización de una cadena naciente cuando al menos uno de los nucleótidos añadidos es complementario a la base en el polinucleótido diana corriente abajo del iniciador, en donde el nucleótido añadido comprende una fracción indicadora de carga masa y un enlazador, en donde la fracción indicadora de carga masa está configurada para sobresalir hacia fuera de la cadena naciente con el fin de estirarse hacia la nanoestructura sensible de detección; y

detectar tras la adición de dichos uno o más nucleótidos un cambio en la señal que es característico de al menos un nucleótido añadido a la cadena naciente.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la propiedad es una carga eléctrica.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la fracción indicadora de carga masa está configurada para ser removible .
4. El método de la reivindicación 3, en donde la fracción indicadora de carga masa es eliminada del nucleótido añadido después de detectar la señal.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la fracción indicadora de carga masa está configurada para que no afecte a la polimerización de la cadena naciente por la polimerasa.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la fracción indicadora de carga masa comprende un esqueleto aromático y/o alifático que comprende uno o más de un grupo amino terciario, un grupo alcohol hidroxilo, un grupo hidroxifenólico, o cualquier combinación de los mismos.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la fracción indicadora de carga masa comprende uno o más de los siguientes grupos de derivados de los mismos:



8. El método de la reivindicación 1, en donde el enlazador comprende una molécula de la siguiente fórmula general:

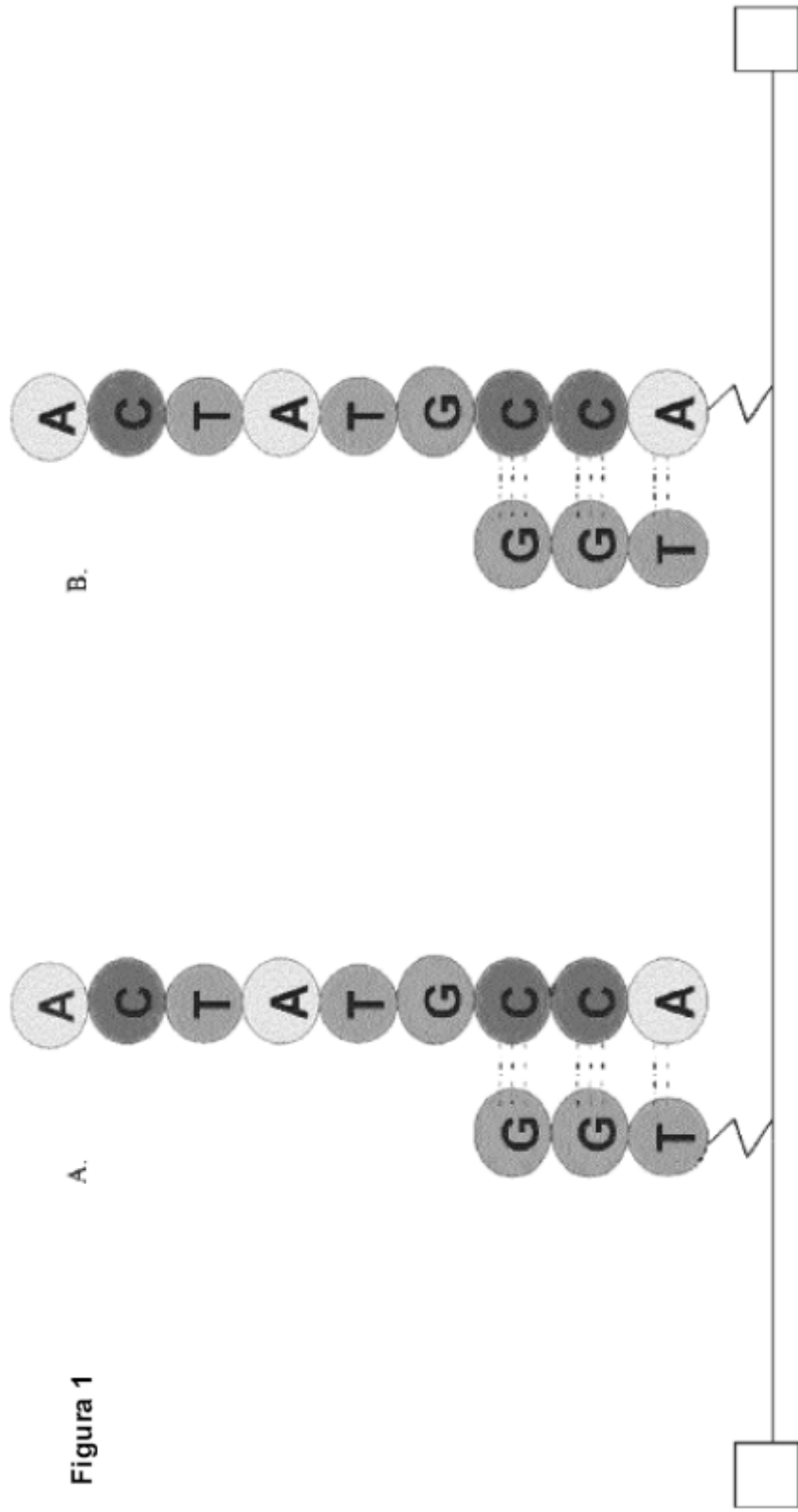


en donde L comprende una cadena lineal o ramificada que comprende un grupo alquilo, un grupo oxialquilo, o una combinación de los mismos.

