

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 398**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/GB2013/051930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13740352 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2875153**

54 Título: **Aparato y procedimiento de detección**

30 Prioridad:

18.07.2012 GB 201212775

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

23.03.2017

73 Titular/es:

**DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)
Ugli Campus Block C, 56 Wood Lane
London W12 7 SB , GB**

72 Inventor/es:

**ANSARI, ZAHID;
AMIN, KRISHNA;
JORGENSEN, GINNY;
KOLB, KURT;
MORLEY, DANIEL;
PATEL, ALPESH;
REED, SAM;
SHEPHERD, LEILA y
TOUMAZOU, CHRISTOFER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 606 398 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato y procedimiento de detección

Antecedentes

5 Durante las últimas dos décadas ha habido un rápido desarrollo en el análisis de los ácidos nucleicos, en concreto en el campo de la amplificación de ácidos nucleicos y la tecnología de secuenciación de ADN, con un variedad creciente de instrumentación ahora disponible. Los procedimientos convencionales de detección y análisis de una secuencia de ácido nucleico se basan principalmente en colorantes intercalantes de ácido nucleico fluorescentes, sondas de oligonucleótido marcadas de forma fluorescente, nucleótidos marcados de forma fluorescente o radiactiva.

10 Posteriormente se ha desarrollado un nuevo procedimiento para analizar la síntesis y la secuenciación de ácidos nucleicos utilizando un sistema de detección a base de semiconductores, tal como un transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET, siglas del inglés *ion sensitive field effect transistor*), véase por ejemplo el documento de los inventores publicación PCT WO 03/073088. Una plataforma a base de un transistor de efecto de campo sensible a iones, a diferencia de los sistemas de análisis de ácidos nucleicos a base de fluorescencia convencionales, no necesita para la detección instrumentos ópticos caros o isótopos radioactivos peligrosos, haciendo así a esta plataforma una alternativa rentable, segura y simple para el análisis de la secuenciación y la amplificación de ácidos nucleicos.

20 Concretamente se ha empleado un ISFET, el cual mide la concentración de iones en solución, para detectar la incorporación de nucleótidos en una cadena de ácido nucleico mediante la detección del cambio en la concentración del ion hidrógeno (H^+ , protón) resultante de la reacción.

Los iones hidrógeno se liberan durante la reacción de polimerización de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, la Ecuación I a continuación demuestra la liberación del ion hidrógeno que facilita la hidrólisis mediada por la ADN polimerasa de un único deoxinucleótido:



25 en la que dNTP es un nucleósido trifosfato, dNMP es un nucleósido monofosfato, z es un número entero o fracción que describe el número promedio de protones generado por renovación de nucleótido, H^+ es un protón y PPi es un pirofosfato (grupo saliente o producto de reacción).

La reacción puede conducirse para producir adicionalmente más iones hidrógeno mediante la hidrólisis del pirofosfato en dos ortofosfatos (Pi). Tal reacción química secundaria está facilitada por las pirofosfatasas y se representa en la Ecuación II:



35 La dinámica de trabajo de la metodología de 'secuenciación por síntesis' actual se puede dividir en general en preparación del molde, secuenciación y detección, y análisis de los datos. La primera etapa, la preparación del molde, habitualmente implica amplificar el molde de forma clonal para lograr suficiente cantidad de molde amplificado para detectar de forma fiable la señal de incorporación de nucleótidos durante la etapa de secuenciación. Actualmente, tal etapa de amplificación clonal se realiza habitualmente en un compartimento separado de la reacción de secuenciación y normalmente en una máquina separada. Sin embargo, tal separación espacial de las dos etapas necesita una mano de obra cualificada, varias personas trabajando al mismo tiempo, introduce errores acumulados y puede aumentar la pérdida de muestra, disminuyendo así la sensibilidad de detección de la secuenciación y aumentando los costos.

40 Para facilitar una secuenciación precisa, la práctica convencional es amplificar el ácido nucleico. Se conocen diversos procedimientos para la amplificación de ácidos nucleicos. De hecho, la publicación PCT (WO2008/107014) desvela un procedimiento de control de qPCR utilizando Detección del pH en Estado Sólido, por ejemplo un ISFET. El control de la reacción es por medio de la detección de un cambio del pH que resulta de la liberación de protones en presencia de una secuencia diana (ácido nucleico) a medida que la amplificación progresa más allá de un número umbral de ciclos para superar la capacidad tamponadora de una muestra. No se desvela la detección de la secuencia a través de la secuenciación por síntesis, solo la detección de la actividad de amplificación en sí. El documento WO2008/076406A2 también desvela diversos procedimientos de amplificación, tales como la amplificación puente, en el contexto de los ISFET.

50 También se conocen procedimientos de secuenciación que utilizan los ISFET para la determinación. El documento US 2010/031398A1 desvela un aparato para su uso en un procedimiento de secuenciación, comprendiendo el aparato una serie de micropocillos y sensores, los cuales pueden ser los ISFET. Los sensores tienen una estructura de ventana flotante que a su vez tiene una capa de material de protección del analito dispuesta sobre la ventana flotante. El material de protección tiene un grosor de hasta aproximadamente 600 Angstroms. También se proporcionan procedimientos de fabricación. Sin embargo, estos procedimientos de secuenciación operan como un

procedimiento diferente sobre [colonias] pre preparadas de ADN.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un aparato que sensible a iones para la amplificación y secuenciación, y un procedimiento para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos que supere o mitigue las desventajas que plantean los procedimientos existentes de secuenciación.

- 5 Es un objeto adicional de la invención proporcionar un aparato sensible a iones para la amplificación y secuenciación que supere las dificultades derivadas de la necesidad de combinar la amplificación y la secuenciación posterior sin ninguna separación espacial.

El documento WO2008/076406 describe la provisión y uso de una serie FET a gran escala para la detección de los cambios de concentración de un analito.

- 10 El documento WO2008/107014 describe el uso de los ISFET para realizar detección en tiempo real en la amplificación de ácidos nucleicos.

El documento WO2011/123246 describe el uso de perlas que tienen acopladas a ellas polinucleótidos para inmovilizar objetos clonales.

Sumario de la invención

- 15 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar los moldes a una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a un ISFET;

amplificar los moldes;

inmovilizar al menos un molde dentro de cada pocillo; después

- 20 crear una población clonal dentro de cada pocillo; y después

secuenciar las colonias de molde en los pocillos.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar la pluralidad de moldes a una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a un ISFET;

- 25 proporcionar un sello a los pocillos para aislar los pocillos adyacentes;

amplificar de forma clonal los moldes sobre un sustrato sólido en cada pocillo;

retirar el sello; y

secuenciar los moldes amplificados en los pocillos.

- 30 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona un aparato de detección para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el aparato:

- un chip semiconductor que tiene una pluralidad de ISFET,

- una estructura microfluida que define una pluralidad de pocillos, en la que cada pocillo está expuesto a al menos uno de los ISFET;

- 35 - un sello que se puede retirar dispuesto para cubrir una superficie de la estructura microfluida aislando así sustancialmente cada pocillo de pocillos adyacentes;

- medios de amplificación para amplificar los polinucleótidos molde y comprendiendo al menos un medio de calentamiento adecuado para llevar a cabo la amplificación del polinucleótido molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y

- en el que el pocillo se dispone para crear una población clonal dentro de cada pocillo;

- 40 - medios de secuenciación para secuenciar las colonias molde en cada pocillo.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona un aparato de detección para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el aparato:

- un chip semiconductor que tiene una pluralidad de ISFET,

- 45 - una estructura microfluida que define una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a al menos uno de los ISFET;

- un sello que se puede retirar dispuesto para cubrir una superficie de la estructura microfluida aislando así sustancialmente cada pocillo de pocillos adyacentes;
- medios de amplificación para inmovilizar y amplificar los polinucleótidos molde dentro del pocillo y comprendiendo al menos un medio de calentamiento adecuado para llevar a cabo la amplificación del polinucleótido molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y
- medios de secuenciación para secuenciar los polinucleótidos molde amplificados en los pocillos.

Como se describe, durante la amplificación dentro de los pocillos se proporciona un sello que se puede retirar. Este sirve para sellar (es decir contener y aislar) reacciones de amplificación que se producen en pocillos adyacentes. Las tapas de sellado que se pueden retirar previenen la evaporación y la contaminación cruzada entre reacciones durante la amplificación, proporcionando así condiciones óptimas para la máxima eficacia de amplificación. Las tapas de sellado que se pueden retirar pueden ser un material líquido o uno sólido. Las tapas de sellado líquidas pueden ser aceite mineral o aceite de silicona. Las tapas de sellado sólidas pueden ser almohadillas de silicona resistentes o elastómeros termoplásticos (TPE).

Se proporcionan reactivos adecuados para las fases de amplificación y secuenciación y se discuten en el presente documento medios para entregarlos como parte de los medios de amplificación y secuenciación respectivos. No obstante, se apreciará que los reactivos básicos incluyen el polinucleótido molde, un entorno fluido con tampones adecuados, una fuente de nucleótidos (para la amplificación y/o secuenciación) y una polimerasa adecuada para la reacción respectiva.

El medio de secuenciación para secuenciar al polinucleótido molde amplificado en dicho pocillo o cámara, preferentemente comprende una fuente de nucleótidos para la inserción, tales como los dNTP. Por lo tanto, la invención proporciona medios para lograr esto. Estos medios preferentemente pueden incluir una fuente de nucleótidos, preferentemente deoxinucleótidos trifosfato (los dNTP). La fuente comprende preferentemente 4 o más suministros separados, uno para cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP y dUTP). En una realización, puede haber un suministro para cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP y dUTP, permitiendo así que los moldes de ADN o ARN se secuencien mediante el mismo aparato. La fuente o suministro preferentemente también comprende una bomba para dicho nucleótido. Se conocen los mecanismos para el enrutamiento y control adecuados; véase por ejemplo la Figura 8 y la descripción adjunta en el documento US 2010/031398A1, incorporado por el presente como referencia en su totalidad.

Las polimerasas de amplificación adecuadas para el termociclado y la amplificación isotérmica incluyen, pero sin limitación, polimerasa Taq, polimerasa Pfu, polimerasa Phusion, polimerasa Vent, polimerasa Bst, polimerasa exo Klenow, ADN polimerasa de phi29 y mutantes y derivados de las mismas. Las pol (polimerasas) de amplificación se pueden proporcionar en el chip antes de la adición de la muestra o del ácido nucleico molde, por ejemplo mediante impresión o aplicación puntual. Preferentemente, en ese caso, también se inactivan después de completar la amplificación. Como alternativa, se pueden añadir al sitio de amplificación en/sobre el chip cuando se necesite. Las bombas, los medios de enrutamiento y los medios de control adecuados para esto se prevén según se necesite.

Las polimerasas de secuenciación adecuadas (no limitadas a las ARN o ADN polimerasas) incluyen, pero sin limitación, el fragmento exo-Klenow de la ADN polimerasa I, T4 exo, Therminator, polimerasa Bst, ADN polimerasa de phi29 y mutantes y derivados de las mismas. Las pol (polimerasas) de secuenciación se pueden proporcionar sobre el chip antes de la adición de la muestra o ácido nucleico molde, por ejemplo imprimiendo o aplicando de forma puntual. Preferentemente, en ese caso, además se inactivan durante la amplificación y se reactivan cuando se completa la amplificación. Como alternativa, se pueden añadir al sitio de la secuenciación (es decir el pocillo) cuando se necesite. Las bombas, los medios de conducción y los medios de control adecuados para esto se prevén según se necesite.

La amplificación puede ser por medio de amplificación puente, reacción en cadena de la polimerasa, amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA, sigla del inglés *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*); Deiman B y col., 2002), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, sigla del inglés *strand-displacement amplification*; Andras S C, 2001), amplificación por círculo rodante (documento US5714320) y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, sigla del inglés *loop mediated isothermal amplification*), todas las cuales son técnicas bien conocidas en la materia.

Preferentemente, el ISFET controla la reacción de amplificación. En cualquier caso el ISFET se posiciona de forma que tenga la capacidad de detectar la secuenciación en o dentro de un pocillo, por lo que el ISFET también puede emplearse para controlar la amplificación, cuando también se produce en dicho pocillo. Como alternativa, el ISFET puede desactivarse durante la amplificación para ahorrar energía. El control de la reacción de amplificación permite al sistema determinar cuándo están presentes en un pocillo colonias de molde grandes de forma adecuada, determinación que se puede proveer a un controlador para cambiar o detener el procedimiento de amplificación en un pocillo o en todos los pocillos.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de un ácido nucleico molde, comprendiendo el procedimiento amplificar un ácido nucleico molde en una muestra y secuenciar el

ácido nucleico amplificado en el presente aparato. Se describen anteriormente, y en general en el presente documento, otras etapas del procedimiento preferentes, pero es preferente que el ácido nucleico en la muestra se fragmente antes de la amplificación para romperlo en porciones dimensionadas de forma útil. Se pueden secuenciar de esta manera por ejemplo moléculas de ADN grandes, incluso genomas enteros.

- 5 Preferentemente, el ácido nucleico en la muestra se amplifica y posteriormente se secuencia en el mismo pocillo o cámara.

En determinadas realizaciones, el aparato de detección tiene al menos un oligonucleótido inmovilizado dentro de cada pocillo, en que el oligonucleótido no está unido a un polinucleótido pero está adaptado para unirse al polinucleótido molde.

- 10 Como se describe, el aparato de detección comprende un sello que se puede retirar dispuesto para cubrir una superficie de la estructura microfluida, aislando sustancialmente así cada pocillo de pocillos adyacentes.

En algunas realizaciones el sello de retirada sólido es una membrana flexible o un adhesivo tal como un adhesivo sensible a la presión.

- 15 En algunas realizaciones, el aparato se dispone de forma que la amplificación de cada molde se produce en el mismo pocillo que la secuenciación de ese molde.

En algunas realizaciones, la superficie de cada pocillo del aparato de detección se modifica con medios para inmovilizar oligonucleótidos. También es preferente un aparato de detección en el que en cada uno de los pocillos solo está disponible un único oligonucleótido para hibridar con el polinucleótido molde en la muestra. En algunas realizaciones, se pueden utilizar perlas como una superficie para la inmovilización de ácido nucleico amplificado.

- 20 El aparato puede comprender un calentador en el que el calentador es un elemento calefactor resistivo integrado en el chip. En algunas realizaciones se forma una ruta a partir de una o más capas metálicas.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender adicionalmente las etapas de:

- 25 - proporcionar el molde a los pocillos en una proporción de un molde con respecto a entre 0,4 y 2 pocillos. En algunas realizaciones un molde con respecto a aproximadamente cada un pocillo.
- proporcionar un sello a los pocillos para aislar pocillos adyacentes durante la amplificación del molde
- retirar el sello antes de la secuenciación de los moldes amplificados.

En algunas realizaciones, el procedimiento puede comprender adicionalmente las etapas de:

- 30 proporcionar un único sitio de unión al molde en cada pocillo;
proporcionar un sello a los pocillos para aislar pocillos adyacentes durante la amplificación del molde; y
retirar el sello antes de la secuenciación de los moldes amplificados.

El único sitio de unión al molde puede estar sobre una perla. En algunas realizaciones en las que ya sea (a) la perla está unida a una superficie de cada pocillo mediante un sitio de unión lo suficientemente grande como para unirse a una perla o (b) dicha perla se dimensiona de forma que solo una de tales perlas pueda ajustarse en cada pocillo.

- 35 En aún otra realización, el procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de controlar las cargas en los electrodos expuestos a cada pocillo para atraer moldes a cada pocillo, en algunas realizaciones en las que la carga en los electrodos individuales en cada pocillo se retira o se invierte después la detección de la unión de un molde a una superficie de ese pocillo.

En una realización, es preferente que los oligonucleótidos sean específicos de secuencia de modo que se unan una o más cadenas de un tipo de molde diana a un único sustrato sólido.

- 40 Los oligonucleótidos inmovilizados sobre una superficie del pocillo o dentro del pocillo pueden secuestrarse. En algunas realizaciones mediante el recubrimiento de los oligonucleótidos con cera. El secuestro de oligonucleótidos inmovilizados puede eliminarse calentando la cera. En algunas realizaciones, después del lavado de molde no unido de los pocillos.

- 45 Es preferente que los procedimientos comprendan adicionalmente la etapa de proporcionar a cada pocillo una pluralidad de perlas que tengan sitios de unión adicionales para la amplificación clonal del molde unido en ese pocillo.

Es preferente que los procedimientos comprendan adicionalmente antes de la secuenciación la etapa de retirar por lavado los moldes no unidos de los pocillos.

- 50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un aparato de detección que comprende un chip para la amplificación y la secuenciación integradas de un polinucleótido molde en una muestra, comprendiendo el aparato un chip con al menos un ISFET en un pocillo o cámara; un medio de amplificación para amplificar el

polinucleótido molde sobre una superficie de dicho chip y comprendiendo al menos un medio de calentamiento adecuado para llevar a cabo la amplificación del polinucleótido molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y un medio de secuenciación para secuenciar el polinucleótido molde amplificado en dicho pocillo o cámara.

- 5 De acuerdo con todavía un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de un ácido nucleico molde, comprendiendo el procedimiento amplificar un ácido nucleico molde en una muestra y secuenciar posteriormente el ácido nucleico amplificado, utilizando el aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un aparato de detección para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el aparato:

- un chip semiconductor que tenga una pluralidad de ISFET,
- una estructura microfluida que define una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a al menos uno de los ISFET;
- medios de amplificación para inmovilizar y amplificar los polinucleótidos molde dentro de los pocillos y que comprendan al menos un medio de calentamiento adecuado para llevar a cabo la amplificación del polinucleótido molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y
- medios de secuenciación para secuenciar los polinucleótidos molde amplificados en los pocillos.

