

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 982**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 35/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014 E 14194399 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2857524**

54 Título: **Dispositivo para la detección de nucleótidos individuales**

30 Prioridad:

**09.04.2013 GB 201306444**

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

**30.06.2017**

73 Titular/es:

**BASE4 INNOVATION LIMITED (50.0%)  
Broers Building JJ Thomson Avenue  
Cambridge CB3 0FA, GB y  
MEDICAL RESEARCH COUNCIL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRAYLING, CAMERON ALEXANDER;  
BALMFORTH, BARNABY;  
SOARES, BRUNO FLAVIO NOGUEIRA DE  
SOUSA;  
ISAAC, THOMAS HENRY;  
BREINER, BORIS;  
NATALE, ALESSANDRA;  
AMASIO, MICHELE y  
DEAR, PAUL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 620 982 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

Dispositivo para la detección de nucleótidos individuales

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para la secuenciación de ácidos nucleicos microfluido, como se define en las reivindicaciones 1-6 adjuntas, y a su uso para secuenciar ADN o ARN. Adicionalmente, en el presente documento se divulga un método para la caracterización de polinucleótidos tales como los obtenidos de ARN o ADN de origen natural, mediante la captura y detección de una secuencia ordenada de bases nucleotídicas individuales generadas a partir de ellos por pirofosforólisis progresiva.

10 La secuenciación de última generación de material genético está produciendo ya un impacto significativo en las ciencias biológicas en general y la medicina en particular, dado que el coste unitario de la secuenciación disminuye en consonancia con la llegada al mercado de máquinas de secuenciación cada vez más rápidas. Por lo tanto, en una máquina de este tipo, un analito de ADN bicatenario se descompone en primer lugar en una pluralidad de fragmentos polinucleotídicos más pequeños, cada uno de los cuales se adenila en primer lugar en ambos extremos de una cadena, de tal modo que puede unirse un primer oligonucleótido monocatenario a ambos extremos de su complemento por hibridación a la base adenina no apareada. Los fragmentos tratados así obtenidos se seleccionan después por tamaños y se capturan sobre una superficie recubierta con los segundos oligonucleótidos monocatenarios unidos que son por sí mismos el complemento de secuencia del primero, de tal modo que puede crearse de hecho una biblioteca de fragmentos bicatenarios unidos a la superficie mediante una hibridación adicional. En una etapa de agrupación posterior, estos componentes de la biblioteca se amplifican luego millones de veces en la superficie de forma clonal, utilizando reacciones de extensión y de formación isotérmica de puentes para utilizar segundos oligonucleótidos no usados. Esto crea, en efecto, una concentración densa del fragmento polinucleotídico unido a la superficie a través de una de sus cadenas. La cadena complementaria no unida de cada fragmento se retira luego para dejar fragmentos monocatenarios unidos listos para secuenciación. En la fase de secuenciación, cada uno de estos fragmentos monocatenarios se ceba y se crea su cadena complementaria por extensión utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y una mezcla de las 4 bases nucleotídicas características del ADN en forma de didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP). Cada tipo de ddNTP está bloqueado en el extremo con un grupo funcional que está marcado con un fluoróforo distinto que emite fluorescencia a una longitud de onda distinta. La reacción de extensión toma luego la forma de un ciclo de tres etapas; en primer lugar, el ddNTP relevante se incorpora a la cadena en crecimiento; en segundo lugar, la base nucleotídica que contiene se identifica por iluminación de la muestra y detección de la longitud de onda de la fluorescencia, y finalmente el bloque final y su fluoróforo asociado se eliminan para permitir que tenga lugar el suceso de extensión siguiente. Por este medio, la secuencia de la cadena complementaria puede construirse base por base. Se apreciará que, si bien esta estrategia puede en gran parte automatizarse y puede generar lecturas de secuencia de alta exactitud, su velocidad de operación está limitada por la velocidad del ciclo de extensión. Por lo tanto, en la práctica, el uso de la tecnología tiende a implicar el procesamiento paralelo de fragmentos polinucleotídicos relativamente cortos y el ensamblaje de la secuencia entera a partir de las diversas lecturas obtenidas de ello. Esto puede conducir en sí mismo a complejidades computacionales y a la posible introducción de errores.

40 Más recientemente, se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos de secuenciación directa. Por ejemplo, el documento WO 2009/030953 divulga un nuevo secuenciador rápido en el cual, entre otros, la secuencia de bases o pares de bases nucleotídicas en una muestra de polinucleótido mono- o bicatenario (por ejemplo ARN o ADN de origen natural) se lee por translocación de la misma a través de un sustrato nano-perforado provisto de nanoestructuras plasmónicas yuxtapuestas dentro de, o adyacentes a, la salida de los nanoporos. En este dispositivo, las nanoestructuras plasmónicas definen ventanas de detección (esencialmente un campo electromagnético) dentro de las cuales cada base nucleotídica (opcionalmente marcada) se induce a su vez a emitir fluorescencia o dispersar fotones de Raman de manera característica mediante la interacción con la luz incidente. Los fotones así generados se detectan luego de forma remota, se combinan y se convierten en una corriente de datos cuyo contenido de información es característico de la secuencia de bases nucleotídicas asociada con el polinucleótido. Esta secuencia puede recuperarse luego de la corriente de datos utilizando algoritmos de computación contenidos en el programa informático correspondiente programado en un microprocesador integral con el mismo o en un dispositivo auxiliar de computación unido al mismo. Pueden encontrarse antecedentes adicionales acerca del uso de nanoestructuras plasmónicas y sus características de resonancia asociadas, por ejemplo, en Adv. Mat. 2004, 16(19), pág. 1685-1706.

60 Otro aparato para la secuenciación rápida de polinucleótidos se describe, por ejemplo, en los documentos US 6627067, US 6267872 y US 6746594. En su forma más simple, este dispositivo emplea electrodos, en lugar de nanoestructuras plasmónicas, para definir la ventana de detección a través del sustrato o en, o alrededor, de la salida del nanoporo. Se aplica luego una diferencia de potencial a través de los electrodos y se miden en función del tiempo los cambios en las características eléctricas del medio iónico que fluye entre ellos, como consecuencia de la translocación electroforética del polinucleótido y el electrólito asociado a través del nanoporo. En este dispositivo, a medida que las diversas bases nucleotídicas individuales pasan a través de la ventana de detección, la bloquean y desbloquean, lo que provoca 'sucesos' que dan lugar a fluctuaciones características en el flujo de corriente o la resistividad. Estas fluctuaciones se utilizan luego para generar una corriente de datos adecuada para el análisis como se describe arriba.