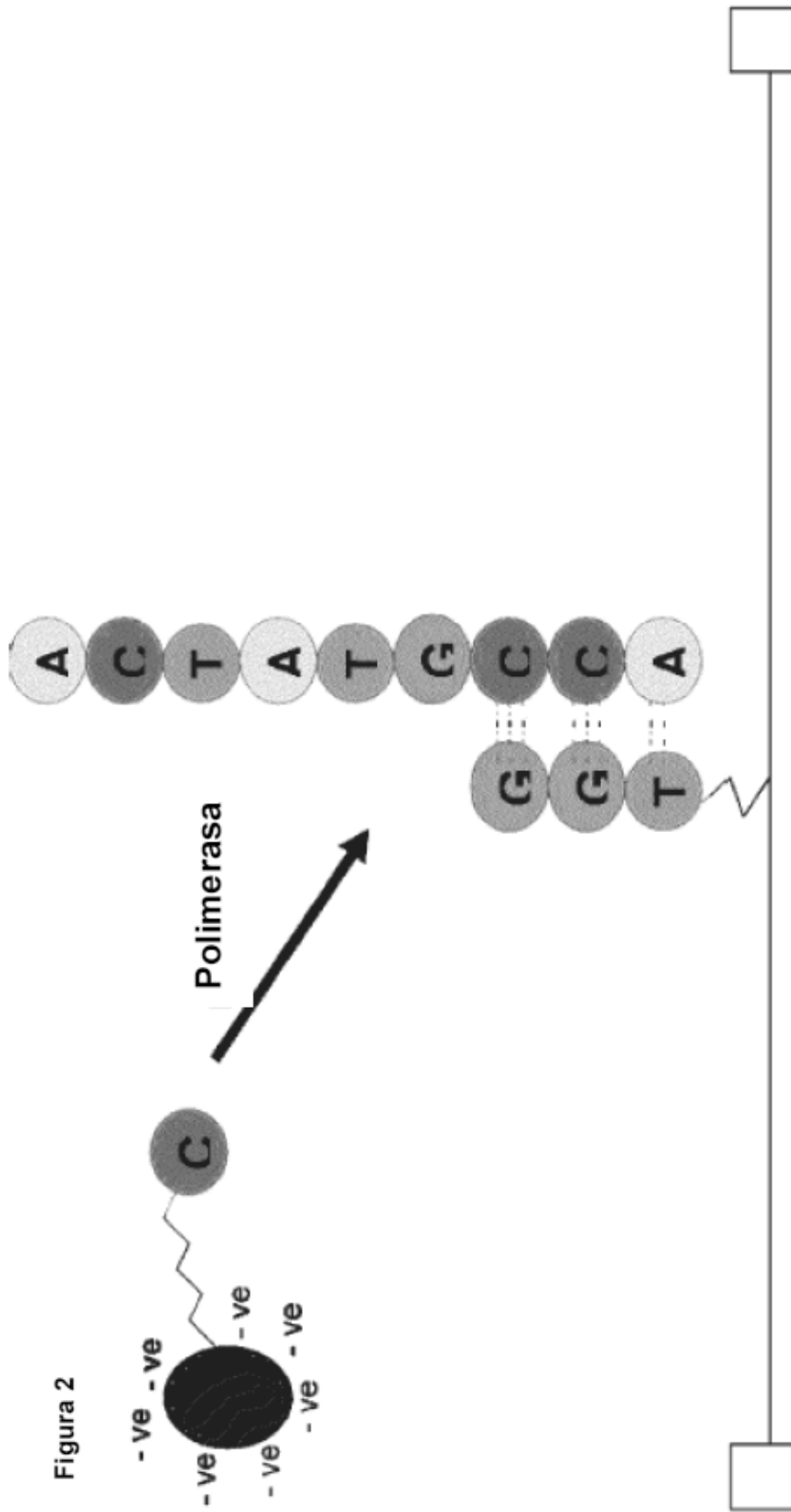
9. El método de la reivindicación 8, en donde L comprende una cadena lineal que comprende un grupo alquilo, un grupo oxialquilo, o una combinación de los mismos.
10. El método de la reivindicación 9, en donde un número de átomos de carbono en la cadena lineal es de 1 a 100.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el nucleótido añadido comprende además una molécula escindible cap en el grupo 5' fosfato para que se prevenga la adición de otro nucleótido hasta que se elimine el cap escindible.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el enlazador está unido al grupo 5' fosfato del nucleótido añadido, que actúa así como un cap.
- 5 13. El método de la reivindicación 1, en donde se añade más de un nucleótido a la región de ensayo, pero en donde no se añade ningún nucleótido sucesivo a la cadena naciente hasta después de que se detecte la señal que es característica del nucleótido predecesor añadido a la cadena naciente.
14. El método de la reivindicación 1, en donde el acoplamiento operativo entre el iniciador-polinucleótido diana y la nanoestructura comprende la inmovilización del iniciador a la nanoestructura sensible de detección.
15. El método de la reivindicación 1, en donde el acoplamiento operativo entre el iniciador-polinucleótido diana y la nanoestructura comprende la inmovilización del polinucleótido diana a la nanoestructura sensible de detección.
- 10 16. El método de la reivindicación 1, en donde hibridar el iniciador con el polinucleótido diana comprende hibridar el iniciador con un oligonucleótido que ha sido ligado al extremo 5' del polinucleótido diana.
17. El método de la reivindicación 1, en donde la nanoestructura sensible de detección se selecciona del grupo que consiste en un nano alambre, un nanotubo, un nanohuevo, una nanopera, un nanoporo, un biosensor transistor de efecto de campo tipo FET, un transistor planar de efecto de campo, y cualquier nanoestructura conductora.
- 15 18. El método de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido diana y el iniciador comprenden moléculas que se seleccionan del grupo que consiste en DNA, RNA, ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA), polímero sintético de nucleótidos, y derivados de los mismos.