De acuerdo con aún otro aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la secuencia de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el procedimiento:

- 20 proporcionar la pluralidad de moldes a una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a un ISFET;
- amplificar de forma clonal los moldes sobre un sustrato sólido en cada pocillo; y
- secuenciar los moldes amplificados en los pocillos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista de perfil de un sistema de detección de pH;

- 25 La Figura 2 es una representación esquemática de una realización de la integración de la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos en el mismo pocillo; y

- La Figura 3 es una representación esquemática de una realización de un CI fabricado con un CMOS (sigla del inglés: *complementary metal-oxide-semiconductor*, semiconductor complementario de óxido metálico) con los ISFET, sensores de temperatura, calentador, conjunto de circuitos de procesamiento de señales y conversión analógica a digital.
- 30

La Figura 4 es una vista de perfil de una realización de una estructura de pocillo.

La Figura 5 es una representación esquemática de distintas realizaciones de un sello que se puede retirar.

La Figura 6 es una vista en planta superior de un chip de acuerdo con una realización de la invención, que muestra elementos calefactores lineales paralelos, sensores de temperatura y sensores ISFET;

- 35 La Figura 7 es una vista en sección transversal de un chip tomada de forma general en la línea AA de la Figura 6, que muestra los elementos calefactores lineales paralelos, los sensores de temperatura y los sensores ISFET;

La Figura 8 ilustra ejemplos de diversas disposiciones de los elementos calentadores con respecto a los sensores ISFET;

- 40 La Figura 9 es una vista en planta superior de un chip de acuerdo con una realización de la invención, que muestra a los elementos calefactores, los sensores de temperatura y los sensores ISFET pixelados;

La Figura 10 es una vista en sección transversal del chip tomada de forma general en la línea BB de la Figura 9, que muestra a los elementos calefactores, los sensores de temperatura y los sensores ISFET pixelados; y

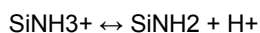
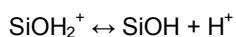
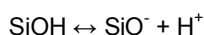
- 45 La Figura 11 es una representación esquemática de un conjunto de circuitos conductores del calentador, de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción detallada

- Los inventores han ideado un procedimiento y aparato para combinar los dos (amplificación y secuenciación de un ácido nucleico diana), proporcionando así un dispositivo integrado. Una ventaja de esto es que se puede acelerar la provisión del resultado, es decir la secuencia del ácido nucleico diana. Otra ventaja es que un sistema integrado aborda varios problemas que se suelen resolver mediante procedimientos manuales y herramientas de laboratorio. Además, tal integración puede aumentar la velocidad de la dinámica de trabajo con mínimo tiempo de práctica y reducir la pérdida de muestra. Además, con un sistema integrado que adicionalmente está automatizado, será posible trasladar las aplicaciones para secuenciación desde los científicos especialistas en los laboratorios a un entorno más comercial para su uso por parte de profesionales, enfermeras o técnicos.
- Sin embargo, la dificultad en combinar las etapas de amplificación y secuenciación está en que las condiciones óptimas para cada una pueden ser bastante diferentes y hay muy poca sinergia para materializar entre los instrumentos. Normalmente, cada una de estas etapas necesita un instrumento complejo, optimizándose cada instrumento de forma mecánica, eléctrica y bioquímica para realizar la función. Por ejemplo, la PCR de emulsión necesita para la amplificación una mezcla de fluidos oleosos y acuosos que contienen nucleótidos no marcados y bioquímica/aparatos para detectar las perlas que tengan solo una única población clonal. Por el contrario, la etapa de secuenciación necesita bioquímica con nucleótidos marcados y aparatos para detectar la fluorescencia. Además, las porciones desechables utilizadas en las pruebas con frecuencia son bastante simples (por ejemplo un portaobjetos de vidrio) proporcionándose toda la funcionalidad por parte de los instrumentos.
- En un aspecto las presentes invenciones proporcionan un procedimiento y un aparato que aportan funcionalidad a la porción desechable, para reducir la complejidad del instrumento fijo y combinar etapas del procedimiento utilizando química y aparato que se solapan.
- Se apreciará que la expresión ácido nucleico incluye ácidos polinucleicos tales como ADN o ARN y ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria, según sea apropiado, siendo cualquiera de ellas preferente.
- La divulgación de la publicación de los inventores WO2008/107014 es útil en la amplificación de ácidos polinucleicos.
- Aunque la invención se ha descrito en términos de realizaciones preferentes como se expone anteriormente, debe comprenderse que estas realizaciones son solo ilustrativas y que las reivindicaciones no se limitan a las realizaciones. Las personas con experiencia en la materia tendrán la capacidad de hacer modificaciones y alternativas a la vista de la divulgación, las cuales se contemplan que caen dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Cada característica desvelada o ilustrada en la presente memoria descriptiva puede incorporarse a la invención, ya sea sola o en cualquier combinación apropiada con cualquier otra característica desvelada o ilustrada en el presente documento.
- La presente invención proporciona un aparato que sensible a iones y un procedimiento para la secuenciación por semiconductor. Esta estrategia permite que tengan lugar en el mismo pocillo tanto la amplificación clonal como la secuenciación del ácido nucleico amplificado de forma clonal (por ejemplo ADN). Por lo tanto, se proporciona preferentemente un aparato completamente integrado que proporciona los medios para un sistema de resultado de muestra a secuenciación.
- El aparato permite la amplificación clonal simultánea (preferentemente PCR, amplificación puente o amplificación isotérmica) de un molde de ácido nucleico (que incluye una pluralidad de distintos moldes de ácido nucleico generados, entre otros, mediante fragmentación). La amplificación clonal puede producirse en un pocillo que esté espacialmente separado (es decir discreto) sobre una plataforma de detección. La invención proporciona adicionalmente medios para realizar la amplificación de la pluralidad de moldes de ácido nucleico que están espacialmente separados (por ejemplo un micropocillo) y sellados, seguido de la preparación de dicha pluralidad de ADN amplificado en el mismo pocillo para la reacción de secuenciación mediante síntesis posterior. Cuando se utiliza una pluralidad de distintos moldes de ácido nucleico, la invención también proporciona para la amplificación medios para distribuir un único molde en cada pocillo. La invención también proporciona para la amplificación un medio para distribuir una única especie de molde en cada pocillo.

Chip semiconductor

- El FET funciona produciendo un intercambio de iones cargados entre la superficie de la capa química sensible y el medio de reacción (es decir la interfaz enzima/electrolito):



Por ejemplo, la inclusión de nitruro de silicio es ventajosa debido a que proporciona sensibilidad aumentada y más rápida a los cambios de pH de lo que se obtendría en ausencia del nitruro de silicio. Además, el nitruro de silicio ayuda a proteger al FET de la hidratación y de la migración de carga.

La sensibilidad inmediata del FET se explica por una respuesta no nernstiana, que surge de la unión dependiente de protones rápida y de la separación de iones cargados en la superficie de nitruro de silicio de la ventana aislante, lo que da como resultado la variación reproducible de la caída de la tensión a través de la capa de nitruro de silicio. La variación de la caída de tensión a través de la capa de nitruro de silicio se correlaciona con cambios del pH. La caída de tensión se controla utilizando un conjunto de circuitos de instrumentación, permitiendo de este modo la detección de inserciones individuales de nucleótidos. La tensión medida se denomina como la tensión umbral.

En una realización mostrada en la Figura 1, el aparato (o aparatos) sensible a iones 21 puede ser una pluralidad de ISFET sobre un microchip CMOS 24, que tenga pocillos microfluidos 25 por encima definidos por colectores de distribución 26. El microchip CMOS también puede contener uno o más calentadores 22 y sensores de temperatura 23. Se añade a los pocillos expuestos al ISFET (o los ISFET) la mezcla de reacción para la síntesis de ácido nucleico conteniendo molde de ácido nucleico, una o más polimerasas y uno o más nucleótidos. Cada ISFET envía una señal eléctrica que se controla mediante un procesador de señales. El ISFET preferentemente comprende una capa de pasivación y una capa de detección. Estas pueden funcionalizarse para que sean sensibles a protones. La capa (o capas) detectora puede fabricarse de óxido metálico o de nitruro metálico seleccionado del grupo que consiste en Al_2O_3 , SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 , HfO_3 , WO_3 , y un material súper nernstiano o una mezcla de estos materiales o una estructura laminada que tenga capas de distintos materiales, variando cada capa desde 1 nm a 50 nm de grosor. A medida que los nucleótidos se hidrolizan y se incorporan en la cadena de ácido nucleico creciente, los protones se liberarán y se detectarán mediante el procesador de señales como un cambio en la salida eléctrica del ISFET. El cambio en la señal eléctrica del ISFET es indicativo de la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de ácido nucleico. El aparato puede contener una capa de sellado que se puede retirar 27. Puede acoplarse una capa de sellado sólida a la elevación del accionador mecánico hasta una posición abierta y el descenso hasta una posición sellada (véase a continuación para una descripción adicional de los distintos tipos de tapas de sellado para los pocillos).

Preferentemente, cada ISFET genera una señal de salida normalizada a partir de la diferencia entre la señal del ISFET y la señal de referencia. Preferentemente, la señal de referencia se obtiene de un ISFET o FET emplazado sobre el chip en un pocillo distinto, en donde al menos uno de los dNTP, enzima o cebadores está ausente en la mezcla, por lo tanto la reacción no se desarrolla. Por lo tanto, cualquier distorsión o interferencia común sobre el chip se anulará tomando la diferencia entre estas señales.

La Figura 7 muestra un ISFET con una ventana flotante y una capa detectora fabricada de nitruro de silicio, que se expone a la mezcla de reacción.

Preferentemente el aparato comprende una estructura microfluida, que puede estar integrada con o acoplada al chip. Los microfluidos manejan el control preciso y la manipulación de los fluidos que están geométricamente restringidos a una escala pequeña, habitualmente volúmenes de μl o pl , y los dispositivos para tal uso son bien conocidos en la técnica. La estructura microfluida puede proporcionar paredes, canales y colectores de distribución que transportan y contienen fluidos. Un ejemplo estructural simple sería una pieza de plástico moldeada con cavidades proporcionadas para definir los canales y los pocillos. Como alternativa, la estructura puede ser un sustrato plano con partes perforadas a través para definir los lados de los canales y los pocillos, para formar de este modo un sustrato. Este sustrato se acopla a la superficie del chip definiendo el fondo del pocillo o del canal. Tales estructuras se desvelan en el documento PCT/GB2013/050832, las partes relacionadas con el cartucho sensor. La estructura también puede estar construida durante la fundición del semiconductor como una capa extra en la parte superior de la capa semiconductor y las capas de cableado de metal, por medio de lo cual los pocillos y los canales se definen mediante el grabado a través de la capa microfluida. Tales estructuras se desvelan en el documento GB1218356.2, en el presente documento por referencia. El sustrato o estructura también puede considerarse parte de, o formando, todo el dispositivo microfluida. Como tal, el presente aparato se puede considerar, en algunas realizaciones, que comprende un dispositivo microfluida.

El fin de los pocillos es contener a los reactivos y exponer los subproductos de la reacción a la capa detectora de un ISFET. El número de pocillos puede estar en el orden de 10^8 o más para la secuenciación exhaustiva del genoma o en el orden de al menos 100 para identificación bacteriana general. Preferentemente, hay al menos 100 pocillos, más preferentemente al menos 1000 pocillos, muy preferentemente al menos 100.000 pocillos.

Se puede introducir en el aparato (por ejemplo, el dispositivo microfluida) un sello que se puede retirar líquido (tapa de sellado) por medio de una bomba/fuente de presión y de una o más válvulas controlables que controlen la entrada de reactivos. Un ejemplo de tales medios (bombas/fuente de presión y de válvulas de control) se describe en los documentos US7948015B2 y US2010/0301398A1.

En realizaciones particularmente preferentes en donde se utiliza un aceite (preferentemente un aceite mineral) como un sello que se puede retirar, también denominado en el presente documento como una tapa de sellado, el aceite se puede retirar mediante varios ciclos de lavados alternos con disolvente orgánico y de tampón presecuenciación. Son disolventes orgánicos adecuados los alcoholes tales como metanol, isopropanol, etanol, isobutanol. Se pueden

utilizar otros tales como el dietiléter. Los ejemplos de disolventes orgánicos para retirar el aceite mineral se pueden encontrar en el documento US7842457B2.

En una realización preferente se utilizan perlas. Estas pueden funcionar como una superficie para capturar molde (o moldes) para la secuenciación, en cuyo caso pueden denominárselas como perlas de captura. También pueden ayudar en el emplazamiento de molde amplificado, por ejemplo, en pocillos. Las perlas utilizadas en el presente documento pueden fabricarse de cualquier número de materiales conocidos. Los ejemplos de tales materiales incluyen: polímeros naturales inorgánicos y polímeros sintéticos. Estos pueden incluir pero sin limitación celulosa, derivados de celulosa, vidrio de sílice, dextranos reticulados (por ejemplo, Sephadex TM) y geles de agarosa. Ejemplos adicionales se describen adicionalmente en el documento US7842457B2, y son conocidos para los expertos en la materia. Las perlas adecuadas para el acoplamiento covalente pueden ser de naturaleza magnética o no magnética. En una realización preferente, las perlas son perlas de poliestireno recubiertas de estreptavidina. También, las perlas preferentemente son poliestireno.

Los términos capturar e inmovilización pueden, en general, utilizarse indistintamente. Para los fines de la presente solicitud, los inventores han utilizado sitios de captura para incluir oligonucleótidos inmovilizados, que a su vez incluyen cebadores (o sondas) acopladas a una superficie.

Preferentemente, los tamaños de las perlas de captura y de los pocillos se dimensionaran de forma relativa de modo que solo una perla se ajustará en el pocillo, aunque el pocillo puede acomodar otros componentes tales como reactivos, perlas de relleno y perlas para continuar inmovilizando copias de un dado molde.

Los oligonucleótidos pueden estar acoplados al soporte sólido (por ejemplo, las perlas o las paredes del pocillo) a través de grupos químicos o mediante oligonucleótidos adicionales que estén unidos a la superficie del soporte. El acoplamiento del ácido oligo o polinucleico a la perla se puede realizar por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo el acoplamiento químico covalente del ácido nucleico a las perlas utilizando agentes de acoplamiento convencionales tales como carbodiimida soluble en agua, la cual puede utilizarse para unir el 5' fosfato de una secuencia de ADN a las perlas recubiertas de amina a través de un enlace fosfoamidato. Mientras que existen diversas definiciones para el término oligonucleótido en la técnica anterior, en el contexto de la presente solicitud, debe entenderse en el sentido de un tramo corto de ácidos nucleicos que puede estar acoplado a un soporte sólido para actuar como un vínculo para unir (anclar) moldes de ácido nucleico a las paredes. Los términos oligonucleótidos y cebadores se utilizan indistintamente. Los oligonucleótidos hibridan con los ácidos nucleicos molde.

El molde a amplificar y secuenciar idealmente será ADNmc o ARN. Esto es preferente cuando pueda preverse la hibridación al oligonucleótido inmovilizado, sin embargo, de ADN bicatenario que contenga "extremos cohesivos" resultantes de, por ejemplo, la digestión con enzimas de restricción. El extremo cohesivo específico de orientación hibridará con el oligonucleótido inmovilizado sobre las perlas o el soporte sólido, y se puede añadir ligasa para formar enlaces covalentes entre el molde y el oligonucleótido.

El molde de ácido nucleico puede ser de cualquier tamaño que se pueda someter a amplificación *in vitro*. En la realización preferente, el molde es de aproximadamente 20-500 pares de bases de longitud.

El molde puede estar acoplado (por ejemplo mediante ligamiento o enlace covalente) a un soporte sólido en el pocillo antes, durante o después de la amplificación. Los moldes o moldes amplificados en alguna etapa se hacen fluir en los pocillos y es dentro del pocillo que una población clonal de ácidos nucleicos se crea, una colonia para cada pocillo. Como se describirá a continuación, esta población puede crearse inmovilizando un único molde dentro del pocillo y amplificándolo, o inmovilizando una población de moldes idénticos dentro del pocillo. Esto está en contraste con las técnicas anteriores que crean una población clonal unida a una perla fuera del pocillo y transportando la perla al pocillo.

Además, es particularmente preferente que el aparato, por ejemplo el chip o estructura microfluida, comprenda uno o más pocillos y que las reacciones de amplificación y secuenciación (para cada molde) se produzcan "en el mismo pocillo".

El medio de calentamiento comprende un calentador. Preferentemente hay un sensor de temperatura. Preferentemente, este puede comprender también un controlador que proporcione un bucle de control entre el sensor (o sensores) de temperatura y el calentador (o calentadores). Por ejemplo, cuando se utiliza polimerasa Bst para la amplificación, los medios de calentamiento elevan la temperatura hasta aproximadamente 50 grados centígrados, preferentemente hasta 60 o incluso 65 grados C, siendo más preferente 60-65 para la amplificación isotérmica que utiliza polimerasa Bst. Se prevén temperaturas más elevadas, por ejemplo hasta 70, 80 o incluso 90 grados, y 84-98 grados C es particularmente preferente en algunos casos en donde se necesita termociclado. Lo que es importante es que la temperatura sea óptima para la polimerasa pertinente, o al menos que no esté por encima del umbral para la desnaturalización de la polimerasa pertinente.

El chip puede estar expuesto a un entorno térmico externo en donde tienen lugar el calentamiento y el enfriamiento activos y se puede transferir ese ciclo de flujo al chip.

Calentamiento en el chip

Muy preferentemente, el medio de calentamiento comprende un elemento calefactor en el chip y, de forma opcional también un sensor de temperatura en el chip y/o un conjunto de circuitos de control de la temperatura en el chip. Además, también es preferente que el calentador sea un elemento calefactor resistivo integrado en el chip.