- La generación de corrientes estables de gotitas, en especial corrientes de microgotitas, es otra área de la tecnología en desarrollo que tiene ya aplicaciones en biología molecular. Por ejemplo, el documento US7708949 divulga un método microfluído nuevo para generar gotitas de agua en aceite estables aunque, por ejemplo, el documento US2011/0250597 describe la utilización de esta tecnología para generar microgotitas que contienen un molde de ácido nucleico (típicamente un fragmento polinucleotídico de ADN o ARN) y una pluralidad de pares de cebadores que hacen posible la amplificación del molde utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Otras solicitudes de patente referentes al campo incluyen, en general, los documentos JP2004/290977, JP2004/351417, US2012/0122714, US2011/0000560, US2010/01376163, US2010/0022414 y US2008/0003142.
- El documento WO 2004/002627 divulga un método para la creación de dispersiones líquido-líquido y gas-líquido utilizando diversos dispositivos que comprenden la creación de una sección discontinua entre regiones microfluidas aguas arriba y aguas abajo. No obstante, no se enseña su aplicación a la secuenciación de ADN de nucleótido individual.
- El documento WO 2010/077859 enseña un accionador de gotitas que comprende un sustrato provisto de electrodos, una ruta de reactor y una base nucleotídica, tampón de lavado, y depósitos de muestra y enzima. Si bien se dice en general que el accionador es útil para la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, no hay enseñanza acerca del método de degradación del analito que describen los inventores más adelante. En lugar de ello, se refiere a una estrategia completamente distinta, que observa la síntesis de una cadena complementaria del analito utilizando pirosecuenciación. El documento US 2009/0280475 se refiere a una materia objeto similar.
- Las sondas biológicas, que comprenden típicamente oligonucleótidos monocatenarios de una secuencia conocida de un orden menor que 1000 nucleótidos de longitud, se utilizan ampliamente en la biología molecular analítica. Tales sondas trabajan típicamente uniéndose ellas mismas a la diana (por ejemplo una obtenida del ADN de un patógeno de origen natural) cuando existe complementariedad de secuencia suficiente entre las bases nucleotídicas de la sonda y la diana. Típicamente, los nucleótidos de tales sondas están marcados con elementos detectables tales como marcadores radiactivos o fluorescentes, de tal manera que cuando se utiliza la sonda para tratar una solución de analito o sustrato en o sobre cual se cree que se ha capturado la diana, la presencia o ausencia de la diana se revela buscando y detectando la propiedad de detección característica del elemento de detección.
- Una clase de tales sondas está representada por materiales conocidos en la técnica como 'balizas moleculares', como se describe por ejemplo en el documento US 8211644. Estas sondas están compuestas de oligonucleótidos monocatenarios que de hecho se han replegado sobre sí mismos para crear un bucle monocatenario residual que actúa como el sensor de la sonda y un tallo corto en donde los nucleótidos adyacentes a los dos extremos están unidos entre sí por apareamiento de bases nucleotídicas complementarias; creando de este modo una región bicatenaria. Esta disposición, que puede compararse a una horquilla en la cual el bucle monocatenario está unido a cadenas complementarias del mismo extremo de un oligonucleótido bicatenario hipotético, está fuertemente tensionada. En los extremos libres 3' y 5' del oligonucleótido (ahora adyacentes entre sí y en el extremo lejano del tallo) están unidos respectivamente un fluoróforo y un extintor. Su proximidad geométrica uno al otro asegura entonces que no se produce fluorescencia significativa. Durante el uso, la diana se enlaza al bucle monocatenario provocando una tensión adicional, de tal modo que cuando la sonda se calienta, el tallo se descomprime, provocando un distanciamiento del fluoróforo y el extintor, y permitiendo que el último emita fluorescencia.
- Los inventores han desarrollado ahora un nuevo método de secuenciación que, en una realización, implica la generación de una corriente de bases nucleotídicas cuyo orden es característico de la secuencia en el analito, por degradación progresiva del analito, y una captura posterior de cada base nucleotídica de una manera que hace posible detectarla.
- El documento WO 94/18218 divulga un secuenciador de genoma en el cual una corriente ordenada de nucleótidos individuales se separa de un analito y después de ello queda contenida en una matriz sólida potenciadora de la fluorescencia en donde cada nucleótido se excita utilizando un láser y se detecta su emisión espectroscópica característica. El método de transferencia de nucleótidos individuales utilizado por este secuenciador implica la creación de una sola envoltura doble de líquidos inmiscibles que fluyen en lugar de una serie de gotitas. Adicionalmente, el secuenciador descrito pretende detectar los nucleótidos individuales de forma directa en lugar de emplear un sistema de captura y un método de liberación de fluoróforos del tipo que describen los inventores. Los inventores creen que esto es un inconveniente dado que conducirá a problemas de la proporción de la señal con respecto al ruido cuando llegue a detectarse la emisión. Esto afectará la sensibilidad global y, por lo tanto, la aplicabilidad práctica del secuenciador propiamente dicho.
- Stephan *et al.*, Journal of Biotechnology 86 (2001) pág. 255-267, enseñan un método general para recuento de nucleótidos individuales generados por degradación exonucleolítica de una muestra de ADN inmovilizada marcada con fluoróforos. Sin embargo, no se proporciona información acerca de la diferenciación entre los distintos tipos de nucleótidos individuales generados.
- El uso de la degradación exonucleolítica progresiva de polinucleótidos para generar una corriente de bases nucleotídicas individuales se ha divulgado en forma esquemática en <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/happy/Happy->

[Group/seg.html](#), aunque se proporciona poca información acerca de la metodología real empleada. Adicionalmente, el documento WO 03/080861 describe un método de secuenciación en el cual un analito de ADN se degrada de forma secuencial en una corriente ordenada de nucleótidos individuales por medio de pirofosforólisis llevada a cabo en presencia de un anión pirofosfato marcado con un colorante inteligente. En un ejemplo, el anión pirofosfato está marcado con el colorante JF-4 que tiene tiempos de vida de fluorescencia distintos dependiendo del tipo de nucleótido particular al que se ligue. Luego, la corriente de nucleótidos individuales marcados se excita mediante un láser y se analiza espectroscópicamente para determinar la naturaleza y por lo tanto el orden de los nucleótidos. Una vez más los nucleótidos individuales se detectan de forma directa en lugar de por el empleo del sistema de captura y el método de liberación de fluoróforos descrito más adelante. Por lo tanto, se cree que este método conducirá también a problemas de la proporción de la señal con respecto al ruido y, por lo tanto, de sensibilidad.

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona por lo tanto un método para la determinación de la secuencia de bases nucleotídicas en un analito de polinucleótidos caracterizado por las etapas de (1) generación de una corriente de bases nucleotídicas individuales a partir del analito mediante pirofosforólisis; (2) producción de moléculas capturadas haciendo reaccionar cada base nucleotídica individual con un sistema de captura marcado con elementos detectables en un estado indetectable; (3) liberación de los elementos detectables de cada molécula capturada en un estado detectable y (4) detección de los elementos detectables así liberados y determinación de la secuencia de bases nucleotídicas de los mismos.