- 20 19. El método de la reivindicación 1, en donde el nucleótido añadido comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un desoxiribonucleótido, un ribonucleótido, un nucleótido peptídico, un morfolino, un nucleótido bloqueado, un nucleótido glicol, un nucleótido de treosa, un nucleótido sintético, y derivados de los mismos.
- 25 20. El método de la reivindicación 1, en donde los medios para detectar la señal se seleccionan de un grupo que consiste en detección piezoeléctrica, detección electroquímica, detección electromagnética, fotodetección, detección mecánica, detección acústica y detección gravimétrica.
21. Un dispositivo para secuenciar un polinucleótido diana, que comprende un casete de microfluidos que comprende:
- 30 un elemento de recepción de muestra para introducir una muestra biológica que comprende el polinucleótido diana dentro del casete;
- una cámara de lisis para desestructurar la muestra biológica para liberar una fracción soluble que comprende ácidos nucleicos y otras moléculas;
- una cámara de separación de ácido nucleico para separar los ácidos nucleicos de las otras moléculas en la fracción soluble;
- una cámara de amplificación para amplificar el polinucleótido diana;
- 35 una región de ensayo que comprende una disposición de uno o más nanoestructuras sensibles de detección que generan una señal relacionada con una propiedad de las nanoestructuras, en donde la región de ensayo está configurada para permitir el acoplamiento operativo del polinucleótido diana con las nanoestructuras; y
- un elemento conductor para conducir la señal a un detector, en donde el detector está configurado para detectar un cambio en la señal tras la adición de un nucleótido que comprende una fracción indicadora de carga a la
- 40 región de ensayo.
22. El dispositivo de la reivindicación 21, en donde la muestra biológica comprende cualquier fluido corporal, células y sus extractos, tejidos y sus extractos, y cualquier otra muestra biológica que comprende el polinucleótido diana.
- 45 23. El dispositivo de la reivindicación 21, en donde el dispositivo es redimensionado y configurado para que sea portátil.

Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.



Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.



Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.

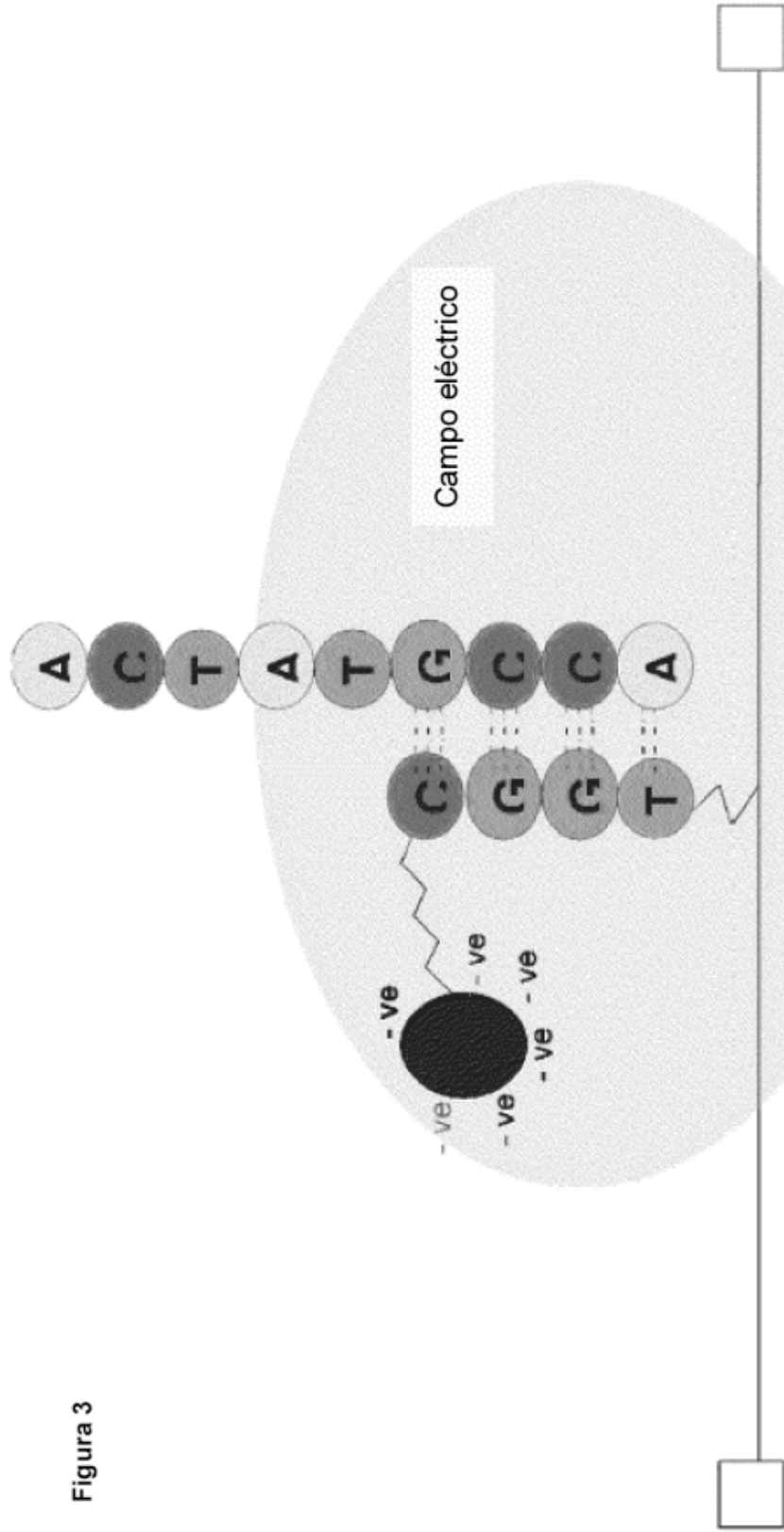


Figura 3

Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.