- 5 En una realización, puede haber un calentador y un sensor asignados por pocillo. Como alternativa, puede ser suficiente un calentador para calentar una zona que contenga entre 10 y 100 pocillos. La disposición de los calentadores/sensores en los pocillos dependerá de la densidad de los pocillos en una serie. En otra realización, el calentador pueden ser alambres paralelos que se disponen a lo largo de las columnas del pocillo y que se sitúan por debajo de los pocillos o entre los pocillos. En otra realización, el calentador puede ser un transistor y puede tener
- 10 funcionalidades de calentamiento y de detección de temperatura (un híbrido calentador-sensor). En aún otra realización, el calentamiento se puede proporcionar por efecto termoeléctrico (efecto de Peltier) tal como bombas de calor termoeléctricas acopladas a una superficie del chip semiconductor. Los elementos calefactores descritos en la presente invención se implementan en un sistema sensor con un conjunto de circuitos de control analógico y digital (Figura 3). En el documento US7888015B2 se puede encontrar una descripción adicional sobre los calentadores, los
- 15 sensores de temperatura y el conjunto de circuitos de control de la temperatura en el chip.

- En algunas realizaciones, el chip es un chip CMOS (semiconductor complementario de óxido metálico). En una realización, los metales de la parte superior de la capa metálica del chip CMOS pueden funcionar como calentadores. Preferentemente, los metales de la parte superior funcionan como calentadores resistivos en los que los calentadores resistivos pueden comprender elementos calefactores lineales paralelos distribuidos de forma
- 20 homogénea a través de todo chip, como se ejemplifica en la Figura 6 y la Figura 8, o a través de una parte del chip. La distribución homogénea de los elementos calentadores permite un calentamiento uniforme a través de la superficie del chip. El elemento calefactor resistivo puede estar en forma de una serpentina, una U, un anillo, una espiral, un polígono o una línea recta (como se muestra por ejemplo en la Figura 8). En algunas realizaciones, el chip comprende una serie de elementos calefactores resistivos pixelados en la que los elementos resistivos
- 25 pixelados pueden adoptar una forma en anillo, una forma en espiral o una forma poligonal.

- En algunas realizaciones, el chip comprende un anillo protector. El anillo protector (es decir un blindaje electrostático) del chip puede funcionar como un calentador. Normalmente, la ruta de calentamiento entera se acopla a través del conjunto de circuitos a la alimentación eléctrica para proporcionar blindaje, pero durante el
- 30 calentamiento la ruta se reconfigura para conectarse al conjunto de circuitos de conducción para pasar una corriente a través de la ruta.

- La colocación de uno o más elementos conductores se diseña con respecto a los sensores ISFET, el tamaño de la matriz de sensores y de la superficie del chip de forma que el calor generado pueda proporcionar un calentamiento uniforme a través de la superficie del molde y a cada sensor ISFET individual. En tales realizaciones, los elementos calefactores están en el plano de la capa metálica de la parte superior de las capas metálicas del chip CMOS. Como
- 35 alternativa, si se desea un gradiente de temperatura a través de la superficie del molde, para conseguir el efecto se puede activar o desactivar cada elemento calefactor individual. Tales atributos pueden permitir, por ejemplo, realizar de forma simultánea en el chip la amplificación por PCR de mezclas de reacción que necesiten distintas temperaturas de apareamiento.

- Las disposiciones de los elementos calefactores a través del chip dependen del número y de la densidad de sensores ISFET por chip, así como del número de sensores ISFET cercanos a cada pocillo. En una realización, una fila (o columna) de sensores ISFET y de pocillos están dispuestas en forma de sándwich entre dos elementos calefactores paralelos. En otra realización, una pluralidad de filas (o columnas) de sensores ISFET y de pocillos están dispuestos en forma de sándwich entre dos elementos calefactores paralelos. De forma similar, un elemento calefactor puede rodear uno o más sensores ISFET y/o pocillos.
- 40

- El número y la longitud de elementos calefactores paralelos a través del chip dependerán del tamaño del chip. Por ejemplo, para un chip de 5 mm x 5 mm, la zona de calentamiento se puede conformar de hasta 8 elementos calefactores paralelos con una resistencia calefactora de principal de 50 ohmios para cada elemento calefactor, lo que genera 4 W/cm² de potencia para el calentamiento solo a través de calentadores.
- 45

- Se puede proporcionar para los calentadores un conductor de calentador. Este conductor de calentador puede tomar un valor de registro POW de 8 bits como su entrada y traducirlo a una tensión de salida constante a través de los calentadores. En una realización, los calentadores pueden dirigirse en un modo de Clase A mediante el control de forma continua del valor de POW entre 8 y 255. En otra realización, el calentador puede dirigirse en modo de Clase D controlando el ciclo de trabajo (modo PWM) o controlando la densidad de un flujo de pulsos que enciende el calentador (modo flujo de bits). La ventaja principal de tal diseño es proporcionar flexibilidad para controlar los
- 50
- 55 calentadores para lograr el perfil de temperatura diana en distintos entornos térmicos.

Material del calentador:

Los materiales de los metales calentadores son uno o más de aluminio, cobre, tungsteno u otra composición o aleación de metales común. La elección del material depende en gran medida del procedimiento de fabricación del

chip.

Circuito conductor del calentador

En una realización, el conductor del calentador comprende al menos una fase de conductor individual, que puede encenderse/apagarse de forma selectiva estableciendo un registro de selección de conductor de calentador (HDRV).

5 Las rutas del calentador (representadas como R anteriormente) se distribuyen a través del chip. En tal configuración, solo se hace marchar una etapa de conductor en un bucle cerrado verdadero cerrando la conexión "SENSE" de la realimentación negativa del opamp conductor del calentador. Por lo tanto, las tensiones que marchan a través de cada ruta de calentador serán ligeramente distintas debido a esta falta de coincidencia, dado que el resto de las rutas de calentador marcharán en un modo de bucle abierto (véase la Figura 11).

10 En otra realización, todas las rutas de calentador son en bucle cerrado. Los beneficios de hacer esto es tener todos los conductores del transistor NMOS conducidos por la misma tensión de potencia que se genera mediante el DAC. Dimensionando cuidadosamente los transistores conductores, VDS se puede ajustar para que sea muy pequeña, por lo tanto se puede minimizar la pérdida de potencia en los conductores de calor.

Circuito sensor de temperatura y control de temperatura

15 Preferentemente, el chip comprende uno o más sensores de temperatura; más preferentemente, el chip comprende una serie de sensores de temperatura distribuidas de forma desigual a través del chip. Un sensor de temperatura puede ser una unión PN en el sustrato o puede usar un conjunto de circuitos más complicado para implementar un sensor de temperatura proporcional a absoluta (cada uno de los cuales se conoce en el campo de la ingeniería eléctrica). El número de sensores de temperatura por chip depende del número de calentadores y de sensores

20 ISFET. En una realización, la proporción entre sensores de temperatura, calentadores y sensores ISFET puede ser de 1:1:1, respectivamente. En una realización preferente, el número de sensores de temperatura es menor que el número de sensores ISFET, el cual es menor que el número de calentadores.

Los sensores de temperatura están posicionados con respecto a la posición de los calentadores y de los sensores ISFET. Preferentemente, el sensor de temperatura se emplaza lejos del calentador. Más preferentemente, el sensor

25 de temperatura no se emplaza cerca del calentador, tal como directamente por debajo de un calentador.

En algunas realizaciones de la invención, las temperaturas que informada el sensor de temperatura en el chip se envían a un microcontrolador externo, en donde se implementa un algoritmo PID de control (proporcional-integral-derivativo) para controlar a los calentadores en el chip, en un modo de bucle cerrado para lograr la temperatura (o temperaturas) diana.

Embalaje del chip de secuenciación integrado:

Los chips sensores se pueden embalar en un formato de paquete de CI tradicional sobre un bastidor de conductores o sustrato laminado con una apertura hecha a medida (por ejemplo un pocillo, una cámara) para exponer la superficie del chip para la detección de ADN. Los tipos de paquetes pueden ser cualquier formato corriente o hecho a medida, tales como CLCC, PLCC, TSSOP, QFN, BGA, SOIC, etc. La elección del tamaño, el material, el diseño

35 del paquete dependerá de la aplicación y del montaje final del dispositivo detector.

Se apreciará que el aparato puede comprender un termociclador. Durante la amplificación, la temperatura del termociclador alterna entre temperaturas de desnaturalización, hibridación y apareamiento (T1, T2 y T3 respectivamente). Realizaciones preferentes proporcionan esto proporcionando la energía suficiente necesaria para lograr un intervalo de proporción de la rampa de calentamiento, mientras se proporciona suficiente flujo de fluido de enfriamiento y/o velocidad de ventilador para lograr un intervalo de proporción de la rampa de enfriamiento. Varios factores afectan el diseño de la velocidad de calentamiento y de enfriamiento. Uno de los cuales es la resistencia de los calentadores, lo que determina la ruta y el trazado del rastreo del calentador en el chip. El diseño del paquete del chip también puede desempeñar un papel en la proporción de la rampa de calentamiento y el enfriamiento.

40

Preferentemente, una polimerasa para la amplificación es la polimerasa Taq. También es preferente que una polimerasa útil para la amplificación y la secuenciación sea la polimerasa Bst.

45

Sello que se puede retirar

El sello que se puede retirar, denominado en el presente documento como tapa de sellado o medio de sellado, es adecuado para sellar (contener) una reacción. Se proporciona por lo tanto un medio para sellar (contener) la reacción y sus reactivos con respecto al entorno y los pocillos adyacentes. Este sello que se puede retirar se proporciona muy preferentemente para la reacción de amplificación. También puede utilizarse para la reacción de secuenciación (y así, para cualquiera o ambas reacciones de amplificación y secuenciación), pero se utiliza muy preferentemente en el sellado de la reacción de amplificación.

50

El sello que se puede retirar puede ser un líquido; tal como un aceite o una cera. Puede aplicarse mediante una bomba como se describe en el presente documento. Puede retirarse mediante lavado, por ejemplo con disolventes adecuados, como se describe en cualquier sitio en el presente documento. Como alternativa, el sello que se puede

55

retirar puede ser sólido, tal como una cubierta. Esta puede fabricarse por ejemplo de vidrio u otro material inerte, o de las almohadillas de silicona resistentes al calor o los elastómeros termoplásticos (TPE) mencionados anteriormente. Se puede aplicar emplazándolo por encima del chip, preferentemente conducido mediante un motor operado por un controlador adecuado para bajar el sello sobre la superficie de la parte superior de la estructura microfluida y, de forma opcional, medios de detección para detectar el emplazamiento correcto. El sello preferentemente comprende una superficie compatible para encajar de forma deformable la estructura microfluida. Un sello que se puede retirar sólido lo puede retirar el usuario o se puede retirar mediante un motor como se ejemplificó anteriormente.

Con respecto al uso de un sello que se puede retirar en la fase de secuenciación, esta es la opción preferente. Cuando no se necesita, puede haber un flujo alterno continuo de nucleótidos y lavados. Estos preferentemente se realizan a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, puede desearse aumentar la velocidad de incorporación, y por lo tanto la velocidad de secuenciación, de modo que se pueden utilizar temperaturas elevadas (por encima de la temperatura ambiente, es decir, 24 grados C). En este caso, un sello que se pueda retirar puede ser ventajoso para la etapa de secuenciación. A elevadas temperaturas de secuenciación, se apreciará que es preferente el sello que se puede retirar sólido. Sin embargo, una razón para no incluir un sello que se puede retirar es que se puede disminuir la velocidad de la dinámica de trabajo total. Un sello que se puede retirar sólido para la fase de secuenciación también puede minimizar la difusión de iones.

Se prevén combinaciones de sellos que se pueden retirar líquidos y sólidos si se necesitan sellos que se puedan retirar tanto para la amplificación como para la secuenciación. Por ejemplo, se puede utilizar un medio de sellado líquido (sello que se puede retirar) para sellar las reacciones de amplificación, mientras que se puede utilizar un medio de sellado de líquido o sólido (sello que se puede retirar) para sellar la fase de secuenciación.

En algunas realizaciones, las reacciones de secuenciación se realizan a temperatura ambiente (es decir, de la habitación) mientras que los reactivos fluidos preferentemente se calientan de forma externa antes de la entrega al chip. Este procedimiento es eficaz y también ventajoso para la secuenciación debido a que proporciona condiciones más óptimas para la polimerasa/reacción y también aumenta la velocidad de incorporación durante la secuenciación.

También es preferente que el medio de calentamiento sea adecuado para el termociclado. De hecho, el termociclado es un procedimiento preferente, en el que se pueden prever etapas de desnaturalización, apareamiento y extensión.

La amplificación del polinucleótido molde se produce sobre una superficie de dicho chip. Se apreciará que esto puede incluir varias superficies separadas. También se apreciará que esto puede considerarse como que se produce *dentro, sobre o en* una superficie o superficies. En una realización es preferente que la amplificación se produzca dentro de un dispositivo adyacente al chip, mientras que en otra realización preferente, esto puede producirse en uno o más (pero preferentemente en miles o más como se describe en otros lugares) pocillos discretos, por ejemplo micropocillos.

En la realización anterior, la amplificación de distintos fragmentos de un ácido nucleico puede producirse en una cámara y después fluir a otros pocillos en el chip.

En la última realización, es preferente que los fragmentos individuales se amplifiquen cada uno en un pocillo discreto (de forma que, preferentemente, haya en promedio un molde por pocillo).

Por lo tanto, es preferente que la amplificación de un molde y la secuenciación posterior del molde amplificado se produzcan el mismo pocillo.

Se apreciará que el molde está contenido dentro de una muestra. La muestra es un fluido y puede incluir tampones adecuados. Como se mencionó anteriormente, los moldes de ácido nucleico en una muestra pueden estar fragmentados en trechos más pequeños de moldes de ácido nucleico que se puedan tratar en una amplificación *in vitro*. En la realización preferente, el molde es de un tamaño de aproximadamente 100-500 pb. Aunque una copia exacta del molde producido mediante amplificación se denomina como molde amplificado, debe comprenderse que no existen diferencias estructurales entre un molde y un molde amplificado, uno es simplemente una copia del otro. Las expresiones molde amplificado y amplicón se utilizan indistintamente. Las expresiones amplificación y amplificación clonal también se utilizan indistintamente. Clonal y de forma clonal se refiere a una población de ácidos nucleicos que son copias sustancialmente idénticas de un dado molde, por lo que dado molde es típicamente exclusivo de otros moldes o fragmentos de ácido nucleico.

Las expresiones molde, molde de ácido nucleico, ácido nucleico molde y polinucleótido molde se utilizan indistintamente. Mientras que pueden existir diversas definiciones del término molde en la técnica anterior, para el fin de la presente solicitud se considerará que significa una longitud de ácido nucleico que pueda copiarse durante la amplificación o secuenciarse durante la secuenciación. Es decir, un molde es un trecho de un ácido nucleico sobre el que se puede actuar mediante una polimerasa durante los procedimientos de amplificación y secuenciación. El ácido nucleico molde es preferentemente ADN o ARN y puede ser monocatenario o bicatenario. Si es bicatenario, se apreciará que debe haber al menos separación parcial de las cadenas para permitir actuar a la polimerasa pertinente. Como alternativa, pueden utilizarse las polimerasas con actividad de desplazamiento de cadena. El molde preferentemente es monocatenario. Las expresiones diana y cadena molde se pueden utilizar indistintamente,

pero esencialmente se relacionan con el ácido nucleico a amplificar y secuenciar posteriormente. Este ácido nucleico puede ser solo de unas pocas bases de longitud y el límite superior puede ser de muchos órdenes de magnitud más elevado, siendo la única limitación las consideraciones espaciales con respecto a, por ejemplo, el tamaño del pocillo (si se utiliza) y los límites cinéticos. Cuando un molde se denomina como una especie, se considera que significa un molde particular o único a partir de una población de muchos moldes distintos. Por ejemplo, una muestra de ácido nucleico que se ha sometido a fragmentación comprenderá muchos fragmentos más pequeños de molde de ácido nucleico o en otras palabras, muchas especies de molde de ácido nucleico. Como un ejemplo adicional, un pocillo puede contener muchos moldes de ácido nucleico de una especie única, en cuyo caso existen múltiples copias de un molde particular.

La etapa de secuenciación determina la identidad de secuencia de bases del ácido polinucleico molde (o al menos una parte de ellas). Esto pueden incluir la secuenciación *de novo*, en donde se carece de conocimiento previo sobre el molde a secuenciar. Como alternativa, se puede realizar secuenciación dirigida o resecuenciación en la que, por ejemplo, se va a determinar la identidad de un SNP particular.

El chip se puede considerar que está 'integrado'. Esto es debido a que permite la amplificación y posterior secuenciación sobre el mismo chip. El medio de calentamiento también puede proporcionarse como parte de la base del chip.

Un ejemplo de una estructura de pocillo del aparato de detección se describirá ahora con más detalle con referencia a la Figura 4. Una capa de detección, que está posicionada por encima del chip CMOS, está expuesta en la superficie de la parte inferior del pocillo. Un pocillo de dióxido de silice puede estar cubierto por una capa de TiN y o de Al. La capa de TiN o de Al está recubierta con AgCl en la superficie que está expuesta al pocillo, para formar el electrodo de referencia. El electrodo de referencia desvía el potencial de tensión del fluido por encima de la capa de detección para establecer el punto de funcionamiento del ISFET de forma que se puedan medir los cambios en el potencial del fluido debidos a la liberación de protones en el fluido. Es preferente que la capa de TiN o de Al se posicione suficientemente baja en el pocillo de forma que el electrodo de referencia esté inmerso cuando el pocillo contenga una mezcla de reacción. Es preferente, como se muestra en la realización, que las superficies de la parte superior de las paredes del pocillo estén cubiertas con una capa de material hidrófobo. Los materiales hidrófobos adecuados incluyen, pero sin limitación, material polimérico orgánico o inorgánico o nanomaterial, por ejemplo PMMA, PE, PP, Su-8 o material fotorresistente, parileno o puede ser recubrimiento de nanopartícula de TiO₂ súper hidrófobo. El material hidrófobo ayuda a romper la tensión superficial del fluido entre los pocillos durante el procedimiento de sellado, retirando así micro huecos que puedan formarse y conducir a contaminación cruzada, o a la evaporación del fluido desde del pocillo. El sellado de los pocillos se discutirá con más detalle a continuación.