La etapa (1) del método de la presente divulgación comprende generar una corriente de bases nucleotídicas individuales a partir del analito polinucleotídico por pirofosforólisis. El analito empleado en esta etapa es, convenientemente, un polinucleótido bicatenario compuesto por muchas bases nucleotídicas. En principio, la longitud del polinucleótido puede ser ilimitada, con inclusión de hasta los muchos millones de bases nucleotídicas encontrados en un fragmento del genoma humano. El propio analito es convenientemente ARN o ADN de origen natural, aunque el método puede utilizarse también para secuenciar ADN o ARN producidos por síntesis u otros ácidos nucleicos compuestos, totalmente o en parte, de bases nucleotídicas que no se encuentran comúnmente en la naturaleza; es decir, bases nucleotídicas distintas de adenina, timina, guanina, citosina y uracilo. Los ejemplos de éstas incluyen 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 2-O-metilcitidina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilamino-metiluridina, dihidrouridina, 2-O-metilpseudouridina, 2-O-metilguanosina, inosina, N6-isopentiladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metoxiuridina, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina, 5-metoxicarbonilmetiluridina, 2-metil-6-N-isopenteniladenosina, éster metílico del ácido uridina-5-oxiacético, ácido uridina-5-oxiacético, wybutoxosina, wybutosina, pseudouridina, queuosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, 2-O-metil-5-metiluridina and 2-O-metiluridina.

En una realización, la etapa (1) comprende una primera sub-etapa de unión del analito polinucleotídico a un sustrato. Típicamente, el sustrato comprende una superficie microfluida, una microperla o una membrana permeable compuesta de vidrio o un polímero no degradable. Preferentemente, el sustrato comprende adicionalmente una superficie adaptada para recibir el analito. Existen muchas maneras en las cuales el analito puede unirse a tales superficies, la totalidad de las cuales pueden en principio utilizarse. Por ejemplo, un método implica el tratamiento previo de una superficie de vidrio con un silano funcionalizado tal como un epoxisilano, un aminohidrocarbilsilano o un mercaptosilano. Los sitios reactivos así generados pueden tratarse luego con un derivado de analito que tiene un grupo amina, succinilo o tiol terminal.

Es una característica preferente de la etapa (1) que el analito se someta a pirofosforólisis para generar una corriente de bases nucleotídicas individuales cuyo orden corresponde al del analito. Esta etapa se lleva a cabo preferentemente a una temperatura en el intervalo de 20 a 90 °C en presencia de un medio de reacción que comprende una enzima. Preferentemente, se lleva a cabo en condiciones de flujo de no equilibrio de forma que las bases nucleotídicas individuales se retiren de forma continua de la zona de reacción. Muy preferentemente, la reacción se lleva a cabo provocando que un medio acuoso tamponado que contiene la enzima y los otros aditivos típicos fluya de forma continua sobre la superficie a la que el analito está enlazado.

En una realización preferente, la enzima utilizada es una que puede provocar la degradación pirofosforolítica 3'-5' progresiva del analito para producir desoxirribonucleótidos trifosfato con alta fidelidad y a una velocidad de reacción razonable. Preferentemente, esta velocidad de degradación es lo más rápida posible y en una realización, se encuentra en el intervalo de 1 a 50, preferentemente 1 a 20 bases nucleotídicas por segundo. Puede encontrarse información adicional acerca de la reacción de pirofosforólisis, como se aplica a la degradación de polinucleótidos, por ejemplo en J. Biol. Chem. 244 (1969) pág. 3019-3028. La enzima que se emplea preferentemente en esta reacción de pirofosforólisis se selecciona adecuadamente del grupo que consiste en las polimerasas que no exhiben esencialmente actividad exo- ni endonucleasa en las condiciones de reacción. Los ejemplos de polimerasas que pueden utilizarse ventajosamente incluyen, pero sin limitación, las enzimas procariotas pol 1 o derivados de enzimas obtenidos de bacterias tales como *Echerichia coli* (por ejemplo, fragmento Klenow de polimerasa), *Thermus aquaticus* (por ejemplo, Taq Pol) y *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldoverux* y *Bacillus caldotenax*. Convenientemente, la degradación pirofosforolítica se lleva a cabo en presencia de un medio que comprende adicionalmente el anión pirofosfato y cationes magnesio; preferentemente en concentraciones milimolares.

En la etapa (2) del método de la presente divulgación, cada base nucleotídica individual generada en la etapa (1) se captura mediante el propio sistema de captura que comprende un oligómero de bases nucleotídicas. Preferentemente, antes de llevar a cabo esta etapa, el medio acuoso que contiene las bases nucleotídicas individuales se trata con una pirofosfatasa para hidrolizar cualquier pirofosfato residual a anión fosfato. En una primera realización, el sistema de captura comprende uno de una clase de pares de oligonucleótidos primero y segundo. El primer oligonucleótido en tal par comprende preferentemente (a) una primera región bicatenaria y (b) una segunda región bicatenaria compuesta de  $n$  bases nucleotídicas en las cuales  $n$  es mayor que 1, preferentemente mayor que 5. En una sub-clase, puede considerarse que el primer oligonucleótido tiene una estructura molecular derivada de un precursor oligonucleotídico monocatenario hipotético o real, en donde la región bicatenaria se ha creado plegando de forma parcial el extremo 3' del precursor sobre sí mismo para generar una configuración que puede denominarse 'en forma de j'. En otra subclase, el primer oligonucleótido se genera hibridando un tercer oligonucleótido monocatenario más corto sobre el extremo 3' de un cuarto oligonucleótido monocatenario más largo y luego haciendo 'romo' el extremo de la molécula resultante, que es bicatenaria, por medio de un grupo protector que por ejemplo conecta los oligonucleótidos finales de las dos cadenas. Típicamente, la longitud total del primer oligonucleótido es de hasta 150 bases nucleotídicas, preferentemente entre 20 y 100 bases nucleotídicas. Al mismo tiempo, es preferente que el número entero  $n$  esté entre 5 y 40, preferentemente entre 10 y 30.

En lo que respecta al segundo oligonucleótido del par, este es monocatenario y tiene convenientemente una secuencia de bases nucleotídicas que es totalmente o en parte el complemento de la de la región monocatenaria del primer oligonucleótido que comienza una base nucleotídica más allá del extremo de la región bicatenaria. La longitud del segundo oligonucleótido no es crítica y puede ser más larga o más corta que la región monocatenaria a la que puede enlazarse, aunque preferentemente no es de una longitud de  $n-1$  bases nucleotídicas. Más preferentemente, la longitud del segundo oligonucleótido se selecciona de forma que en la molécula capturada queda un saliente corto de bases nucleotídicas no apareadas (por ejemplo, 2 a 10 bases nucleotídicas) en una u otra de las dos cadenas de la misma. Preferentemente, en esta clase, los elementos detectables están emplazados en el segundo oligonucleótido. Los sistemas de captura de esta clase funcionan uniendo la base nucleotídica individual al extremo bicatenario del primer oligonucleótido e hibridación del segundo oligonucleótido a la región monocatenaria restante para generar una molécula capturada que es bicatenaria aparte de su saliente.

En una segunda realización, el sistema de captura comprende una clase de oligonucleótidos individuales que consisten cada uno en una región de nucleótidos monocatenaria cuyos extremos están unidos a dos regiones bicatenarias distintas. En los sistemas de captura de esta clase, la región nucleotídica monocatenaria está compuesta solo por una base nucleotídica, lo que hace a la sonda extremadamente selectiva para la detección de la diana, es decir la base nucleotídica individual complementaria en la corriente de gotitas.