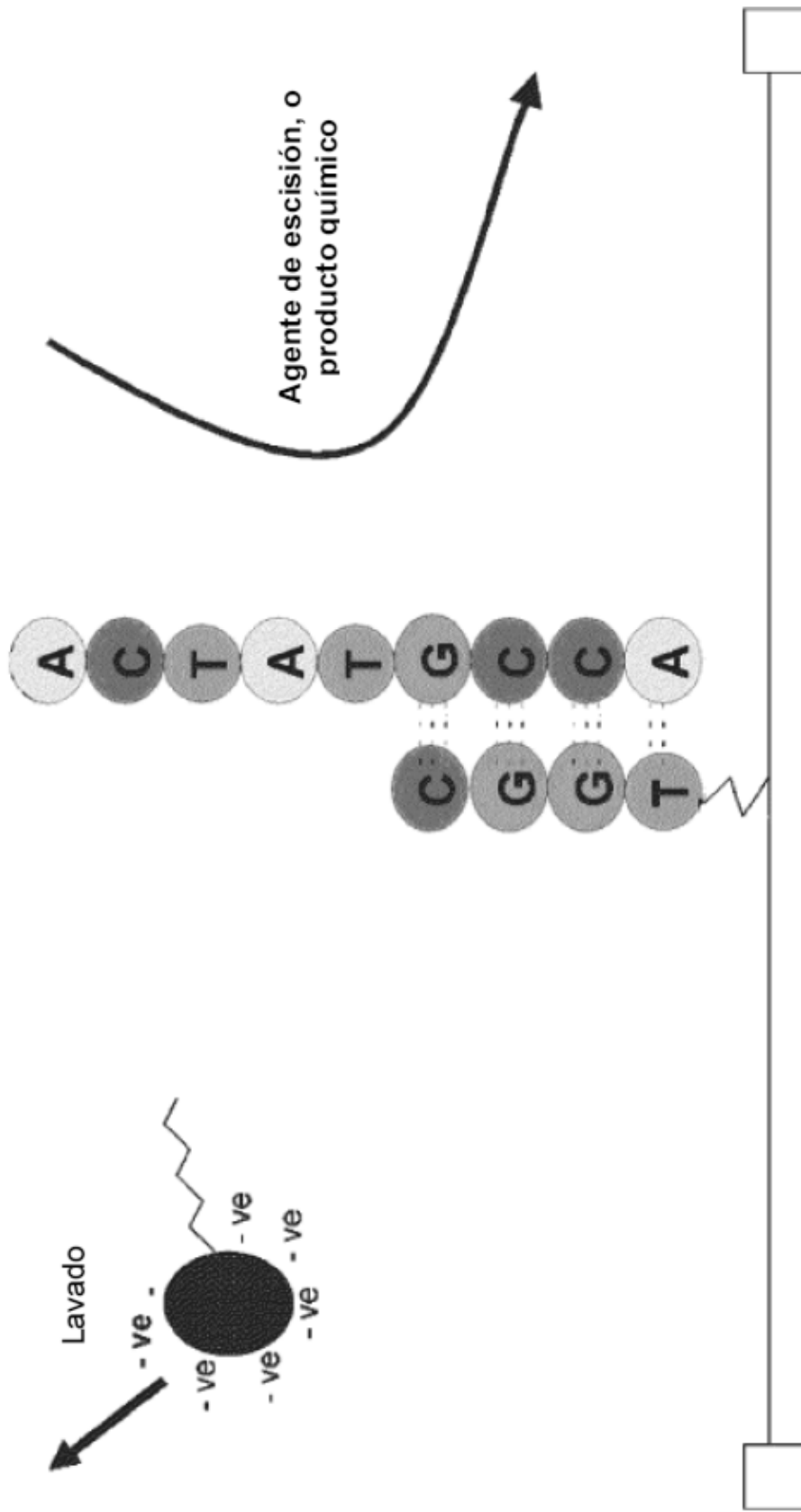


Figura 4

Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.