Se describirán ahora con mayor detalle las realizaciones de sellos que se pueden retirar, como se muestra en la Figura 5. En cada una de las realizaciones mostradas en la Figura 5 está incluida una celda de flujo. La celda de flujo puede estar integrada con el aparato de detección como una unidad única (por ejemplo las realizaciones A, B y D) o puede formar un componente separado distinto (por ejemplo la realización C).

La realización A de la Figura 5 muestra un aparato de detección con una celda de flujo integrada 1. La celda de flujo comprende válvulas de fluidos 5, proporcionando una entrada y una salida a través de las que el fluido puede hacerse fluir hacia dentro y fuera de los pocillos. Cada pocillo comprende una capa de detección 3. Las paredes del pocillo 2 pueden estar fabricadas de SiO₂. Los pocillos de la realización A no están sellados.

La realización B muestra el aparato de detección de la realización A, en el que los pocillos que contienen las reacciones de amplificación 6 están sellados con un sello líquido que se puede retirar 7. El sello líquido preferentemente es un aceite, por ejemplo un aceite mineral y más preferentemente aceite de parafina o aceite de silicona. El sello líquido que se puede retirar puede introducirse en el aparato de detección a través de la celda de flujo por medio de una bomba o una fuente de presión y una o más válvulas controlables que controlan el ingreso de reactivos. Un ejemplo de tal bomba/fuente de presión y de válvulas de control se describe en los documentos US7948015B2 y US2010/0301398A1.

Cuando se utiliza aceite como un sello que se puede retirar, el aceite se puede retirar mediante varios ciclos de lavados alternos de disolvente orgánico y de tampón de presecuenciación que contiene detergentes adecuados, estos detergentes pueden ser cualquiera de tipo no iónico o una mezcla de tipo no iónico y aniónico, o catiónico, o puede ser detergente a base de silicona. Son disolventes orgánicos adecuados los alcoholes tales como metanol, isopropanol, etanol, isobutanol. También pueden utilizarse otros tales como el dietiléter. En el documento US7842457B2 se pueden encontrar ejemplos de disolventes orgánicos para retirar el aceite mineral.

La realización C muestra un aparato de detección y una celda de flujo separada que se levanta hasta una posición abierta. Los pocillos de la realización C se han sellado utilizando un adhesivo sensible a la presión (ASP) 8. El ASP forma enlaces entre el adhesivo y un adherente (en este caso la superficie de la parte superior de las paredes del pocillo) durante la aplicación de presión ligera. Las propiedades de los ASP son bien conocidos en la técnica. Se aplica una capa de ASP en la parte superior de los pocillos de forma que se hace contacto entre el ASP y la superficie de la parte superior de las paredes del pocillo. Se aplica presión al ASP de forma que se forman enlaces adhesivos entre el ASP y la superficie de la parte superior de las paredes del pocillo. Se puede aplicar presión

mediante cualquier forma de presión externa, por ejemplo a través del uso de un rodillo o bajando una pinza acoplada a un accionador mecánico. La presión también puede aplicarse bajando la celda de flujo 9 sobre el aparato de detección hasta una posición cerrada. Esto puede hacerse utilizando ser un accionador mecánico.

- 5 Es preferente que la fuerza adhesiva del ASP sea suficientemente baja de forma que el ASP pueda retirarse fácilmente según se necesite. Es preferente que la fuerza adhesiva del ASP sea de entre 0,1-10 N/cm². Es más preferente que la fuerza adhesiva esté entre 0,1-5 N/cm².

- 10 La realización D muestra un aparato de detección con una celda de flujo integrada 12 que comprende una membrana no cohesiva flexible 10 entre las válvulas de entrada y salida de fluido de la celda de flujo. Preferentemente la membrana es una almohadilla de silicona resistente al calor o un elastómero termoplástico. Se puede bajar un material de bloque acoplado a un accionador mecánico para aplicar una presión uniforme sobre la membrana. Esto provocará que la membrana empuje contra las superficies de la parte superior de los pocillos microfluidos de forma que se sellen los pocillos. Para retirar el sello, el material de bloque se levanta de la membrana, provocando que la membrana vuelva a su posición original, elevada por encima de los pocillos.

Reacciones biológicas y químicas

- 15 Se apreciará que, en algunas realizaciones, los reactivos utilizados en los procedimientos de amplificación y de secuenciación no forman parte física del aparato, siendo la excepción cualquiera de los oligonucleótidos que estén inmovilizados en los pocillos o en las perlas antes de la amplificación.

- 20 En otras realizaciones, estos reactivos pueden formar parte del aparato (dado que podrían, por ejemplo proporcionarse en una carcasa) o, junto con el aparato, formar un kit. Como tal, la invención también proporciona un kit que comprende el aparato y reactivos para la amplificación y la secuenciación del molde y, de forma opcional, perlas como se describe en el presente documento.

- 25 El volumen de un dispositivo microfluído puede variar de 1 pl a 10 µl, o más grande que 10 µl. El medio de calentamiento puede, en una realización, permitir que la reacción de amplificación tenga lugar dentro del dispositivo microfluído en donde se pueden lograr tanto la temperatura como la condición óptima para las reacciones de amplificación de termociclado e isotérmicas, así como para la hibridación de los cebadores o los oligonucleótidos.

- 30 Se apreciará que se necesitará preparar los moldes de ácido nucleico en una muestra antes de exponerlos al aparato de detección para la amplificación y secuenciación. Las etapas para la preparación de una muestra pueden incluir, pero sin limitación, lisis de células, purificación de material de ácido nucleico (por ejemplo ADN), la preamplificación de una región deseada, la purificación del amplicón, la fragmentación de los amplicones (por ejemplo mediante el tratamiento con ultrasonido, nebulización o mediante el uso de enzimas de restricción), la reparación final de las fragmentaciones y el acoplado del adaptador universal a través de ligamiento. Todas las etapas individuales son bien conocidas en la técnica, como lo es la combinación de las etapas individuales para el procedimiento de preparar muestras de ácido nucleico para la amplificación o la secuenciación.

- 35 En una realización, el pocillo del aparato sensible a iones contiene oligonucleótidos o un grupo químico inmovilizados que se unen al molde de ácido nucleico. Los oligonucleótidos o el grupo químico pueden estar inmovilizados sobre un soporte sólido tal como una perla y/o sobre la pared (o paredes) del pocillo. Los oligonucleótidos o grupos químicos inmovilizados actúan como 'sitios de captura' para los moldes de ácido nucleico. Un sitio de captura da a entender un oligonucleótido inmovilizado sobre un soporte sólido que tiene la capacidad de unirse a (es decir hibridar) o 'capturar' un molde de ácido nucleico.

- 40 Los oligonucleótidos pueden estar acoplados al soporte sólido (por ejemplo, perlas o paredes del pocillo) a través de grupos químicos que están unidos a la superficie del soporte. El acoplamiento del ácido nucleico a la perla se puede realizar por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, el acoplamiento químico covalente del ácido nucleico a las perlas se puede realizar utilizando agentes de acoplamiento convencionales tales como carbodiimida soluble en agua, que puede utilizarse para unir el fosfato 5' de una secuencia de ADN a las perlas recubiertas de amina a través de un enlace fosfoamidato. Como alternativa, utilizando química similar se pueden acoplar a la perla oligonucleótidos concretos.

- 50 Los oligonucleótidos pueden inmovilizarse sobre las paredes del pocillo a través de un procedimiento de silanización, activación y acoplamiento. La silanización de las paredes del pocillo (SiO₂) se puede realizar mediante la hidrólisis inducida de SiO₂. La silanización se puede lograr utilizando silanos tales como (3-glicidil oxipropil) trimetoxisilano (3-GPS), (3-Aminopropil) trietoxisilano, aminofenil trimetoxisilano, (3-mercaptopropil) trimetoxisilano (3-MPTS) o haloacetamido silanos. Es preferente que la silanización esté restringida solo a superficies de SiO₂ y no a la capa de detección para evitar cualquiera complicación con respecto al desempeño del ISFET.

- 55 Las superficies silanizadas de los pocillos pueden activarse haciéndolas reaccionar con uno de, pero sin limitación, ditiobispiridina, N-hidroxi succinimida (NHS), EDC u otras carbodimidas. Es preferente que la activación sea mediante un compuesto que tenga una baja capacidad tamponadora, de forma que no absorba protones liberados durante las reacciones.

Después, los oligonucleótidos pueden acoplarse a la superficie. Los oligonucleótidos reaccionan fácilmente con la superficie silanizada activada para quedar inmovilizados sobre la superficie de los pocillos. Antes de la inmovilización, los oligonucleótidos pueden modificarse en el 5' con un grupo funcional tal como amina, tiol, acrydite, carboxi, hidroxil, azida e incluso pueden biotinilarse.

- 5 Se puede encontrar más detalle sobre el procedimiento de silanización de una superficie sólida en las siguientes referencias:

- 1, Bhatia, S. K.; Shriver-Lake, L. C.; Prior, K. J.; Georger, J. H.; Calvert, J. M.; Bredehorst, R.; Ligler, F. S. *Anal. Biochem.* 1989, 178, 408-413.
- 2, Lee, Y. W.; Reed-Mundell, J.; Sukenik, C. N.; Zull, J. E. *Langmuir* 1993, 9, 3009-3014.
- 3, Shriver-Lake, L. C. En *Immobilized Biomolecules in Analysis*; Cass,
- 4, Kallury, K. M. R.; Krull, U. J.; Thompson, M. *Anal. Chem.* 1988, 60, 169-172.
- 5, Lyubchenko, Y. L.; Blankenship, R. E.; Gall, A. A.; Lindsay, S. M.; Thiemann, O.; Simpson, L.; Shlyakhtenko, L. *S. Scanning Microsc. Supl.* 1996, 10, 97-107.
- 6, Vandenberg, E.; Elwing, H.; Askendal, A.; Lundstrom, I. J. *Colloid Interface Sci.* 1991, 147(1), 103-118.
- 7, Leyden, E. D. *Silanes, Surfaces and Interfaces*; Gordon y Breach: Nueva York, 1986.

La densidad de los oligonucleótidos acoplados a las paredes del pocillo puede estar en la región de 1 micro molar a 1 pico molar por cm². La densidad lograda depende en gran medida del procedimiento de silanización. La densidad de los oligonucleótidos puede aumentarse haciendo reaccionar adicionalmente las paredes de pocillo silanizadas con moléculas dendríméricas o con polímeros hiper ramificados, los que pueden proporcionar superficies silanizadas funcionalizadas adicionales.

Es preferente que la capa sensible a Ag/AgCl del electrodo de referencia esté protegida durante el procedimiento de inmovilización del oligonucleótido descrito anteriormente. Esto puede ser mediante el recubrimiento del Ag/AgCl del electrodo con una capa protectora tal como cera, la cual puede retirarse antes del uso del aparato durante el procedimiento de secuenciación.

- 25 El molde a amplificar y secuenciar idealmente será ADNmc o ARN, sin embargo, se puede prever ADNbc que contenga "extremos cohesivos" que resultan, por ejemplo, de la digestión con enzimas de restricción. El extremo cohesivo específico de orientación hibridará con el oligonucleótido inmovilizado sobre las perlas o el soporte sólido, y se puede añadir ligasa para formar enlaces covalentes entre el molde y el oligonucleótido.

El molde puede acoplarse al soporte sólido antes de la amplificación, o puede acoplarse durante la amplificación.

- 30 Los moldes de ácido nucleico pueden ser ADN o ARN tal como, pero sin limitación, ADN genómico purificado (que en general incluye ADNc) o ARNm. Los moldes de ácido nucleico pueden ser de origen natural o de origen no natural y pueden obtenerse a partir de diversas fuentes tales como, pero sin limitación, fluidos o tejidos corporales, bacterias, virus, o una biblioteca de ADNc. Para ARN, es preferente antes de amplificación una etapa inicial de transcripción inversa del ARN o ADN.

- 35 Para la secuenciación *de novo*, el molde de ácido nucleico se puede preparar utilizando un procedimiento conocido en la técnica de preparación de muestras/construcción de biblioteca de ADN convencional (por ejemplo, NEBNext Fast DNA library Prep Set 4 de New England Biolabs). Brevemente, el ácido nucleico se fragmenta, se reparan los extremos, se liga el adaptador universal y se limpia con una preamplificación opcional de 4-8 ciclos. Para la amplificación y secuenciación específica de genes, que puede contener mutaciones particulares o SNP, se puede fragmentar el ácido nucleico seguido de una limpieza. Tanto para la secuenciación *de novo* como para la específica de genes se puede enriquecer un tamaño de fragmento específico.

- 45 Los moldes de ácido nucleico fragmentado se mezclan con reactivos de amplificación que comprenden los dNTP, polimerasa y los primero y segundo cebadores que tienen secuencia complementaria a la región 5' y 3' del molde de interés y que pueden contener cada uno una secuencia adaptadora universal exclusiva. La mezcla se añade a los pocillos (para fines ilustrativos) a una dilución limitante, de modo que cada pocillo contenga en promedio solo una única copia de un molde. Los moldes de ácido nucleico fragmentado se pueden entregar a los pocillos mediante procedimientos tales como el flujo de líquido de forma que cada pocillo contiene en promedio solo una única copia de un molde. Los procedimientos para obtener una única copia de un molde en cada pocillo se describirán con mayor detalle más tarde.

- 50 Los moldes pueden amplificarse de forma clonal utilizando ciclado térmico (por ejemplo, mediante diversas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) que utilizan ciclado térmico) o el procedimiento de amplificación isotérmica (por ejemplo círculo rodante, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA)).

- 55 Para la PCR, la amplificación se realiza con más de 10 ciclos, 20 ciclos, 30 ciclos o 40 ciclos, utilizando una condición tamponadora óptima que depende de la aplicación y del nivel de análisis deseados. Por ejemplo, el análisis de la secuencia que se tiene como objetivo tal como el de genotipado, identificación de los SNP o aplicaciones de secuenciación más simples, pueden necesitar menos ciclos.

- Para la amplificación que tiene lugar en los pocillos, se proporcionarán oligonucleótidos inmovilizados en el pocillo para unirse a amplicones. Durante la fase de desnaturalización de una PCR, se separan amplicones bicatenarios para formar ADN monocatenario; por lo tanto durante la fase de apareamiento se hibridará una parte del ADN monocatenario a los oligonucleótidos inmovilizados de una manera específica de cadena. En una realización, la
- 5 proporción de los primero y segundo cebadores puede alterarse para desviar la producción de ADN monocatenario (ADNmc) específico de cadena, aumentando así la probabilidad del ADNmc de hibridar con los oligonucleótidos inmovilizados (por ejemplo, si es preferente el ADNmc específico del segundo cebador, la proporción del primer cebador con respecto al segundo puede establecerse para que sea mayor que 1:1, 1:4, 1:8 o mayor que 1:50).
- Después, el oligonucleótido inmovilizado puede actuar como un cebador para extender el ácido nucleico utilizando
- 10 ADNmc hibridado como molde. Se utilizan ciclos repetidos de desnaturalización, apareamiento y extensión para (de forma clonal) aumentar el número de copias del molde en el pocillo, y estas copias se inmovilizan sobre soportes sólidos, es decir superficies situadas en el pocillo.
- En una realización, la cantidad de molde amplificado se puede controlar mediante un sensor (o sensores) ISFET, el cual detecta la acumulación de protones en el pocillo.
- 15 Es preferente que una vez que se logre una cantidad conveniente de molde amplificado de forma clonal, la tapa de sellado se retira. Después, preferentemente los pocillos se lavan para retirar reactivos tales como compuestos tampón, cebadores, los dNTP, polimerasa, protones y moldes de ácido nucleico que no estén inmovilizados al soporte sólido.
- Los ADN monocatenarios inmovilizados se utilizan como moldes preferentes (amplificados) para la reacción de
- 20 secuenciación posterior. Por lo tanto, para asegurar que solo los ADNmc permanecen inmovilizados sobre el soporte sólido, los pocillos se lavan con, por ejemplo, una solución alcalina para desnaturalizar el molde (separación de cadena).
- En un procedimiento preferente, la secuenciación se inicia hibridando un cebador de secuenciación a la región 3' del
- 25 molde de ácido nucleico monocatenario (en este ejemplo, ADNmc) inmovilizado, y después se une una polimerasa de secuenciación (tal como polimerasa Bst u otra polimerasa termoestable) al complejo cebador de secuenciación/molde de ácido nucleico monocatenario (ADNmc).
- Esto se sigue de la adición de nucleótidos, principalmente de deoxinucleótidos, en la que cada nucleótido (por
- 30 ejemplo dATP, dGTP, dCTP y dTTP) se introduce en los pocillos de forma separada (es decir en 'ondas' separadas). Si existe una base complementaria en un molde en un pocillo particular, entonces el nucleótido se hidrolizará mediante la polimerasa (en este ejemplo, Bst) y se incorporará extendiendo desde el 3' del cebador de secuenciación.
- La incorporación de nucleótidos conducirá a la producción de un protón como un subproducto, que se detecta
- 35 mediante el sensor (o sensores) ISFET, y la señalización de una respuesta positiva. Por otro lado, la falta de incorporación del nucleótido (o nucleótidos) no generará un protón (o protones) y así, no se producirá señal. A través de la repetición del procedimiento de adición de un nucleótido por vez, en el que la adición de cada nucleótido está seguida de un flujo de tampón de lavado que no contiene nucleótido, se define la secuencia completa.
- Como tal, son preferentes las ondas progresivas de nucleótidos únicos, cada onda seguida por una etapa para
- 40 retirar todos los nucleótidos no unidos (una 'etapa de limpieza'), tal como un lavado. La señal de cada ISFET se coteja y, en última instancia, se determina la secuencia del molde amplificado en cada pocillo. A su vez, los resultados procedentes de cada pocillo se pueden analizar y las partes solapantes se emparejan para proporcionar hasta un genoma completo, si es pertinente.
- Los procedimientos de detección de cambios del pH con el aparato sensible a iones para la secuenciación de ADN
- 45 se describen en la técnica (véase, por ejemplo, solicitudes de patente n.º US811459; US7686929; US7888015; EP2129792; WO06/005967; US2010/0255595 y GB1112140.7; Rothberg JM y col., Nature 475: 348-52 (2011)). Otra publicación de Rothberg es el documento US2010/137143. Las publicaciones de los inventores incluyen los documentos WO 2008/07014 y WO2003/073088.
- En diversas realizaciones, la secuencia de los oligonucleótidos inmovilizados sobre el soporte sólido tiene una
- 50 secuencia complementaria con el 5' o el 3' del molde de ácido nucleico. Preferentemente, el oligonucleótido tiene una secuencia idéntica a toda o a una parte del primero o segundo cebador utilizado para la amplificación clonal, preferentemente idéntica ya sea la secuencia adaptadora universal del primero o del segundo cebador. En una realización preferente, los oligonucleótidos están conjugados en el extremo 5' a biotina y cada pocillo contiene una o más perlas de estreptavidina unida a oligonucleótidos conjugados a biotina que constan de una secuencia adaptadora universal. Como alternativa, se pueden conjugar oligonucleótidos adaptadores universales a la superficie dentro de los pocillos. Puede utilizarse otro acoplamiento covalente de oligonucleótidos sobre la superficie
- 55 modificada (por ejemplo, entrecruzamiento por UV sobre SiO₂ de vidrio no modificado).
- Los primero y segundo cebadores pueden solo contener la secuencia complementaria al adaptador universal, pero pueden contener adicionalmente secuencias complementarias al gen diana de interés.