Volviendo a la región o las regiones oligonucleotídicas bicatenarias, es preferente que las mismas se obtengan o puedan obtenerse de dos precursores oligonucleotídicos, cada uno preferentemente en forma de bucle cerrado, o de un precursor oligonucleotídico monocatenario común por plegado de los extremos del último sobre sí mismos, para crear dos regiones de base oligonucleotídicas en forma de bucle cerrado con un hueco intermedio que constituye la región nucleotídica monocatenaria. En todos los casos, el efecto es el mismo; adyacente a los extremos de la región nucleotídica monocatenaria habrá extremos 3' y 5' libres en la otra cadena de la región oligonucleotídica a los cuales pueden unirse los extremos 5' y 3' correspondientes de la diana. Por lo tanto, el uso del sistema de captura implica un proceso de unión de la región nucleotídica monocatenaria a la base nucleotídica individual diana por unión de los extremos 3' y 5' disponibles del sistema de captura para generar una molécula capturada que es bicatenaria en toda su longitud.

De forma conveniente, la región o regiones oligonucleotídicas bicatenarias son de hasta 50 pares de bases nucleotídicas de longitud, preferentemente hasta 45 pares de bases nucleotídicas, más preferentemente en el intervalo de 5 a 40 pares de bases nucleotídicas y muy preferentemente en el intervalo de 10 a 30. Pueden utilizarse regiones más largas, pero el riesgo potencial de que el acceso a la región nucleotídica monocatenaria por parte de la diana pueda hacerse restringido por enmarañamiento. Ello hace a esta realización potencialmente menos atractiva.

En esta clase, es preferente que los elementos detectables unidos a la región o regiones oligonucleotídicas bicatenarias estén emplazados lejos de la región nucleotídica monocatenaria. Para finalizar, en una realización, es preferente que al menos una de las regiones oligonucleotídicas bicatenarias comprenda al menos un sitio de reconocimiento para enzima de restricción, preferentemente adyacente a la región en donde los elementos detectables están emplazados o agrupados. Para estos sistemas de captura, la liberación de los fluoróforos ocurre en primer lugar por una enzima de restricción que presenta comportamiento endonucleolítico y que realiza un corte bicatenario en la molécula capturada en el sitio mencionado anteriormente. Después, pueden degradarse adicionalmente los fragmentos cortos así creados mediante una exonucleasa en nucleótidos individuales, al menos algunos de los cuales estarán marcados con fluoróforos. Por lo tanto, cuando la molécula capturada comprende múltiples fluoróforos, esto conduce a la liberación de una cascada de fluoróforos que, en virtud de estar ahora separados unos de otros y/o de sus extintores asociados, son ahora libres para emitir fluorescencia de manera normal. Tal sitio de reconocimiento para enzimas de restricción comprenderá típicamente una secuencia específica de 2 a 8 pares de nucleótidos. En otra realización preferente, el sitio de reconocimiento para enzima de restricción

será uno creado por enlace del nucleótido individual a la región de nucleótidos monocatenarios.

Para las dos clases arriba mencionadas, es preferente emplear una mezcla de al menos dos conjuntos distintos de moléculas de captura, cada uno selectivo para una base nucleotídica complementaria distinta y cada uno empleando un elemento detectable distinto. Éstos pueden ser de la misma o distintas clases. En una realización preferente, cada conjunto de moléculas de captura tendrá elementos detectables asociados distintos de forma que, cuando la propiedad de detección correspondiente eventualmente se detecta, la base nucleotídica puede identificarse de forma unívoca. Por ejemplo, cuando el analito es ADN o ARN, es muy preferente emplear cuatro sistemas de captura distintos, siendo cada uno selectivo para una base nucleotídica distinta característica de estas moléculas.

Es una característica adicional de todos los sistemas de captura utilizados en los dispositivos de la presente invención, que están marcados con múltiples elementos detectables que son sustancialmente indetectables cuando el sistema de captura se encuentra en un estado sin utilizar. Convenientemente, estos elementos detectables son unos que están adaptados para ser detectados por un suceso óptico. En una realización preferente, los elementos detectables comprenden fluoróforos, y cada sistema de captura sin utilizar es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda a las cuales los fluoróforos están diseñados para ser detectados. Por lo tanto, aunque un fluoróforo puede presentar fluorescencia de fondo de nivel bajo general a través de una parte amplia del espectro electromagnético, existirá típicamente una o un pequeño número de longitudes de onda o envolventes de longitudes de onda específicas, en donde la intensidad de la fluorescencia alcance un máximo. Es en uno o más de estos máximos, en donde el fluoróforo se detecta de forma característica, que no debería esencialmente producirse fluorescencia. En el contexto de la presente patente, por la expresión 'esencialmente no fluorescente' o expresión equivalente, se entiende que la intensidad de fluorescencia del número total de fluoróforos unidos al segundo oligonucleótido en la longitud de onda o envolvente de longitud de onda relevante característica es menor que el 25 %; preferentemente menor que el 10 %, más preferentemente menor que el 1 % y muy preferentemente menor que el 0,1 % de la intensidad de fluorescencia correspondiente de un número equivalente de fluoróforos libres.

En principio, puede utilizarse cualquier método para asegurar que en el estado sin utilizar del sistema de captura, los fluoróforos son esencialmente no fluorescentes. Una estrategia es unir adicionalmente extintores en proximidad estrecha a ellos. Otra está basada en la observación de que cuando están unidos múltiples fluoróforos al sistema de captura en proximidad estrecha entre sí, tienden a desactivarse entre sí suficientemente bien como para que el criterio descrito en el párrafo anterior pueda lograrse sin necesidad de extintores. En este contexto de la presente patente, lo que constituye 'proximidad estrecha' entre fluoróforos o entre fluoróforos y extintores, dependerá de los fluoróforos y extintores particulares utilizados, y posiblemente de las características estructurales del oligonucleótido individual. Como consecuencia, se pretende que este término se interprete con referencia al resultado requerido en lugar de a cualquier disposición estructural particular en los diversos elementos del sistema de captura. Sin embargo, y para los fines de proporcionar ejemplo únicamente, se señala que cuando los fluoróforos adyacentes o fluoróforos y extintores adyacentes están separados por una distancia correspondiente a la distancia Förster característica (típicamente menor que 5 nm), se logrará en general una desactivación suficiente.

Convenientemente, el sistema de captura está marcado con hasta 20, por ejemplo hasta 10 y muy preferentemente hasta 5 fluoróforos. Para obtener la máxima ventaja, es preferente que el sistema de captura esté marcado con al menos 2, preferentemente al menos 3 fluoróforos. Por consiguiente, los intervalos construidos a partir de cualquier permutación de estos máximos y mínimos están contemplados específicamente en el presente documento. Si se emplean extintores, es preferente asimismo que el sistema de captura esté marcado con hasta 20, preferentemente hasta 10 y muy preferentemente hasta 5 de los mismos. Si bien se prevé que más de un tipo de fluoróforo puede estar unido al sistema de captura, para proporcionarle, por ejemplo, una huella genética característica, es preferente que todos los fluoróforos empleados en cada tipo de sistema de captura sean los mismos.