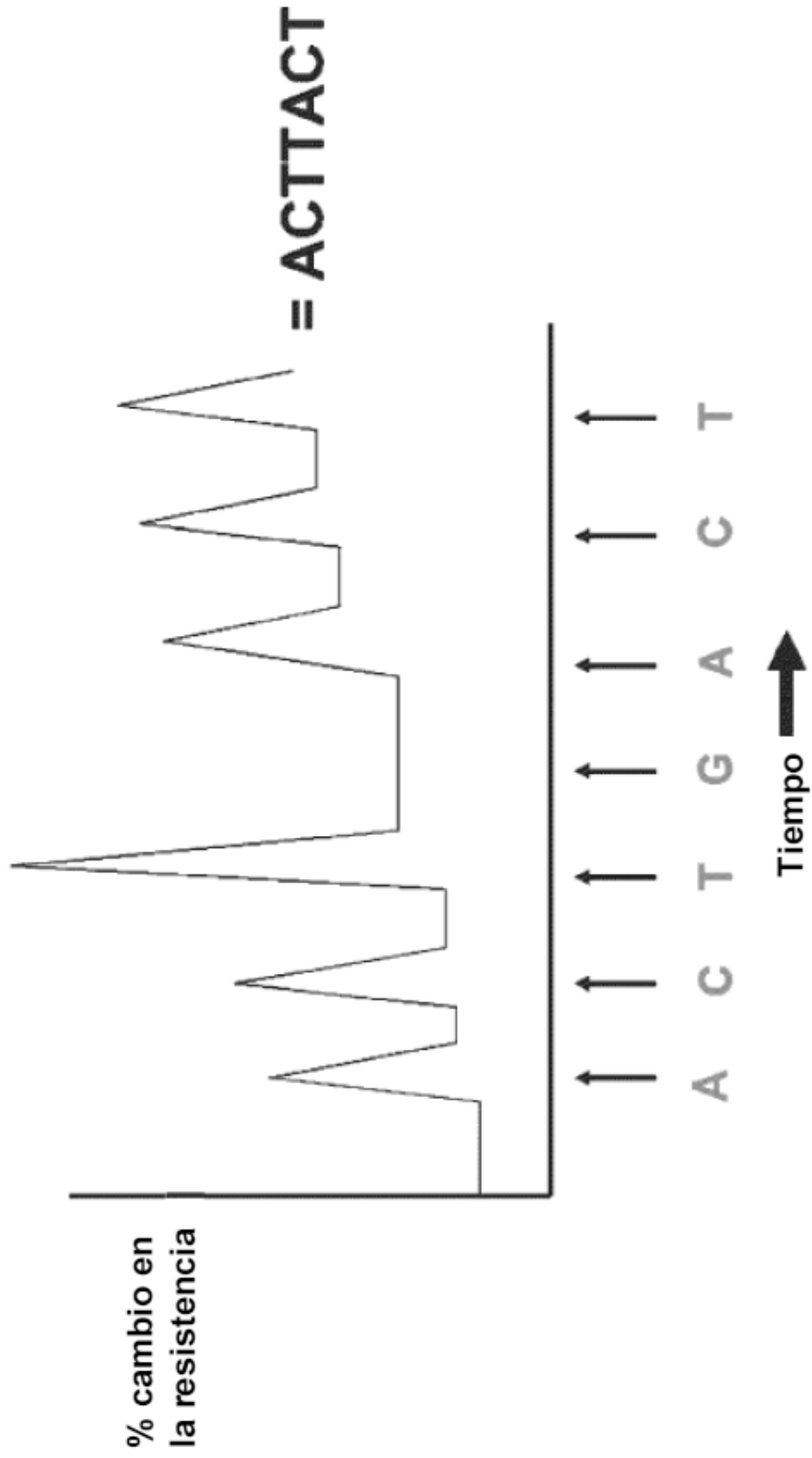


Figura 5

Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.