En realizaciones particulares en donde se utiliza como un sello que se puede retirar un aceite (preferentemente un aceite mineral), también denominado en el presente documento como una tapa de sellado, el aceite se puede retirar mediante varios ciclos de lavados alternos con disolvente orgánico y tampón de preselección. Son disolventes orgánicos adecuados los alcoholes tales como metanol, isopropanol, etanol. Preferentemente se utiliza isobutanol.

5 En una realización preferente, se hibridan primero a las perlas que contienen oligonucleótidos copias únicas de moldes de ácido nucleico monocatenario, y después se introducen en pocillos con reactivos y cebadores de amplificación. Preferentemente, después se amplifican los moldes iniciales en el pocillo de forma clonal. El resultado neto es una población amplificada de forma clonal de cadenas complementarias capturadas sobre las perlas.

10 Se puede proporcionar dentro del aparato un ISFET de referencia. Para tal fin, puede haber pocillos de control o pocillos vacíos de otra forma. Los pocillos vacíos pueden presentarse para varias razones, ya sea se pueden dejar vacíos a propósito o se diseñan para evitar la inmovilización. Además, si en promedio solo se utiliza un molde por pocillo y se proporciona un gran número de pocillos en el chip, entonces debería también haber algunos pocillos que no tendrán molde para secuenciar inmovilizado en ellos (y de forma opcional amplificar antes de la secuenciación).

15 Es preferente que se incuben en los pocillos la polimerasa de secuenciación, preferentemente Bst, y los ácidos nucleicos.

Los moldes de ácido nucleico pueden preferentemente distribuirse mediante flujo o aplicación puntual de la muestra en cada pocillo. Para asegurar que se logra por pocillo en promedio solo un único molde de ácido nucleico, la muestra se puede diluir. Se puede utilizar UV para degradar el molde de ácido nucleico que no este próximo al sensor, es decir que está visible por encima de la parte superior del pocillo (cuando se ve a lo largo del plano de un chip plano que comprende pocillos). Esto es particularmente útil para degradar ADNbc que no se apareará (con el oligonucleótido para la inmovilización) dentro del pocillo hasta que se desnaturalice para proporcionar ADNmc.

20 Por lo tanto, esta UV o equivalente sirve como una alternativa a una etapa de lavado para quitar ADN que no esté en el pocillo o cualquier ADNbc que no esté en el pocillo.

25 El molde a amplificar es muy preferentemente ADNbc. Para la secuenciación de la etapa de secuenciación, el molde preferentemente estará en forma de ADNmc. Si se proporcionan ADN o ARN bicatenarios se prevé la separación de cadenas, la fusión o la desnaturalización, según sea apropiado para la amplificación o la secuenciación.

30 El oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento es un oligonucleótido para la inmovilización dentro de un pocillo o sobre una superficie del chip. Este es un enlazador, para distinguirlo del cebador o la sonda (al menos uno de los cuales necesita estar inmovilizado en un extremo para evitar que el complejo de amplificación o de secuenciación se lave).

Si no está presente una tapa de sellado (incluyendo si una se ha retirado), entonces hay o puede haber un flujo constante de líquido hacia dentro o fuera de los pocillos.

35 La amplificación en fase sólida tal como la amplificación puente es preferente dado que permite que un molde inmovilizado se amplifique utilizando cebadores adyacentes para formar un grupo inmovilizado de moldes amplificados de forma clonal. La amplificación puente habitualmente contiene al menos dos poblaciones de oligonucleótidos inmovilizados (por ejemplo sobre las paredes de los pocillos o la superficie de las perlas allí situadas) en el pocillo. Por ejemplo, los primero y segundo oligonucleótidos pueden diseñarse para hibridar con el 5' y el 3' del molde, respectivamente. El procedimiento implica introducir en promedio un molde en cada pocillo, en donde por ejemplo el 5' del molde se hibrida con el primer oligonucleótido y el 3' del molde hibrida con el segundo oligonucleótido, formando un puente. En presencia de nucleótidos y de la polimerasa, se desarrolla la extensión de ácido nucleico a partir del extremo 3' del segundo oligonucleótido. Ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y extensión conducen a un grupo de molde amplificado.

40 En general, sin embargo, no se necesitan tapas de sellado (tapas que se pueden retirar) para la amplificación en fase sólida dado que todos los moldes amplificados de forma clonal están inmovilizados, y habrá un flujo constante de reactivos sobre los pocillos.

45 Las reacciones de amplificación y de secuenciación de un molde de ácido nucleico preferentemente se realizan en el mismo pocillo.

50 En una realización preferente, el chip semiconductor y la estructura microfluida son desechables. Una ventaja de tener un aparato de detección desechable es maximizar la precisión de la secuenciación eliminando cualquier posibilidad de contaminación cruzada entre usos. Una ventaja adicional es la capacidad de proporcionar un medio para ocultar o secuestrar de forma temporal oligonucleótidos inmovilizados sobre una superficie en un pocillo, lo que de otra forma no sería posible si el aparato de detección no fuese desechable. Tal medio para ocultar de forma temporal oligonucleótidos inmovilizados sobre la superficie en un pocillo se describe con mayor detalle a continuación, pero puede incluir una capa de cera sobre la superficie del pocillo.

55

Realizaciones de los usos del aparato de detección

Para la secuenciación eficaz, es conveniente que la reacción de secuenciación en cada pocillo contenga solo una especie de molde de ácido nucleico. Dado que para la secuenciación se utilizan moldes amplificados (amplicones), es conveniente que cada reacción de amplificación clonal se inicie con un único molde de ácido nucleico.

5 Estrategia de dilución limitada

En esta realización particular, cada pocillo del aparato de detección se modifica con una pluralidad de cebadores universales y se restringe el número de moldes proporcionado. Es decir, los cebadores universales se han inmovilizado en la superficie de las paredes del pocillo y/o en la superficie de la perla (o perlas) que están contenidas en el pocillo. Los moldes se han preparado para la amplificación y la secuenciación, como se describió anteriormente, incluyendo la etapa del ligamiento del extremo de adaptadores universales a los moldes.

Cuando se hace fluir una muestra en los pocillos, los moldes de ácido nucleico se unen en los pocillos mediante hibridación entre los adaptadores universales y los cebadores universales.

La población resultante de los pocillos puede dividirse en tres categorías: pocillos que no contienen molde de ácido nucleico; pocillos que contienen un molde de ácido nucleico y pocillos que contienen 2 o más moldes de ácido nucleico. La distribución de estas categorías se puede modelar por la distribución de Poisson. La distribución esperada de las distintas categorías de pocillos depende de la proporción del número de moldes con respecto al número de pocillos. Cuando existen más moldes que pocillos, la distribución se desviará hacia los pocillos con 2 o más moldes de ácido nucleico. Cuando hay más pocillos que moldes, la distribución se desviará hacia los pocillos que no contienen molde.

A base del modelo de distribución de Poisson, se ha calculado que la proporción óptima entre el número de moldes proporcionados a los pocillos (recuento de copias del molde) y el número de pocillos es 1:1. A esta proporción óptima, el número de pocillos con sólo un único molde comprende el 37 % del número total de pocillos. Esta proporción puede estar entre 2:5 y 2:1, de forma que el porcentaje de pocillos con una única copia es todavía de aproximadamente el 25 %. La proporción se puede ajustar mediante el ajuste del número de moldes en una muestra ya sea mediante concentración o dilución.

Debe indicarse que el cambio en la proporción no es directamente proporcional al cambio en el sesgo de la distribución. Como tal, es necesario un cambio significativo de la proporción para ver un sesgo de pequeño cambio en la distribución. En consecuencia, es solo necesario determinar una estimación gruesa de un recuento de copias del molde en una muestra para obtener un sesgo de la distribución óptimo.

En una muestra dada, el recuento de copias del molde caerá dentro de un intervalo esperado. Este intervalo se conoce como la variabilidad de muestra natural. En los casos en donde el recuento de copias del molde se considera que cae fuera de la variación aceptable, existen procedimientos para determinar, o "controlar" el recuento de copias del molde. Uno de tales procedimientos es llevar a cabo una etapa de amplificación adicional, antes de la amplificación y secuenciación, en la que la concentración de reactivo (por ejemplo cebadores) es un factor limitante. Por lo tanto, tras esta etapa de amplificación adicional, el recuento de copias del molde de ácido nucleico puede establecerse hasta una cantidad predeterminada a base de la concentración del reactivo limitante.

Otro procedimiento para controlar el recuento de copias del molde es añadir a la muestra un número conocido de sitios de captura, por ejemplo sobre una perla, y posteriormente lavar el exceso de moldes de ácido nucleico. Después, los moldes unidos a las perlas pueden liberarse en solución para obtener una cantidad predeterminada.

Una vez que los moldes de ácido nucleico se han hibridado dentro de los pocillos, cualquier molde no hibridado se retira mediante una etapa de lavado. Después, los pocillos se llenan con una mezcla de reacción de amplificación. Los reactivos necesarios para la PCR u otras técnicas de amplificación son bien conocidos en la técnica y se han mencionado anteriormente. Una vez que la mezcla de reacción está en los pocillos, los pocillos se sellan con un sello que se puede retirar. Después, la reacción de amplificación tiene lugar en el pocillo sellado, el sello previene cualquier contaminación cruzada de moldes entre pocillos. Durante la amplificación, los moldes amplificados hibridan con los cebadores universales inmovilizados y por lo tanto se anclan al pocillo. Una vez que finaliza la reacción de amplificación, el sello se retira y los pocillos se lavan para retirar cualquier molde no unido. Los moldes pueden, de forma opcional, someterse a una etapa de desnaturalización para asegurar que todos los moldes de la reacción de secuenciación son monocatenarios. Cuando se aplica una etapa de desnaturalización, también se necesita una etapa de lavado extra para retirar cualquier reactivo implicado en la etapa de desnaturalización.

Con los moldes amplificados ahora listos para la secuenciación, se hace fluir en las celdas ADN polimerasa y se permite que se una a los moldes. Después, se hace fluir sobre los pocillos ciclos de nucleótidos individuales, con una etapa de lavado entre cada ciclo de nucleótidos. El ISFET detecta si hay un cambio en el pH con cada ciclo de nucleótidos que se hace fluir en los pocillos, señalizando un cambio en el pH una inserción de un nucleótido en una cadena naciente. Después, se compila la secuencia del molde obtenido de cada pocillo para generar la secuencia del molde nucleico original en una muestra.

Es posible distinguir los resultados de secuenciación de pocillos sin molde de pocillos con dos o más moldes, y por lo tanto, descartar estos según sea necesario, ya sea durante el procesamiento de los datos en tiempo real o después del procesamiento. Los pocillos sin molde unido no habrán tenido molde amplificado y de este modo no habrá habido moldes amplificados. Como tal, no se obtendrán a partir de estos pocillos resultados de secuenciación.

- 5 Los pocillos con 2 o más moldes habrán tenido copias de dos o más especies de moldes amplificados tras la etapa de amplificación. Como tal, durante la secuenciación estos pocillos es probable que proporcionen un indicio de las reacciones de inserción para un mayor número de ciclos de nucleótidos que el esperado. Además, en estos pocillos los cambios en el pH para cada reacción de inserción serán más débiles en comparación con los pocillos con una especie de moldes amplificados.

10 Sitio de captura único

En otra realización, la distribución de moldes exclusivos se puede mejorar controlando el número de sitios de captura (es decir oligonucleótidos inmovilizados) en un pocillo. En este caso, se proporcionan los moldes en exceso del número de pocillos/sitios de unión. Limitando el número de sitios de captura a uno por pocillo es posible asegurar que cada pocillo tendrá solo un único molde unido en él. El sitio de captura es un oligonucleótido inmovilizado, preferentemente un cebador universal.

- 15 En una realización, en cada pocillo hay una única perla que comprende un único oligonucleótido inmovilizado. Esto puede lograrse utilizando una perla de captura que sea suficientemente grande en comparación con el pocillo, de forma que cada pocillo pueda contener solo una única perla de captura.

- 20 Como alternativa, se puede disponer una superficie del pocillo para contener solo una única perla. Por ejemplo, el tamaño de una zona sobre la superficie que tiene un complejo específico para el material de la perla puede acomodar solo una única perla de captura. La perla puede comprender Alizarina y una zona sobre la superficie del pocillo puede ser de aluminio, formada por el depósito de aluminio o el grabado de la superficie del pocillo hasta una capa de aluminio. Como un segundo ejemplo, se puede cargar un electrodo (preferentemente el electrodo de referencia) para atraer una perla (que puede cargarse de forma opuesta), siendo la zona del electrodo suficiente solo para acomodar una única perla de captura.

- 25 Cuando se hayan proporcionado los oligonucleótidos a los pocillos (preferentemente cebadores universales) inmovilizados ya sobre la superficie del pocillo, se necesitará secuestrar de los moldes los oligonucleótidos en una muestra de forma que no estén disponibles para la hibridación cuando el molde se haga fluir sobre los pocillos. En cambio, el único sitio de captura disponible en el pocillo será el de la perla. Los oligonucleótidos pueden secuestrarse recubriendo la superficie interna de los pocillos con un material que pueda retirarse de forma fácil, tal como cera.

En general, la cera se puede reemplazar por una proteína inactivada.

- 35 En una realización preferentemente, los pocillos del aparato de detección se pueden suministrar con un recubrimiento o capa de cera sobre la superficie interna de los pocillos. La cera puede ser parafina. Después, se añadirá una única perla a cada pocillo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica y descritos anteriormente. Los oligonucleótidos o sitios de captura se secuestran solo de forma temporal dado que necesitarán estar disponibles para la hibridación con los moldes amplificados producidos por otra amplificación. El recubrimiento de cera (que puede también denominarse como una capa) será de una profundidad suficiente para ocultar los oligonucleótidos. Al mismo tiempo, el pocillo no debería llenarse con el recubrimiento o capa de cera dado que esto eliminaría los pocillos. El grosor adecuado para el recubrimiento o capa de cera puede estar en la región de 10 nm a 100 nm. El recubrimiento de cera puede aplicarse mediante evaporación o un dosificador de chorro de tinta o por flujo de la solución de cera sobre la estructura microfluida.

- 40 Como alternativa, los múltiples sitios de captura pueden hacerse no disponibles de forma inicial mediante un terminador reversible u otras técnicas conocidas para bloquear la hibridación o la amplificación, lo que después se retira cuando el molde no unido se ha retirado. O puede ser que el único sitio de unión tenga una química de unión distinta que los sitios de unión extra (conocidos), lo que significa que solo el sitio único es adecuado para la captura de la copia inicial, mientras que los otros sitios son adecuados para la captura de amplicones.

- 45 Cuando los pocillos del aparato de detección se proporcionan sin oligonucleótidos inmovilizados sobre la superficie de las paredes del pocillo, no es necesario recubrir con cera las paredes internas del pocillo. En cambio, pueden suministrarse sobre las perlas de amplificación sitios adicionales para los moldes amplificados, que son preferentemente los suficientemente pequeños para ajustarse alrededor de la perla de captura en un pocillo y proporcionar una elevada proporción de área de superficie con respecto al volumen. La perla de captura se refiere a la perla a la que se ha unido un único molde, estando restringida a una por pocillo. Las perlas de 'amplificación' se pueden suministrar a cada pocillo tras la hibridación del molde con la perla de captura y tras la retirada de cualquier molde no unido a través de una etapa de lavado. Las perlas de 'amplificación' pueden ser de 10 nm a 100 nm.

Los moldes de ácido nucleico en la muestra se habrán preparado para la amplificación y secuenciación como se describió anteriormente, preferentemente incluyendo la etapa de ligamiento del extremo de los moldes con adaptadores universales.