En lo que respecta a los fluoróforos propiamente dichos, pueden seleccionarse en principio de cualquiera de los utilizados de forma convencional en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, grupos funcionales xanteno, por ejemplo fluoresceína, rodamina y sus derivados tales como isotiocianato de fluoresceína, rodamina B y similares; radicales cumarina (por ejemplo hidroxil-, metil- y aminocumarina) y grupos funcionales cianina tales como Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7. Los ejemplos específicos incluyen fluoróforos derivados de los siguientes colorantes utilizados comúnmente: colorantes Alexa, colorantes cianina, colorantes Atto Tec y colorantes Rodamina. Los ejemplos incluyen también: Atto 633 (ATTO-TEC GmbH), Rojo Texas, Atto 740 (ATTO-TEC GmbH), Rosa de Bengala, Alexa Fluor™ 750 C<sub>5</sub>-maleimida (Invitrogen), Alexa Fluor™ 532 C<sub>2</sub>-maleimida (Invitrogen) y Rojo Rodamina C<sub>2</sub>-maleimida y Verde Rodamina, así como colorantes de fosforamido tales como Quasar 570. Como alternativa, puede emplearse un punto cuántico o colorante cercano al infrarrojo tal como los suministrados por LI-COR Biosciences. El fluoróforo está unido típicamente al segundo oligonucleótido a través de una base nucleotídica utilizando métodos químicos conocidos en la técnica.

Los extintores adecuados son aquéllos que funcionan por un mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, siglas del inglés *Förster resonance energy transfer*). Los ejemplos de extintores disponibles de forma comercial que pueden utilizarse en asociación con los fluoróforos arriba mencionados incluyen, pero sin limitación, DDQ-1, Dabcyl, Eclipse, Iowa Black FQ y RQ, Colorante IR-QC1, BHQ-0, BHQ-1, -2 y -3 y QSY-7 y -21.

La etapa (2) se efectúa convenientemente poniendo en contacto cada base nucleotídica individual en la corriente con el sistema de captura, muy preferentemente el sistema de captura multi-componente arriba mencionado, a una temperatura en el intervalo de 30 a 80 °C en presencia de un sistema enzimático de dos componentes que comprende una segunda polimerasa y una ligasa. En una realización preferente, la segunda polimerasa es la misma que la utilizada en la etapa (1) evitando de este modo la necesidad de añadir esta en la forma de un componente adicional.

En la etapa (3) del método de la presente divulgación, los elementos detectables se liberan de la molécula capturada en una forma detectable por la acción de una exonucleasa o de la actividad de exonucleasa de una polimerasa. Al hacer esto, es importante que los fluoróforos presentes en cualquiera de los conjuntos sin utilizar de moléculas de captura no se liberen al mismo tiempo. En el caso de la primera clase de sistema de captura, esto puede lograrse, por ejemplo, utilizando una polimerasa que tenga actividad de exonucleasa 3'-5' para degradar la molécula capturada en virtud de su región monocatenaria protuberante. Como alternativa, y en especial en el caso de la segunda clase de sistemas de captura, esto puede lograrse incorporando en el sistema de captura o en la molécula capturada al menos un sitio de reconocimiento para enzima de restricción, preferentemente adyacente a la región en donde están emplazados o agrupados los elementos detectables. Tal sitio de reconocimiento para enzima de restricción comprenderá típicamente una secuencia específica de 2 a 8 pares de nucleótidos. En una realización preferente de esta estrategia, el sitio de reconocimiento para enzima de restricción puede ser uno creado mediante el enlace de la base nucleotídica individual al sistema de captura.

La etapa (3) también se lleva a cabo convenientemente a una temperatura en el intervalo de 30 a 80 °C. Los ejemplos adecuados de exonucleasas o polimerasas que pueden utilizarse en esta etapa incluyen Phusion, Phusion HS, ADNasa I (sin ARNasa), Exonucleasa I o III (de *E. Coli*), Exonucleasa T, Exonucleasa V (RecBCD), Exonucleasa Lambda, Nucleasa Microcócica, Nucleasa de Haba Mung, Nucleasa BAL-31, RecJ<sub>f</sub>, Exonucleasa T5 y Exonucleasa T7. El efecto neto de la etapa (3) es que las bases nucleotídicas constituyentes de la molécula capturada se liberarán, algunas de las cuales estarán marcadas con el elemento detectable característico. Por lo tanto, cuando la molécula capturada comprende múltiples fluoróforos extintos, esto conduce a una 'cascada' de fluoróforos liberados que, en virtud de quedar separados unos de otros y/o de sus extintores asociados, están ahora libres para emitir fluorescencia de la manera normal.

Después de ello, y en la etapa (4), se detectan los elementos detectables liberados de la molécula capturada degradada, se identifica la base nucleotídica individual particular y se recupera la secuencia de bases nucleotídicas en el análisis de la corriente de datos asociada con la detección. Los métodos para hacer esto son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, la fluorescencia puede detectarse utilizando un fotodetector o un dispositivo equivalente ajustado a la o las longitudes de onda de fluorescencia características o a la o las envolventes de longitud de onda de los diversos fluoróforos. Esto, a su vez, provoca que el fotodetector genere una señal eléctrica característica de un tipo de base nucleotídica particular, que puede procesarse y analizarse posteriormente.

En una realización particularmente preferente, el método de la presente divulgación se lleva a cabo totalmente o en parte en microgotitas. Tal método puede comenzar, por ejemplo, mediante la inserción de las bases nucleotídicas individuales generadas en la etapa (1), una por una, en una corriente correspondiente de microgotitas acuosas en un disolvente transportador inmiscible, tal como un hidrocarburo o aceite de silicona, para ayudar a preservar el orden. Ventajosamente, esto puede efectuarse por la creación directa de la microgotita aguas abajo de la zona de reacción de pirofosforólisis; por ejemplo, provocando que el medio de reacción emerja de un cabezal de microgotitas de dimensiones adecuadas en una corriente que fluye del disolvente. Como alternativa, pueden inyectarse de forma secuencial pequeñas alícuotas del medio de reacción en una corriente de microgotitas acuosas preexistentes suspendidas en el disolvente. Si se adopta esta última estrategia, cada microgotita puede contener adecuadamente los diversos componentes del sistema de captura y las enzimas, y cualquier otro reactivo (por ejemplo, un tampón) necesario para efectuar las etapas (2) y (3). Para finalizar, puede hacerse que las microgotitas creadas en la anterior realización se fusionen posteriormente con una corriente de tales microgotitas preexistentes, para lograr un resultado similar. En esta realización, la etapa (4) implica entonces investigar preferentemente a su vez cada gotita para identificar los elementos detectables liberados y, por consiguiente, la naturaleza de la base nucleotídica que contiene.