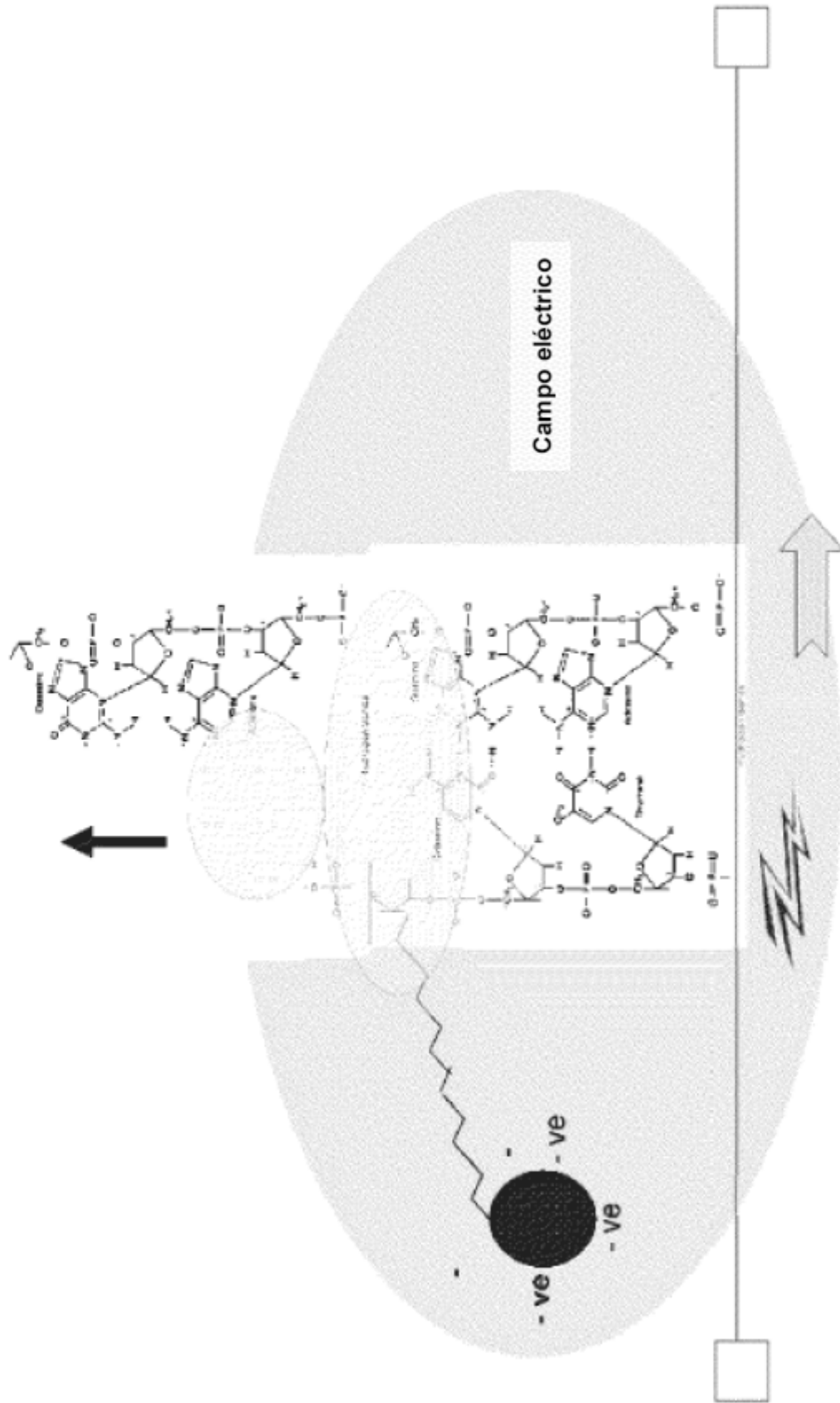


Figura 6

Métodos y kits para secuenciación de ácidos nucleicos
O'Halloran et al.