Los moldes se hacen fluir sobre los pocillos de forma que un único molde esté unido a una única perla en cada pocillo. Cualquier molde en exceso no unido se retira a través de una etapa de lavado. En una realización preferente, después se funde el recubrimiento de cera mediante la aplicación de calor, preferentemente producido mediante el medio de calentamiento del aparato de detección, y de forma opcional la cera se retira de los pocillos a través de una etapa de lavado. Durante el procedimiento de amplificación puede dejarse fundir el recubrimiento de cera como consecuencia del calentamiento de los pocillos.

Los pocillos se llenan con una mezcla de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para una reacción de amplificación. Una vez que la mezcla está en los pocillos, los pocillos se sellan con un sello que se puede retirar.

La reacción de amplificación tiene lugar en el pocillo sellado, evitando el sello que se puede retirar cualquier contaminación cruzada de moldes entre pocillos. Durante la amplificación, los moldes amplificados hibridan con los oligonucleótidos inmovilizados (preferentemente cebadores universales) y por lo tanto se anclan a los pocillos. Una vez que la reacción de amplificación ha finalizado, se retira el sello y los pocillos se lavan para retirar los reactivos y cualquier molde no unido. De forma opcional, los moldes pueden someterse a una etapa de desnaturalización para asegurar que todos los moldes de la reacción de secuenciación son monocatenarios. Cuando se aplica una etapa de desnaturalización, también se necesita una etapa de lavado extra para retirar cualquier reactivo implicado en la etapa de desnaturalización.

Con los moldes amplificados ahora listos para la secuenciación, se hace fluir la ADN polimerasa en los pocillos y se permite que se una a los moldes. Después, se hacen fluir ciclos de nucleótidos individuales sobre los pocillos, con una etapa de lavado entre cada nucleótido. El ISFET detecta cualquier cambio en el pH en cada ciclo de nucleótidos que se hace fluir en los pocillos, señalizando un cambio en el pH una inserción de un nucleótido a una cadena naciente. La secuencia del molde obtenida de cada pocillo se compila después para generar la secuencia del molde nucleico original en una muestra.

En otra realización, se proporciona al chip una única perla de captura en cada pocillo. Las perlas de 'amplificación' se pueden proporcionar separadas del chip, como parte de un kit.

Además, en todavía otra realización, puede ser posible asegurarse de que solo un único molde está unido en un pocillo añadiendo un FET a cada pocillo, además del ISFET. El FET funcionará para medir un cambio en la unión. Utilizando el electrodo de referencia en cada pocillo se aplica una carga positiva de forma local en el pocillo. Los electrodos pueden controlarse de forma individual. La carga positiva atrae a los moldes cargados de forma negativa de la solución que está por encima del pocillo hacia dentro del pocillo. En la unión del primer molde al oligonucleótido inmovilizado (cebador universal), la carga de la unión se detecta mediante el FET. Un controlador que controla la señal de salida del FET puede inactivar el potencial de electrodo del electrodo de referencia para evitar atraer moldes adicionales hacia los pocillos. El FET puede ser un ISFET o puede haber otro transistor en el pocillo que preferentemente mida la carga del ADN que se une a la superficie del FET. La superficie del FET puede contener los cebadores universales inmovilizados pero en un número limitado y cuando el molde híbrida con estos cebadores el FET detecta la carga de una única molécula y ese FET puede desencadenar que la tensión de referencia del ISFET se active en el pocillo particular. Por lo tanto se puede crear la única copia del molde para la preparación de la etapa de amplificación clonal.

Una vez que todos los pocillos individuales tienen un único molde unido a ellos, cualquier molde en exceso no unido se retira a través de una etapa de lavado. Después, los pocillos se llenan con una mezcla de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios. Después, los pocillos se sellan con un sello que se puede retirar.

Después, la reacción de amplificación tiene lugar en el pocillo sellado, evitando el sello que se pueda retirar cualquier contaminación cruzada de moldes entre pocillos. Durante la amplificación, los moldes amplificados hibridan con los oligonucleótidos inmovilizados (preferentemente cebadores universales) y por lo tanto se anclan a los pocillos. Una vez que la reacción de amplificación ha finalizado, el sello se retira y los pocillos se lavan para retirar cualquier molde no unido y también los reactivos utilizados para la amplificación. Los moldes pueden opcionalmente someterse a una etapa de desnaturalización para asegurar que todos los moldes para la reacción de secuenciación son monocatenarios. Cuando se aplica una etapa de desnaturalización, también se necesita una etapa de lavado extra para retirar cualquier reactivo implicado en la etapa de desnaturalización.

Con los moldes amplificados preparados ahora para la secuenciación, los cebadores de secuenciación hibridan junto con la unión de la ADN polimerasa en el molde. Después, se hacen fluir ciclos de nucleótidos individuales en los pocillos, con una etapa de lavado entre cada nucleótido. El ISFET detecta cualquier cambio en el pH con cada ciclo de nucleótido que se hace fluir en los pocillos, señalizando un cambio en el pH una inserción de un nucleótido a una cadena naciente. Después, la secuencia del molde obtenida de cada pocillo se compila para generar la secuencia del molde nucleico original en una muestra.

Captura específica de secuencia

En aún otra realización, la distribución de los moldes se puede mejorar utilizando sitios de captura (es decir oligonucleótidos inmovilizados) que son específicos para una secuencia definida, que se anticipa que esté, pero puede no estarlo, presente solo en un subgrupo (es decir en determinada proporción) de moldes. Tal sitio de captura específico está en contraste con los cebadores universales, según se utilizaron en las realizaciones previas descritas anteriormente, que se unen de forma indiscriminada a todas las especies de molde en una muestra dada (a través de hibridación entre cebadores universales y adaptadores universales). Los ejemplos incluyen cebadores específicos para la región de identificación genética del ARNr 16S o ARNr 23S de una bacteria. Los cebadores en los pocillos, complementarios a las regiones conservadas dentro de estas regiones identificación genética, se unirán de forma selectiva con moldes procedentes de bacterias, aunque no todos los moldes unidos serán necesariamente idénticos o copias.

Como alternativa, los cebadores pueden ser específicos para marcadores añadidos a moldes de inicio individuales, en cuyo caso se crea una población monoclonal dentro del pocillo mediante la captura solo de amplicones que se originaron a partir de ese único fragmento de inicio. La preparación de las muestras para su uso en esta realización puede no necesitar que los moldes estén ligados por su extremo con cebadores universales. Los moldes pueden estar ligados con un adaptador específico, llamado un 'código de barras'. Los códigos de barras pueden incluirse en la preparación de la muestra mediante diversos medios conocidos, que incluyen ligamiento o simplemente incluyendo la secuencia código de barra en los cebadores de amplificación. El código de barra, mediante el marcaje de las especies de inicio iniciales del amplicón, asegura que los amplicones se auto clasifiquen en grupos monoclonales en el ISFET.

Restringiendo cada pocillo para que contenga oligonucleótidos para una secuencia específica, es posible asegurar que se unirán a cada pocillo solo moldes que comprenden la secuencia definida, eliminando de este modo el riesgo de contaminación cruzada de moldes entre pocillos. Por lo tanto, puede no necesitarse durante la amplificación un sello que se pueda retirar.

Aunque cada pocillo tendrá un cebador específico, pueden estar agrupados en regiones una pluralidad de pocillos, teniendo cada región de pocillos un tipo particular de cebador (tal como cebadores de bacterias o cebadores de virus), de forma que un único chip puede contener muchos cebadores específicos de secuencia distintos. Los cebadores en una dada región pueden así ser todos complementarios al código de barras o región conservada y, de forma adicional, cada pocillo en esa región será complementario a una base diana o secuencia diana distinta para detectar una variante. Por lo tanto, la actividad de la reacción en una región dada del chip puede indicar la presencia general de un género de bacterias y la secuenciación posterior puede determinar las especies de bacteria o variante alélica de una especie.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, los moldes pueden amplificarse fuera de los pocillos para crear varias poblaciones mixtas de moldes amplificados.

Los moldes amplificados se hacen fluir en los pocillos para permitir la hibridación de los moldes dentro de los pocillos. Solo se unirán a los pocillos los moldes que comprendan una secuencia definida complementaria a los cebadores específicos de secuencia. Tras la hibridación de los moldes en los pocillos, cualquier molde no hibridado se retira mediante una etapa de lavado. Después, los pocillos se llenan de forma opcional con una mezcla de reacción de amplificación que contiene los reactivos necesarios para aumentar la fuerza de la señal. Los reactivos necesarios para la amplificación son bien conocidos en la técnica y se han mencionado anteriormente.

Durante la etapa de amplificación opcional, los moldes amplificados hibridan con los oligonucleótidos inmovilizados (cebadores) y se anclan a los pocillos. Los pocillos se lavan para retirar los reactivos de la reacción de amplificación y cualquier molde no unido. Los moldes opcionalmente pueden someterse a una etapa de desnaturalización para asegurarse que todos los moldes para la reacción de secuenciación son monocatenarios. Cuando se aplica una etapa de desnaturalización, también se necesita una etapa de lavado extra para retirar cualquier reactivo implicado en la etapa de desnaturalización.

Con los moldes ahora preparados para la secuenciación, se hace fluir la ADN polimerasa en los pocillos y se permite que se una a los moldes. Después, se hacen fluir ciclos de nucleótidos individuales sobre los pocillos, con una etapa de lavado entre cada nucleótido. El ISFET detecta cualquier cambio en el pH con cada ciclo de nucleótidos que se hace fluir en los pocillos, señalizando un cambio en el pH una inserción de un nucleótido a una cadena naciente. Después, la secuencia del molde obtenida de cada pocillo se compila para generar la secuencia del molde nucleico original en una muestra.

Lo siguiente representa una realización muy particular de la invención y, aunque es preferente, se proporciona principalmente solo para fines de ejemplificación. Se refiere a una realización en donde la amplificación se produce en el pocillo, pero puede aplicarse igualmente en cualquier otro lugar en donde se produzca la amplificación:

- 1) Se toma una muestra que comprende ácido nucleico de interés (el molde) y se prepara la muestra, preferentemente se fragmenta;
- 2) Se añade la muestra preparada a múltiples (al menos 2, pero probablemente miles o millones) pocillos,

comprendiendo los pocillos cebadores adecuados para la amplificación del molde;

3) El pocillo también comprende polimerasa y una fuente de nucleótidos (por ejemplo los dNTP) - estos pueden añadirse con el molde o pueden ya estar presentes;

4) Opcionalmente, los pocillos pueden comprender una o más perlas, pero al menos uno de los cebadores debe estar inmovilizado (ya sea de forma directa o indirecta) a través de un oligonucleótido sobre una superficie dentro del pocillo (ya sea la superficie interna del pocillo o cámara, o sobre una perla si está presente);

5) La amplificación del molde se produce a 60-65 grados C para la amplificación isotérmica o a temperaturas adecuadas para la PCR;

6) Una vez que se ha logrado un nivel de amplificación suficiente (lo que puede determinarse mediante varios medios, incluyendo número o tiempo de ciclos único, preferentemente mediante el ISFET como en la publicación anterior sobre qPCR de los inventores) dependiendo de la fuerza de señal necesaria, los reactivos de amplificación y cualquier molde no unido (es decir no inmovilizado) se elimina mediante lavado, dejando el molde inmovilizado;

7) Se pasan sobre o en el pocillo oleadas de los dNTP individuales y cada ISFET detecta si hay liberación de protones en el pocillo que corresponde a cada oleada, de forma que la liberación de protones (y por lo tanto la inserción de nucleótidos) se correlaciona con la secuencia de la cadena en crecimiento (naciente) a base de la cadena inmovilizada, proporcionando así la secuencia de la cadena inmovilizada (a través de su complementaria, la cadena naciente a la que los dNTP se están añadiendo mediante la polimerasa);

8) Se produce el cotejo de los datos de ISFET y se determina la secuencia.

También se proporciona un procedimiento de amplificación de un molde de ácido nucleico seguido de la secuenciación del molde amplificado, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

A) combinar un molde de ácido nucleico con reactivos de amplificación que comprenden la polimerasa, los dNTP y los cebadores para la amplificación de ácido nucleico para formar una mezcla;

B) proporcionar la mezcla en A) a una pluralidad de pocillos en un aparato sensible a iones en el que el aparato sensible a iones comprende el sensor de ISFET, un calentador y un control de temperatura, y en el que cada uno de los pocillos está en contacto con al menos un sensor ISFET;

C) realizar la amplificación de ácido nucleico en los pocillos;

D) identificar la secuencia del molde amplificado en los pocillos.

La invención también proporciona un procedimiento de amplificación de un molde de ácido nucleico seguido de la secuenciación del molde amplificado, en el que la amplificación y la secuenciación se realizan en el mismo pocillo sobre un chip, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

A) Mezclar el molde de ácido nucleico con los reactivos de amplificación que comprenden la polimerasa, los dNTP y los primero y segundo cebadores, en el que el primer cebador tiene la capacidad de unirse a una primera especie de molde de ácido nucleico monocatenario, y el segundo cebador tiene la capacidad de unirse a un segundo molde de ácido nucleico monocatenario, en el que la segunda de las especies de molde de ácido nucleico monocatenario es complementaria de la primera;

B) poner en contacto la mezcla en A) con una pluralidad de pocillos en un aparato sensible a iones, de forma que cada pocillo comprenda en promedio una única copia del molde de ácido nucleico, en el que cada pocillo comprende oligonucleótidos inmovilizados sobre una superficie de un soporte sólido y en el que la secuencia del oligonucleótido es idéntica a a al menos una parte del primer cebador, en el que el oligonucleótido tiene la capacidad de unirse a la primera de las especies de molde de ácido nucleico monocatenario;

C) cubrir el pocillo con una tapa de sellado;

D) realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico mediante la cual el molde de ácido nucleico se amplifica con los primer y segundo cebadores, y en la que la primera de las especies de molde de ácido nucleico monocatenario se genera de forma preferencial y tiene la capacidad de unirse a los primeros cebadores y los oligonucleótidos inmovilizados sobre el soporte sólido;

E) extender los oligonucleótidos para formar la segunda especie de molde de ácido nucleico monocatenario, en la que la secuencia la segunda especie de molde de ácido nucleico monocatenario es complementaria a la primera especie de molde de ácido nucleico monocatenario hibridada a los nucleótidos;

F) retirar la tapa de sellado de C);

G) desnaturalizar el molde de ácido nucleico inmovilizado en el que solo la segunda especie de molde de ácido nucleico monocatenario está unida al soporte sólido;

H) añadir el cebador de secuenciación y la polimerasa al pocillo, en el que el cebador de secuenciación hibrida con una región 3' de la segunda de las especies de molde de ácido nucleico monocatenario;

I) añadir un nucleótido al pocillo;

J) detectar un cambio de pH resultante de la liberación de protones si el nucleótido se hidroliza o se incorpora;

K) lavar los pocillos para retirar los nucleótidos no incorporados;

L) repetir I-K para definir la secuencia del molde de ácido nucleico.

- 5 Preferentemente, el aparato comprende un sensor ISFET, un calentador y un control de temperatura, y en el que cada pocillo está en contacto con al menos un sensor ISFET.

10 Debería apreciarse que en la discusión anterior se han desvelado varias etapas, y el experto apreciará que estas etapas pueden combinarse y algunas etapas omitirse según sea apropiado para proporcionar un procedimiento o aparato que cree o recopile una población de moldes (la cual es al menos idéntica con una región de interés), cuyos moldes están inmovilizados dentro de un pocillo. El orden de estas etapas puede cambiarse y la extensión de cada etapa puede variarse dentro de lo razonable, de modo que se obtenga el resultado de la secuencia deseada en un tiempo, costo y confianza dados. El aparato y los procedimientos se han descrito en términos de la estructura y condiciones necesarias para lograr un resultado pretendido en un número sustancial de pocillos, pero el experto apreciará que este resultado no se logrará en cada pocillo debido a errores, variaciones de la calidad de los

15 elementos y variación estadística.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la secuencia de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el procedimiento:

- 5 proporcionar los moldes a una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a un ISFET;
 proporcionar un sello;
 amplificar los moldes;
 inmovilizar al menos un molde dentro de cada pocillo; posteriormente
 crear una población clonal dentro de cada pocillo; posteriormente
 retirar el sello; y posteriormente
 10 secuenciar las colonias de molde en los pocillos.

2. Un procedimiento de determinación de la secuencia de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 15 proporcionar la pluralidad de moldes a una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a un ISFET;
 proporcionar un sello a los pocillos para aislar pocillos adyacentes;
 amplificar de forma clonal los moldes sobre un sustrato sólido en cada pocillo;
 retirar el sello; y
 secuenciar los moldes amplificados en los pocillos.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente verificar una señal de salida del ISFET para detectar subproductos de las reacciones de hidrólisis que implican a dichos moldes en dichos pocillos.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que un ácido nucleico en una muestra se fragmenta antes de la amplificación para crear la pluralidad de polinucleótidos molde.

5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que comprende

- 25 proporcionar los moldes a los pocillos en una proporción de un molde con respecto a entre 0,4 y 2 pocillos, preferentemente un molde con respecto a aproximadamente cada pocillo.

6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende proporcionar un único sitio de unión al molde en cada pocillo para inmovilizar un único molde.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el único sitio de unión al molde está sobre una perla, preferentemente en la que ya sea (a) la perla está unida a una superficie de cada pocillo mediante un sitio de unión solo lo suficientemente grande para unir una perla o (b) dicha perla está dimensionada de forma que sólo una de tales perlas puede ajustarse en cada pocillo.

8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente la etapa de controlar cargas en los electrodos expuestos a cada pocillo, para atraer moldes a cada pocillo, en el que preferentemente la carga en los electrodos individuales en cada pocillo se retira o invierte después de la detección de la unión de un molde a una superficie de ese pocillo.

9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los oligonucleótidos específicos de secuencia inmovilizados dentro del pocillo se unen a una o más cadenas de un tipo de molde diana en un único sustrato sólido.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que los oligonucleótidos inmovilizados dentro del pocillo están secuestrados, preferentemente recubriendo los oligonucleótidos con cera, preferentemente en el que el secuestro de los oligonucleótidos inmovilizados se retira calentando la cera, preferentemente después de lavar el molde no unido de los pocillos.