A fin de evitar el riesgo de que una microgotita dada contenga más de una sola base nucleotídica, es preferente liberar las bases nucleotídicas individuales en la etapa (1) a una velocidad tal que cada microgotita llena esté separada por de 1 a 20, preferentemente 2 a 10 vacías. Después de ello, la corriente de microgotitas llenas y vacías en el disolvente se hace fluir a lo largo de una trayectoria de flujo, convenientemente una trayectoria de flujo microfluida, a una velocidad y de una manera tal que las microgotitas se mantienen en un estado discreto y no tienen oportunidad de fusionarse unas con otras. Convenientemente, las microgotitas empleadas tienen un diámetro menor que 100 micrómetros, preferentemente menor que 50 micrómetros, más preferentemente menor que 20 micrómetros y aún más preferentemente menor que 15 micrómetros. Muy preferentemente, todos sus diámetros están en el intervalo de 2 a 20 micrómetros. En una realización, la velocidad de flujo de las microgotitas a través de todo el sistema está en el intervalo de 50 a 3000 gotitas por segundo, preferentemente 100 a 2000.

El método arriba descrito puede utilizarse con ventaja en un dispositivo de secuenciación y se prevé que tales dispositivos estén dentro del ámbito de la invención.

La presente invención se ilustrará a continuación con referencia a los ejemplos que siguen.

Preparación y uso de un sistema de captura

El siguiente experimento ilustra la captura de una base nucleotídica individual y la liberación de fluoróforos utilizando un sistema de captura en el que el primer oligonucleótido tiene forma de j y el segundo es monocatenario.

Se prepara una muestra de un oligonucleótido en forma de j como se describe anteriormente mediante plegado de un oligonucleótido monocatenario de 75 bases nucleotídicas, que tiene la siguiente secuencia:

```
gtaggtcctggcacagaaaaaggagGcagtgatgttccatgact
gatttttttcagtcagtcgaacatcact*g
```

en la que g, t, c y a representan la notación convencional para las bases nucleotídicas del ADN y \* representa la presencia de un enlace fosforotioato. El plegamiento se lleva a cabo calentando a 95 °C una solución acuosa de este oligonucleótido y después enfriándola de nuevo, de forma lenta, a temperatura ambiente a una velocidad de 10 minutos por °C. La molécula en forma de j así obtenida comprende una región de oligonucleótido monocatenario residual (gtaggtcctggcacagaaaaaggag) unida a una base nucleotídica individual que es el sitio de captura (con letra mayúscula en la secuencia mencionada anteriormente).

Se prepara también un oligonucleótido monocatenario correspondiente, que tiene la siguiente secuencia:

```
^ctccTTXTTtctgtgccaga
```

en la que ^ representa un grupo 5' fosfato, una T mayúscula representa una base timina marcada con colorante Alexa Fluor 488 a través de un enlazador azida y una X representa una base timina marcada con un extintor BHQ-0.

Después se preparan mezclas separadas de captura y de bases nucleotídicas. La mezcla de captura tiene una composición que corresponde a la obtenida de la siguiente formulación:

```
Tampón II 10x 2,5 ul
tampón de Ligasa Taq 10x (NEB) 5 ul
moléculas en forma de j mencionadas anteriormente 100 nM 2,5 ul
oligonucleótido monocatenario mencionado anteriormente 100 nM 5 ul
Pirofosfatasa Inorgánica Termoestable (NEB) 2 ul
Ligasa Taq (NEB) 5 ul
MnSO4 25 mM 1 ul
agua hasta 25 ul
```

aunque la mezcla de bases nucleotídicas, cuya composición está diseñada para imitar el material, obtenida de la etapa de pirofosforólisis, corresponde a la obtenida de la formulación: Tampón II 10 2,5 ul (suministrado con Amplitaq; sin magnesio)

```
MgCl2 25 mM 1,5 µl
desoxicitidina trifosfato (dCTP) 10 nM 2,5 ul
Amplitaq (5 U/ul) 2 ul
pirofosfato de sodio 10 mM 2,5 ul
agua hasta 25 ul.
```

Después se efectúa la captura del dCTP mezclando volúmenes iguales de estas dos mezclas e incubando el producto resultante a 50 °C. Típicamente esto se completa en 30 minutos. Al finalizar este tiempo, se trata una muestra de la mezcla (50 ul) con 1 ul de ADN polimerasa HotStart Phusion (NEB) y se activa a 98 °C x 20 s de forma que pueda producirse la degradación exonucleolítica de las moléculas de captura completadas. Típicamente, la degradación se realiza al cabo de 30 minutos y los fluoróforos liberados pueden detectarse por la iluminación de la muestra a o cerca de la longitud de onda de absorción máxima (496 nm), y la detección de la fluorescencia resultante a la longitud de onda de emisión característica (519 nm).

La Figura 2 muestra el resultado de esta reacción a lo largo del tiempo utilizando nucleótidos radiomarcados y electroforesis en gel. La captura de los nucleótidos radiomarcados en los oligonucleótidos en forma de j se produce dentro de los primeros 2 minutos de la reacción, produciéndose el ligamiento del oligonucleótido monocatenario a lo largo de los primeros 30 minutos. En este experimento, la polimerasa Phusion se añade en el tiempo t = 30 minutos, y puede verse que las moléculas de captura completadas se digieren rápidamente (en este caso la digestión se produce dentro de los 30 segundos de la adición de la polimerasa).



La Figura 3 muestra la fluorescencia medida en función del tiempo para la reacción completa realizada en presencia (línea de puntos) o ausencia (línea continua) de nucleótidos. En este experimento, la polimerasa se activa por calor en el tiempo  $t = 20$  minutos. Se observa un aumento significativo de fluorescencia para la reacción realizada en presencia de nucleótidos, en tanto que en su ausencia se observa poco o ningún aumento de fluorescencia.

Método microfluído de gotitas que utiliza el sistema de captura

La Figura 1 ilustra un dispositivo de secuenciación microfluído en el cual una corriente de microgotitas, al menos algunas de las cuales contienen una base nucleotídica individual, se somete a la reacción con un sistema de captura de la primera clase arriba anteriormente.

Un medio acuoso 1 que comprende una corriente de desoxirribonucleótidos trifosfato discretos obtenidos por la pirofosforólisis progresiva de un analito polinucleotídico de 100 bases nucleotídicas obtenido de ADN humano se hace fluir a través de un tubo microfluído de 10 micrómetros de diámetro fabricado a partir de polímero PDMS. La propia reacción de pirofosforólisis se lleva a cabo pasando una corriente de un medio de reacción acuoso tamponado (pH 8) a 72 °C, que comprende *Taq Pol* y una concentración de 2 milimoles por litro de cada uno de pirofosfato de sodio y cloruro de magnesio, sobre una microperla de vidrio sobre la cual se ha unido previamente el analito por medio de un puente succinilo. El orden de las bases nucleotídicas individuales en la corriente 1, que se encuentra aguas abajo de la microperla, corresponde a la secuencia del analito. 1 emerge del cabezal de una gotita 2 en una primera cámara 3 en donde se pone en contacto con una o más corrientes de aceite de silicona ligero inmiscible 4. Las velocidades de estas corrientes se seleccionan a fin de evitar una mezcla turbulenta y para crear en 3 gotitas acuosas esféricas 5 suspendidas en el aceite, teniendo cada una un diámetro de aproximadamente ocho micrómetros. Típicamente, la velocidad de pirofosforólisis y/o la velocidad de flujo de 1 se ajustan de modo que entre las gotitas adyacentes llenas existan otras 10 vacías. Una corriente de 5 se transporta luego hacia adelante a lo largo de un segundo tubo microfluído del mismo diámetro a una velocidad de 1000 gotitas por segundo hasta una segunda cámara 6 en la cual una segunda corriente de gotitas acuosas esféricas de cinco micrómetros 7 se alimenta también por medio de un segundo cabezal de gotitas 8. Se hacen fusionar las gotitas 5 y 7 de manera secuencial para formar gotitas acuosas aumentadas 9 de aproximadamente nueve micrómetros de diámetro. Cada una de 7 contiene pirofosfatasa para destruir cualquier anión pirofosfato residual presente en cada una de 5.