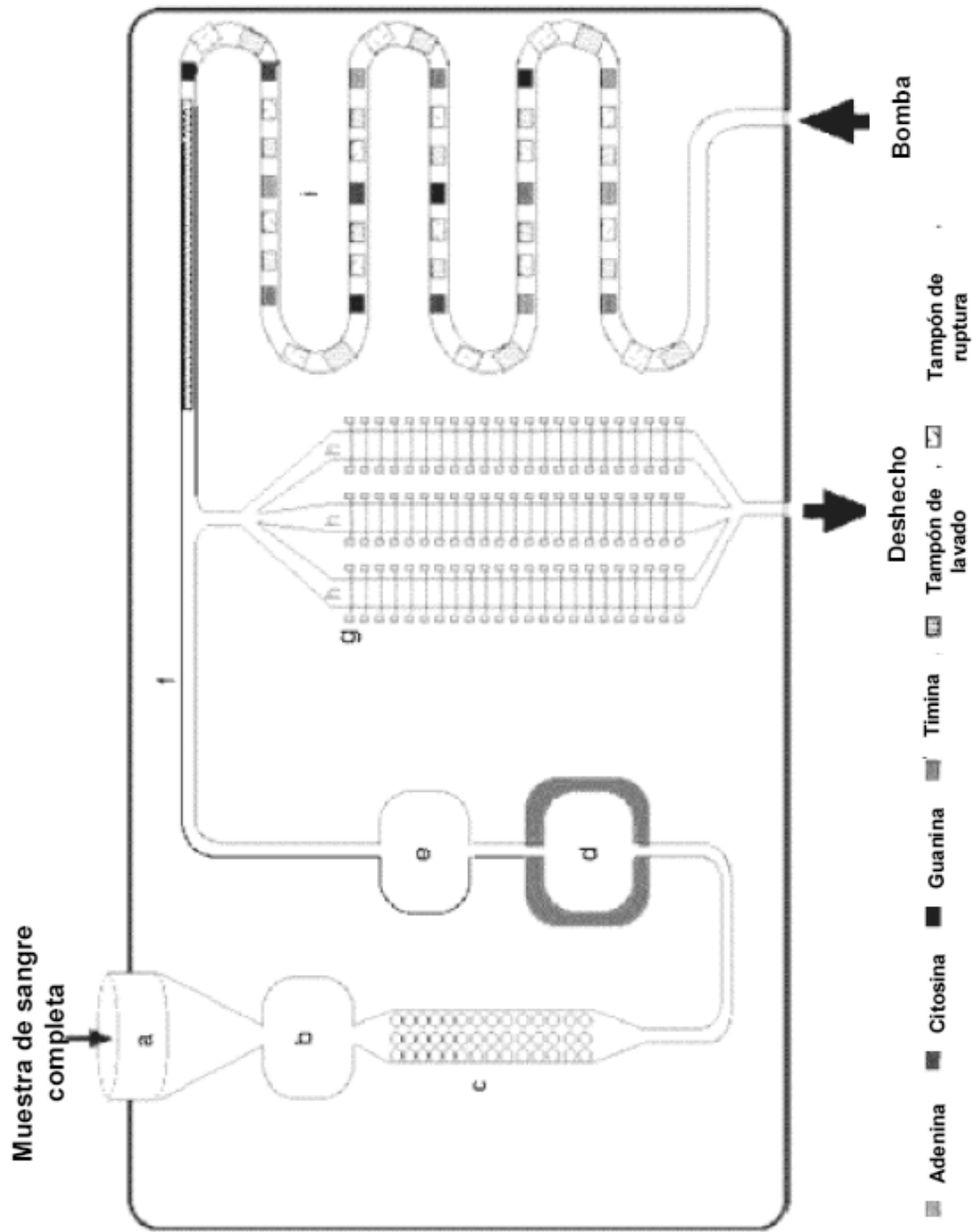


Figura 7