11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de proporcionar a cada pocillo una pluralidad de perlas que tienen sitios de unión adicionales para la amplificación clonal del molde unido en ese pocillo, siendo preferentemente la etapa realizada después del lavado del molde no unido de los pocillos.

12. Un aparato de detección para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el aparato:

- 50 - un chip semiconductor que tiene una pluralidad de ISFET,
 - una estructura microfluida que define una pluralidad de pocillos, en la que cada pocillo está expuesto a al menos uno de los ISFET;
 - un sello que se puede retirar dispuesto para cubrir una superficie de la estructura microfluida aislando así de forma sustancial cada pocillo de pocillos adyacentes;

- medios de amplificación para amplificar los polinucleótidos molde y comprendiendo al menos un medio de calentamiento adecuado para realizar la amplificación del polinucleótido molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y
 - en el que se dispone el pocillo para para crear una población clonal dentro de cada pocillo;
 - medios de secuenciación para secuenciar las colonias de molde en cada pocillo.
- 5
13. Un aparato de detección para la amplificación y secuenciación de una pluralidad de polinucleótidos molde, comprendiendo el aparato:
- un chip semiconductor que tiene una pluralidad de ISFET,
 - una estructura microfluida que define una pluralidad de pocillos, estando cada pocillo expuesto a al menos uno
 - 10 de los ISFET;
 - un sello que se puede retirar dispuesto para cubrir una superficie de la estructura microfluida, aislando así de forma sustancial cada pocillo de pocillos adyacentes;
 - medios de amplificación para inmovilizar y amplificar los polinucleótidos molde dentro de los pocillos y comprendiendo al menos un medio de calentamiento adecuado para realizar la amplificación del polinucleótido
 - 15 molde a temperaturas elevadas con respecto a la temperatura ambiente; y
 - medios de secuenciación para secuenciar los polinucleótidos molde amplificados en los pocillos.
14. Un aparato de detección de acuerdo con la reivindicación 12, en el que hay al menos un oligonucleótido inmovilizado dentro de cada pocillo, cuyo oligonucleótido no está unido a un polinucleótido pero está adaptado para unirse al polinucleótido molde;
- 20 15. Un aparato de detección de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el sello que se puede retirar es un líquido, tal como un aceite mineral.
16. Un aparato de detección de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el sello que se puede retirar es un sólido, tal como una membrana flexible, preferentemente en el que el sello comprende un adhesivo, tal como un adhesivo sensible a la presión.
- 25 17. Un aparato de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que una superficie dentro de cada pocillo está modificada con medios para inmovilizar oligonucleótidos.
18. Un aparato de detección de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que solo un único oligonucleótido está disponible en cada uno de dichos pocillos para hibridar con el polinucleótido molde en la muestra.
- 30 19. Un aparato de detección de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en el que las perlas proporcionan la superficie para la inmovilización de oligonucleótidos, preferentemente en el que las perlas son perlas de poliestireno recubiertas de estreptavidina.
20. Un aparato de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que el medio de calentamiento comprende un elemento calefactor en el chip y, de forma opcional, también un sensor de temperatura en el chip y/o un conjunto de circuitos de control de la temperatura en el chip, preferentemente en el que el calentador en el chip es un elemento calefactor resistivo integrado en el chip, estando el elemento preferentemente
- 35 formado como una ruta de una o más capas metálicas en el chip.

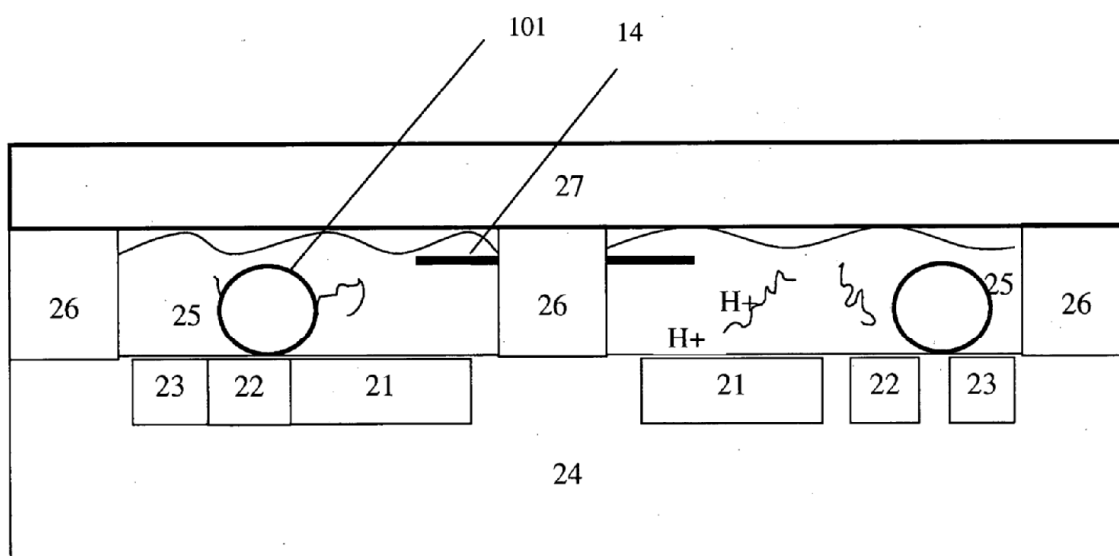


Figura 1

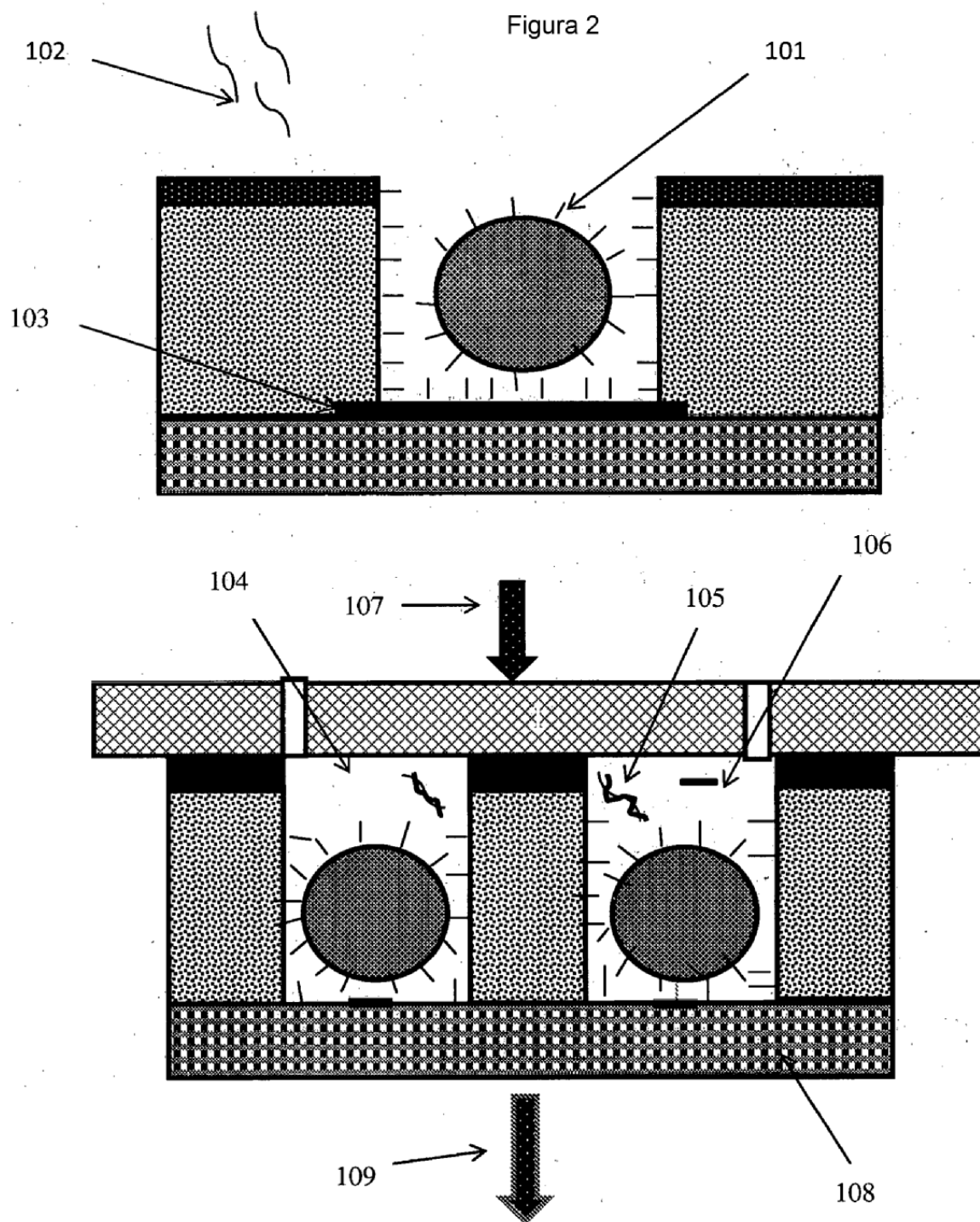
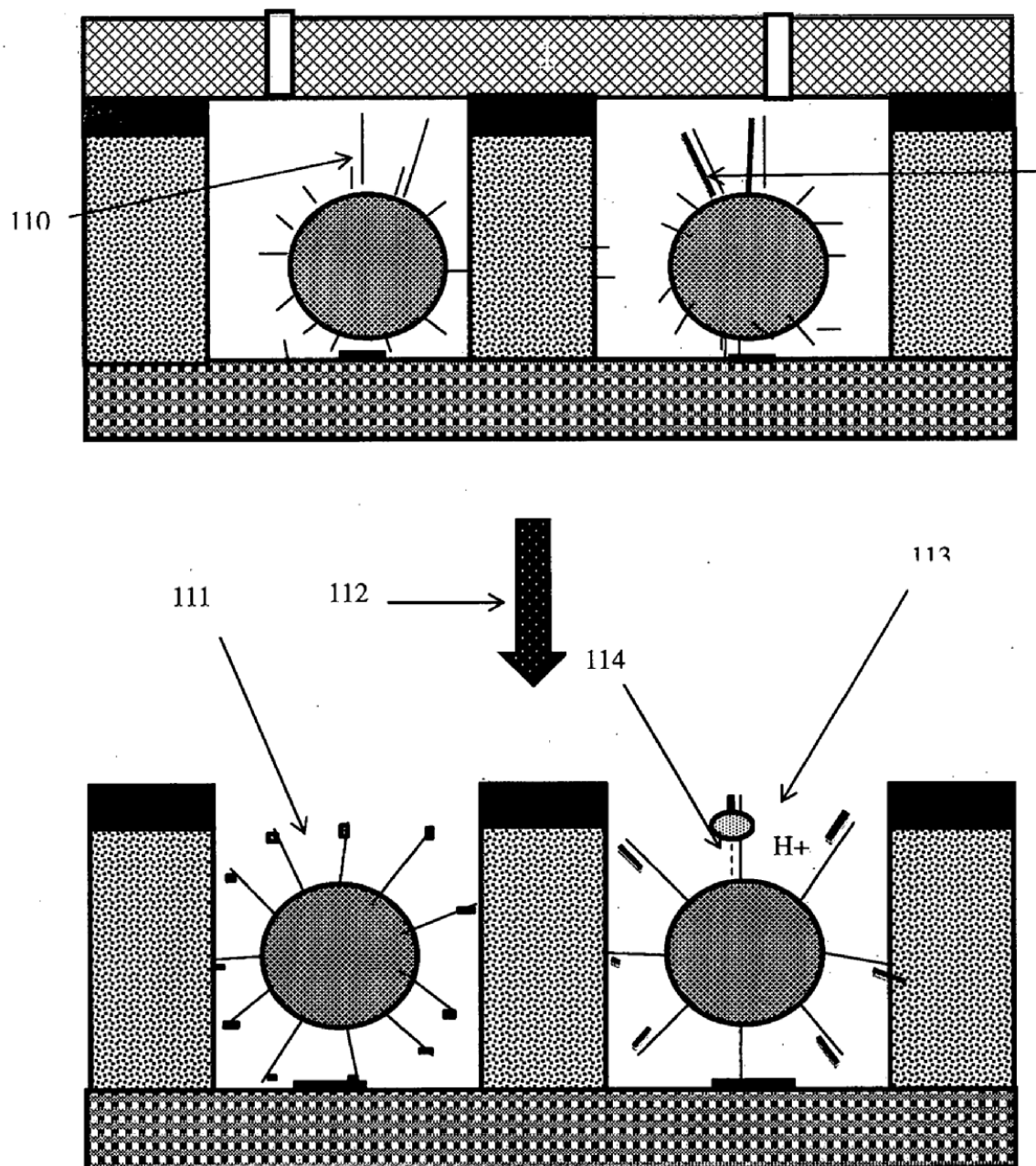


Figura 2 cont.