Después, se transporta hacia adelante una corriente de 9 a la misma velocidad a través del tubo microfluído hacia dentro de una tercera cámara 10 en donde estas gotitas se ponen en contacto con una tercera corriente de gotitas esféricas acuosas de cinco micrómetros 11, alimentadas también a la misma a través de un cabezal de gotitas correspondiente 12. El tiempo requerido para que cada una de 9 se mueva entre las cámaras 6 y 10 es aprox. de 2 minutos.

Después, las gotitas 9 y 11 se fusionan en 10 para producir gotitas 13 (de aproximadamente diez micrómetros de diámetro). Cada una de 11 contiene una ligasa mesófila y un sistema de captura que comprende cuatro pares de primeros oligonucleótidos en forma de *j* y cuatro segundos oligonucleótidos monocatenarios correspondientes. En este ejemplo, cada primer oligonucleótido en forma de *j* tiene una longitud de 60 bases nucleotídicas y se prepara plegando un precursor oligonucleotídico monocatenario de 60 bases nucleotídicas alrededor de la base nucleotídica 45<sup>a</sup> desde el extremo 5', para generar un bucle monocatenario de 3 bases nucleotídicas, una región bicatenaria de 12 pares de bases nucleotídicas y una región monocatenaria de 33 bases nucleotídicas. Cada uno de estos cuatro primeros oligonucleótidos tiene una 33<sup>a</sup> base distinta (medida desde el extremo monocatenario) característica de los cuatro tipos de bases nucleotídicas característicos del ADN (es decir, A, T, G y C). Los cuatro segundos oligonucleótidos distintos tienen cada uno una longitud de 28 bases nucleotídicas y tienen secuencias que son complementarias a la parte de la región monocatenaria definida por las bases nucleotídicas 4<sup>a</sup> y 32<sup>a</sup> de su primer par de oligonucleótidos. Los cuatro tipos de segundos oligonucleótidos distintos están marcados respectivamente con los fluoróforos Quasar 570, fluoresceína, Rojo Texas y Cy-5 (cinco grupos funcionales fluoróforos por segundo oligonucleótido). En cada caso, la fluorescencia se extingue por la inclusión de un grupo funcional extintor en cada segundo oligonucleótido (BHQ-2 para Quasar 570 y Rojo Texas, BHQ-0 para fluoresceína y BHQ-3 para cianina-5).

A continuación, una corriente de 13 se transporta hacia adelante a la misma velocidad a través de la tubería microfluída hacia adentro de una cuarta cámara 14 en donde se la hace fusionar con una cuarta corriente de gotitas esféricas acuosas de cinco micrómetros 15, alimentada también a aquella a través de un cabezal de gotitas 16. El tiempo requerido para que cada una de 9 se mueva entre las dos cámaras es de 30 minutos, en cuyo transcurso la base nucleotídica individual es capturada por su par de sistema de captura y se forma la molécula capturada. Cada una de 15 contiene exonucleasa Phusion para degradar la molécula de captura y liberar los fluoróforos relevantes en forma detectable. Una corriente de las microgotitas fusionadas 17 se lleva luego hacia adelante a un recipiente 18 en el cual se rastrea su progreso hasta que alcanzan uno de una serie de sitios 19a en donde son retenidas 19b, hasta el momento en que se analizan.

Después de 2 horas, cada gotita retenida en la serie se ilumina por turnos y en el orden correcto con una o más fuentes de luz de alta intensidad, por ejemplo uno o más láseres que emiten luz coherente a las frecuencias relevantes de los fluoróforos, y la fluorescencia así generada se detecta mediante un fotodetector que funciona a las longitudes de onda características de los cuatro tipos de fluoróforo. A partir de la información recibida se identifica la

base nucleotídica individual en cada gotita y se desechan las respuestas nulas de las gotitas vacías. Después, los resultados se procesan mediante un ordenador programado para reproducir la secuencia de bases nucleotídicas original del analito. Si se desea, pueden realizarse múltiples ciclos de iluminación y detección a través de la serie de gotitas a diversos intervalos que pueden promediarse para mejorar la proporción de la señal con respecto al ruido y por lo tanto la fiabilidad de los resultados.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

10 <110> Base4 Innovation Limited Medical Research Council

<120> Método para la detección de nucleótidos individuales

<130> P57529EP1

15 <150> GB 1306444.9

<151> 09-04-2013

<160> 3

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 75

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Precursor oligonucleotídico en forma de j

30 <220>

<221> misc\_feature

<222> (74)..(75)

<223> Enlace fosforotioato

35 <400> 1

gtaggtcctg gcacagaaaa aaggaggcag tgatgtcca

tgactgatt tttttcagt 60

catggaacat cactg 75

<210> 2

<211> 26

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región oligonucleotídica monocatenaria residual del oligonucleótido en forma de j

45 <400> 2

gtaggtcctg gcacagaaaa aaggag 26

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Oligonucleótido monocatenario

<220>

<221> misc\_feature

<222> (5)..(6)

60 <223> Bases timina marcadas con Alexa Fluor 488 a través de enlazador de azida

<220>

# ES 2 620 982 T3

<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> Base timina marcadas con extintor BHQ-0

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (8)..(9)  
<223> Bases timina marcadas con Alexa Fluor 488 a través de enlazador de azida

10 <400> 3  
ctccttttt ctgtgccaga 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido caracterizado por que comprende:

- 5       • una primera zona que comprende un sitio de unión contenido en ella, al cual se une el ácido nucleico a secuenciar; una primera tubería microfluida para hacer que un primer medio de pirofosforólisis acuoso fluya sobre el sitio de unión, permitiendo de este modo que el ácido nucleico se pirofosforolice de forma progresiva en sus nucleótidos trifosfato constituyentes y una segunda tubería microfluida para eliminar un segundo medio acuoso que fluye, que contiene los nucleótidos trifosfato, de alrededor del sitio de unión;
  - 10       • un medio para crear microgotitas del segundo medio acuoso en un disolvente transportador inmiscible en agua, al menos algunas de las cuales contiene uno de dichos nucleótidos trifosfato, aguas abajo de la primera zona;
  - medios de contacto dispuestos para introducir de forma consecutiva en el segundo medio acuoso del cual se componen las microgotitas, una o más de una pirofosfatasa, una ligasa, una polimerasa, un sistema de captura marcado con fluoróforos en un estado no detectable selectivo para al menos uno de los nucleótidos trifosfato obtenidos del ácido nucleico y una exonucleasa o polimerasa que tiene actividad exonucleasa, para liberar los fluoróforos detectables de cualquier sistema de captura utilizado mediante exonucleolisis;
  - 15       • una serie de sitios de retención de microgotitas en los cuales cada microgotita se incubaba hasta que se produce fluorescencia detectable;
  - una tercera tubería microfluida para entregar de forma sucesiva cada microgotita a uno de los sitios de retención;
  - 20       • un sistema de detección de fluorescencia que comprende una fuente de luz adaptada para impactar de forma sucesiva sobre cada sitio de retención tras la incubación, y;
  - un detector para la detección de la fluorescencia allí emitida.
- 25   2. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado por que las microgotitas tienen un diámetro menor que 50 micrómetros.
3. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido como se reivindica en la reivindicación 2, caracterizado por que las microgotitas tienen diámetros en el intervalo de 2 a 20 micrómetros.
- 30   4. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el medio de contacto comprende un inyector o un fusionador de gotitas.
- 35   5. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la fuente de luz comprende un láser.
6. Un dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un ordenador para el análisis del resultado del detector para reproducir la secuencia de bases original del ácido nucleico.
- 40   7. Uso del dispositivo de secuenciación de ácidos nucleicos microfluido reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para secuenciar ADN o ARN.

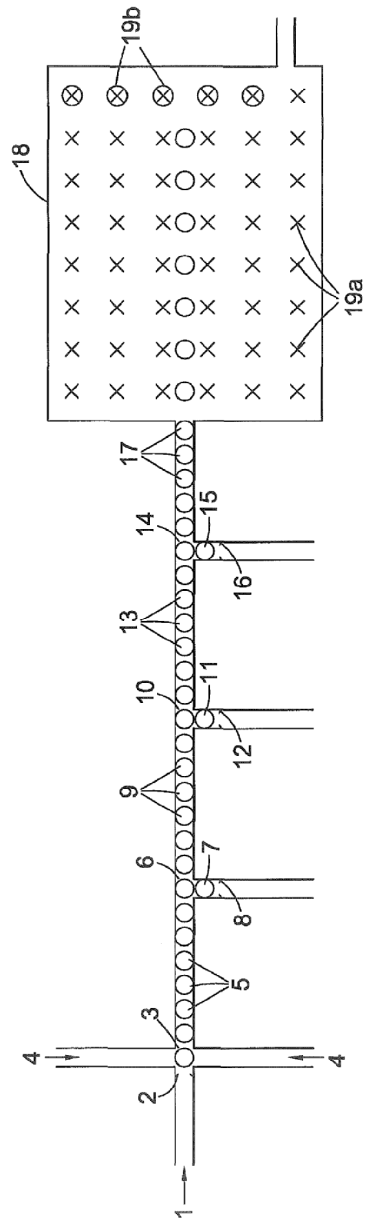


Fig. 1

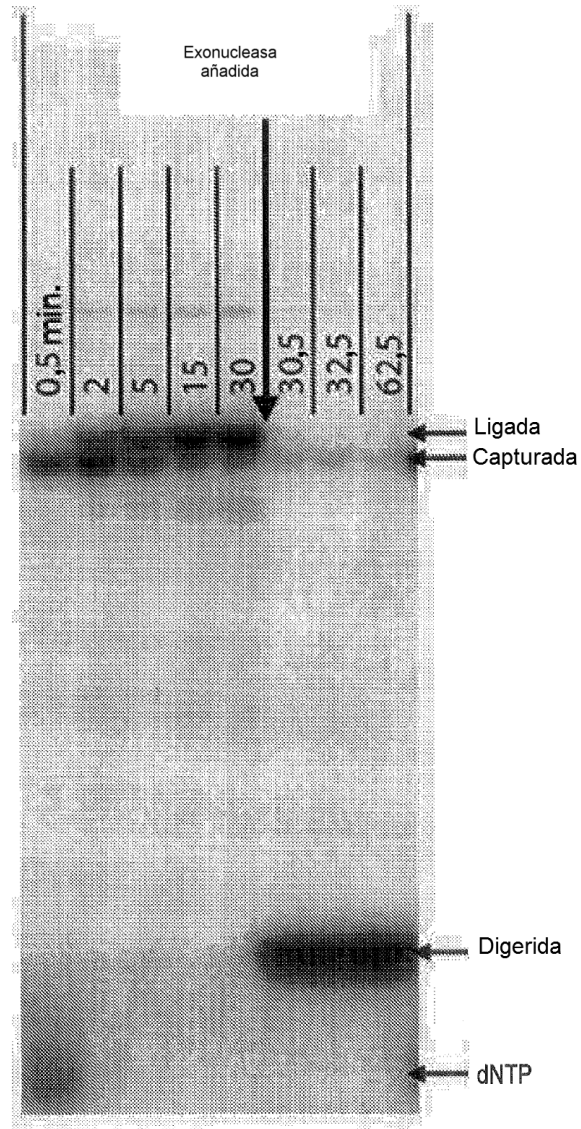


Fig. 2

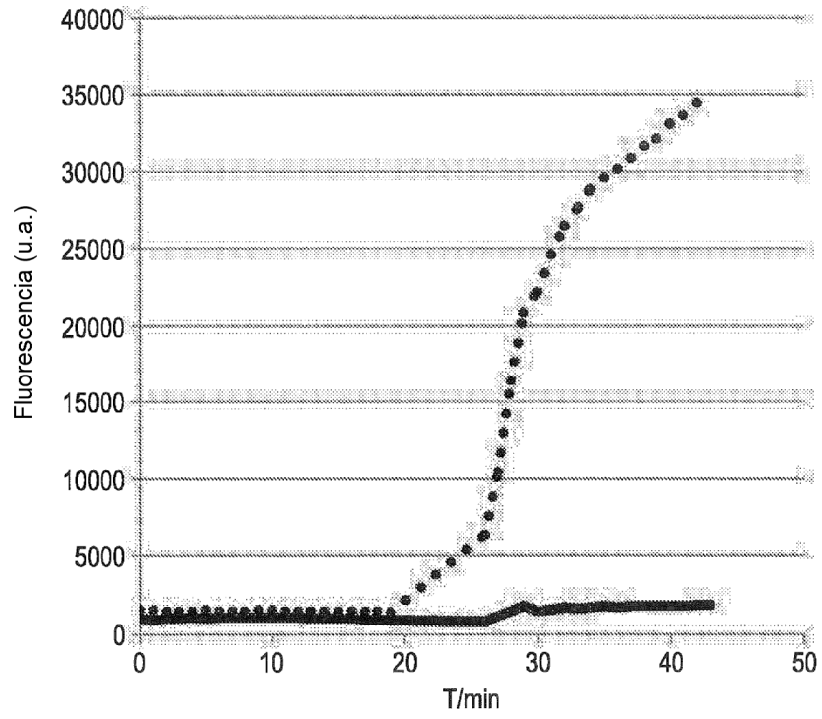


Fig. 3