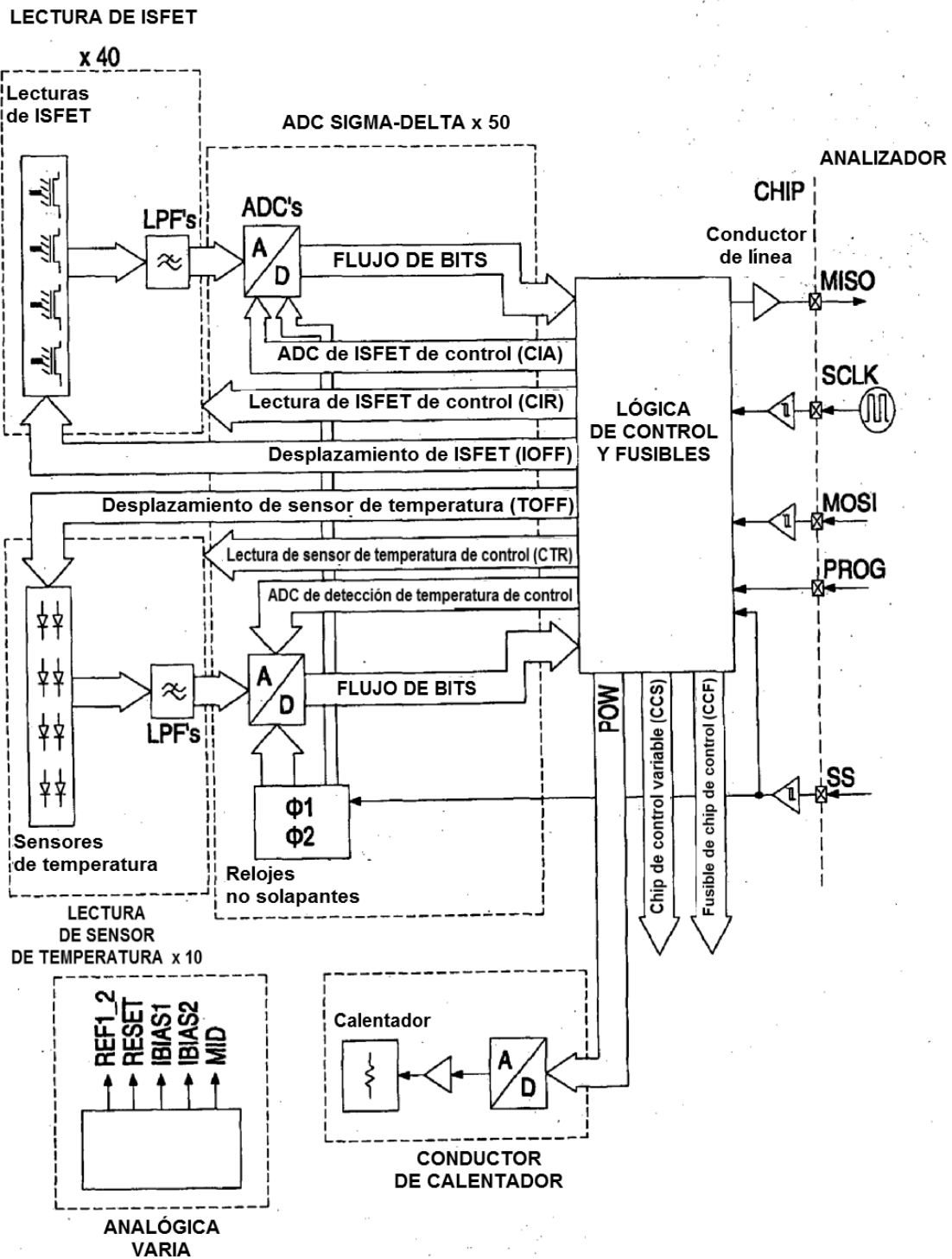


Figura 3

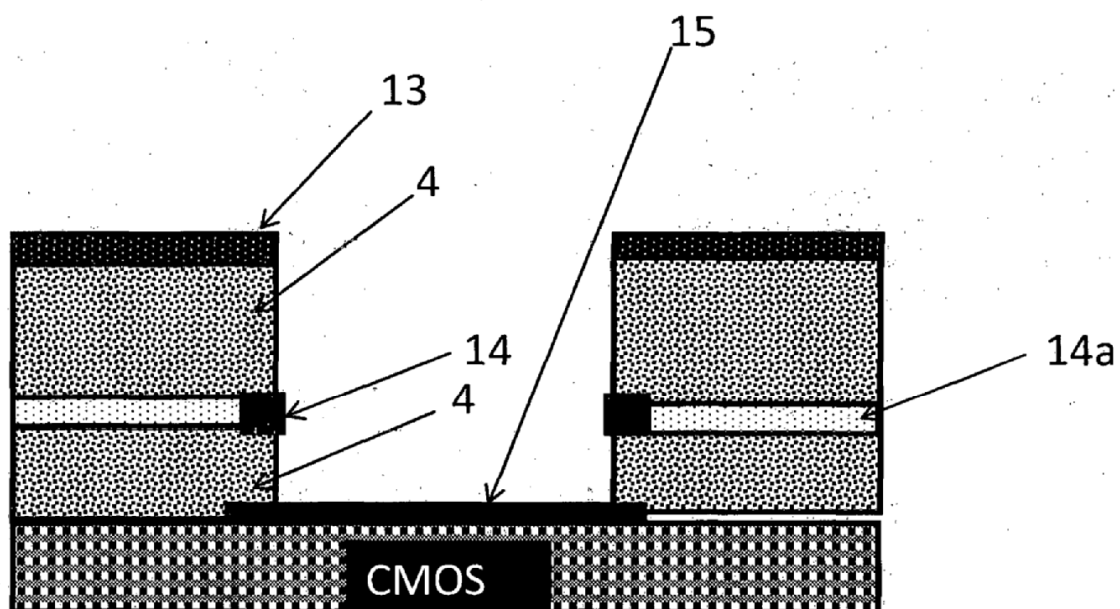


Figura 4

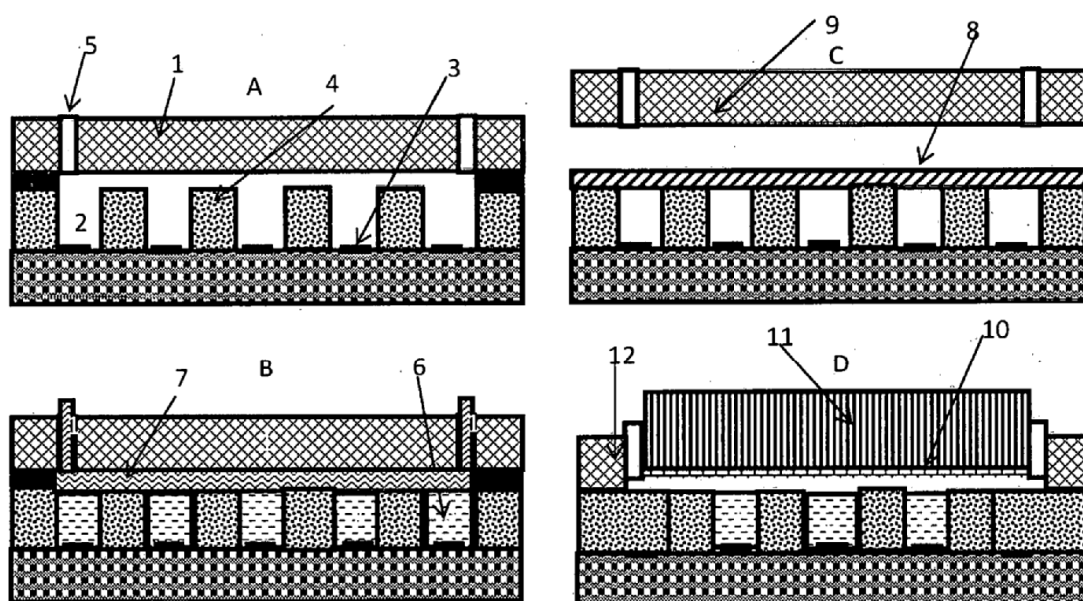


Figura 5

Figura 6

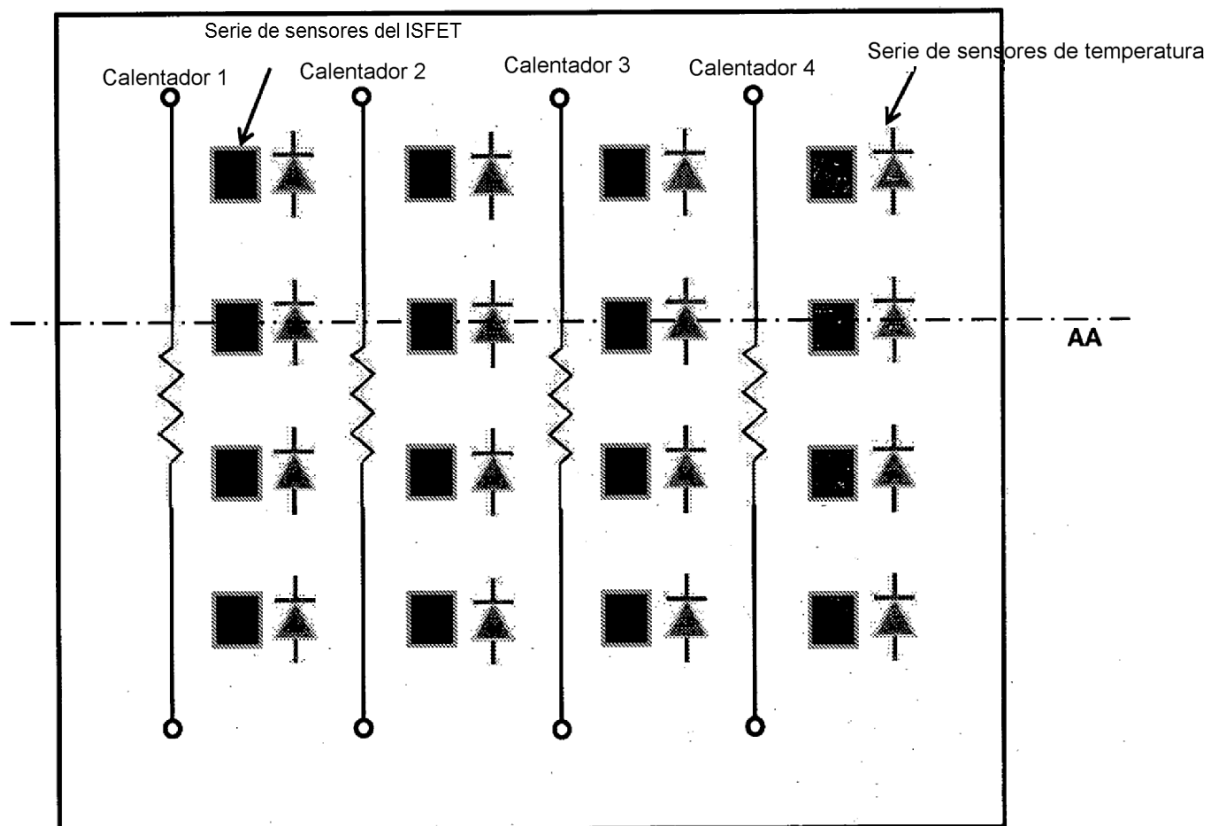
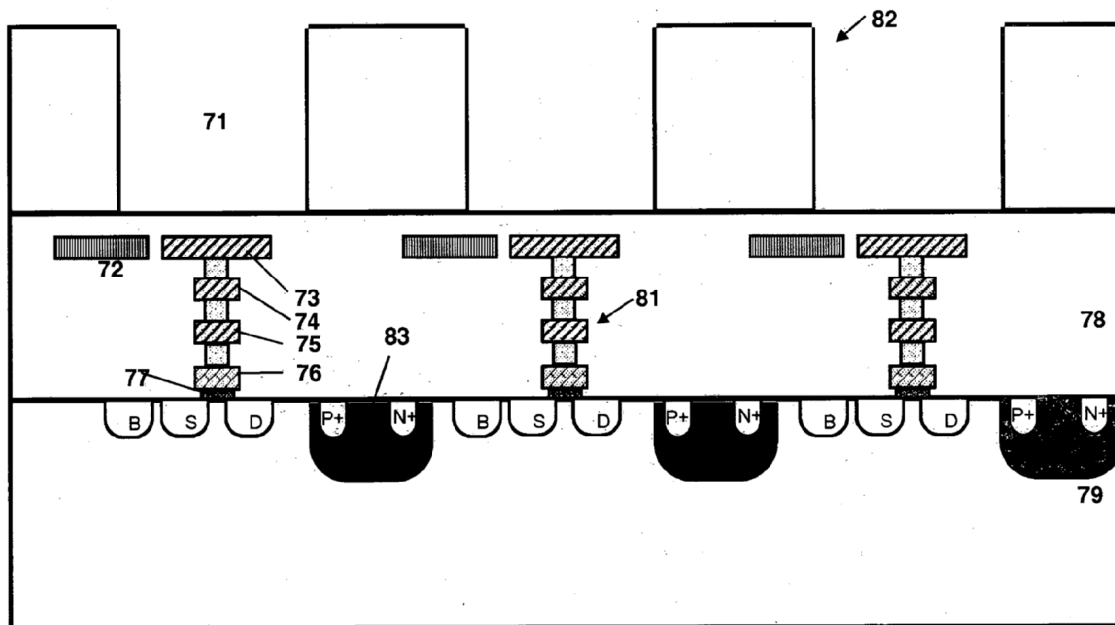


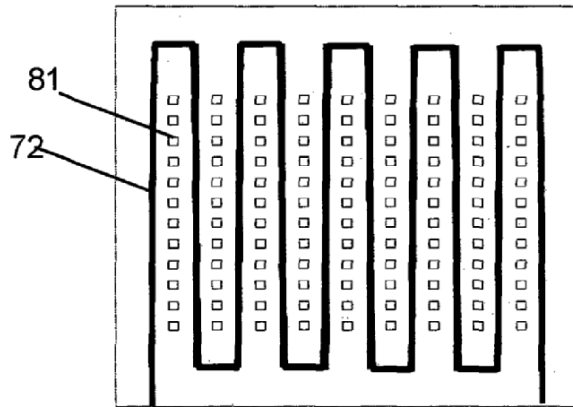
Figura 7



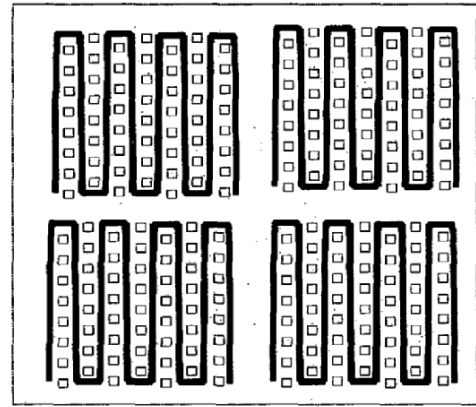
- 71. Pocillo/cámara
- 72. Calentador resistivo metálico superior
- 73. Ventana de detección del ISFET
- 74. 2ª capa metálica
- 75. 3ª capa metálica
- 76. Poliventana
- 77. Ventana de óxido
- 78. Dieléctricos
- 79. Sustrato P.

- 81. Sensor de ISFET
- 82. Chip de secuenciación integrado
- 83. Sensor de temperatura

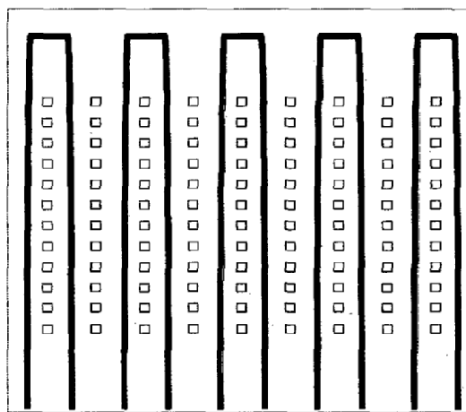
Figura 8



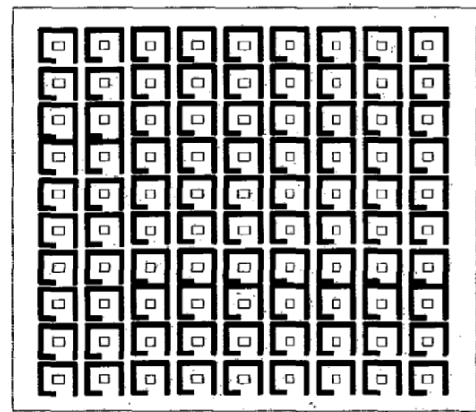
Serpentina



Serpentina múltiple



Ruta en U



Anillo

Figura 9

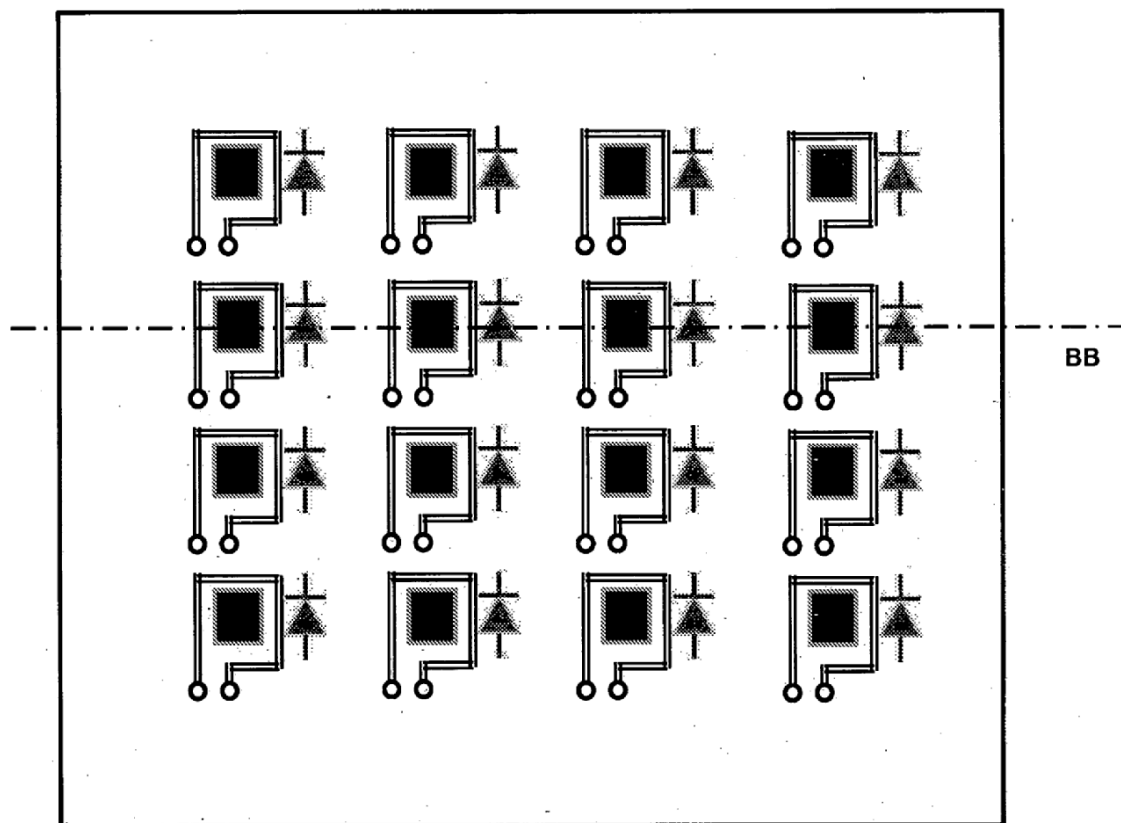
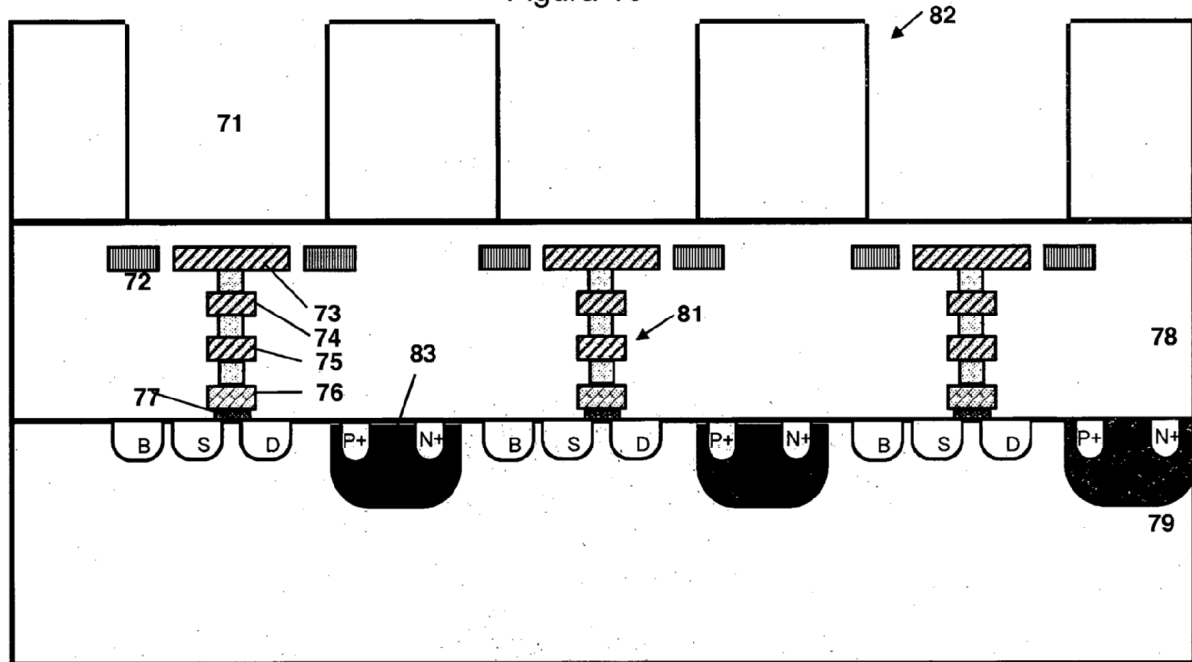


Figura 10



- 71. Pocillo/cámara
- 72. Calentador resistivo metálico superior
- 73. Ventana de detección del ISFET
- 74. 2ª capa metálica
- 75. 3ª capa metálica
- 76. Poliventana
- 77. Ventana de óxido
- 78. Dieléctricos
- 79. Sustrato P.

- 81. Sensor de ISFET
- 82. Chip de secuenciación integrado
- 83. Sensor de temperatura

Figura 11

