

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 423**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2012 PCT/AU2012/000089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012 E 12867519 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2809799**

54 Título: **Plataforma giratoria para realizar secuenciación de ácido nucleico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2017

73 Titular/es:
**PYROBETT PTE LTD (100.0%)
8 Commonwealth Lane 02-02
Singapore 149555, SG**

72 Inventor/es:
**CORBETT, JOHN y
CORBETT, JOHN, SR.**

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 632 423 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

Plataforma giratoria para realizar secuenciación de ácido nucleico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método y un aparato para realizar un ensayo. En particular, la presente invención se refiere a una plataforma giratoria que puede ser usada para realizar un ensayo, en particular ensayos multi-etapa. Aunque la invención ha sido desarrollada principalmente para su uso en la secuenciación de ácido nucleico mediante piro-secuenciación, y va a ser descrita en lo que sigue con referencia a esta aplicación, debe apreciarse que la invención no se limita a este campo particular de uso.

Antecedentes de la invención

La exposición que sigue de la técnica anterior se proporciona a efectos de situar la invención en un contexto técnico apropiado y permitir que las de la misma puedan ser entendidas de manera más completa. Debe apreciarse, no obstante, que cualquier discusión de la técnica anterior a través de la descripción no debe ser considerada como una admisión expresa o implícita de que dicha técnica anterior es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en este campo.

La capacidad para determinar secuencias de nucleótido de ADN ha resultado ser cada vez más importante en los últimos tiempos. Con anterioridad, los dos métodos usados más habitualmente para secuenciación de ADN son el método de terminación de cadena enzimática y la técnica de escisión química, dependiendo en ambos casos de electroforesis de gel para resolver, conforme a su tamaño, fragmentos de ADN producidos a partir de un segmento de ADN más grande. La etapa de electroforesis y la detección de los fragmentos de ADN separados son procedimientos engorrosos. Sin embargo, aunque las unidades de electroforesis automatizadas están comercialmente disponibles, la electroforesis no resulta totalmente adecuada para proyectos de genoma a gran escala o secuenciación clínica donde se necesitan unidades de coste relativamente económico con un alto rendimiento. De ese modo, la necesidad de métodos no electroforéticos para secuenciación es importante.

Métodos de secuenciación en base al concepto de detección de pirofosfato orgánico (PPi) que se libera durante una reacción de polimerasa, han sido descritos con anterioridad (véanse las publicaciones internacionales de PCT nº WO 93/23564 y nº WO 89/09283), y a los que se hace referencia como pirosecuenciación. Según se añade cada nucleótido a una cadena creciente de ácido nucleico durante una reacción de polimerasa, se libera una molécula de pirofosfato. Se ha encontrado que el pirofosfato liberado bajo estas condiciones puede ser detectado enzimáticamente, por ejemplo, mediante la generación de luz en la reacción de luciferasa-luciferina. Tales métodos permiten que una base sea identificada en una posición objetivo y que el ADN sea secuenciado de manera simple y rápida mientras se evita la necesidad de electroforesis y el uso de radioetiquetas peligrosas.

Los primeros métodos de la técnica anterior para realizar pirosecuenciación emplearon un tubo microcentrífugo de 0,2 ml (o similar) con reactivos que se añadieron al tubo secuencialmente para detectar la secuencia del ADN presente en el tubo. A pesar de que este método es relativamente simple, el método adolece del inconveniente de que las longitudes de lectura son cortas, puesto que la reacción se diluye con cada adición de reactivo de nucleótido y/o se acumulan subproductos de la reacción y las condiciones de reacción alcanzan un punto en que la reacción ya no avanza más. Por ejemplo, típicamente sólo pueden ser secuenciadas de forma fiable alrededor de 80 bases con este método.

Se ha desarrollado también equipamiento comercial que utiliza pirosecuenciación. Estos sistemas usan celdas de flujo para realizar hibridación de una molécula objetivo de ADN/ARN. Para explicarlo, se inmoviliza ADN de cadena simple sobre una perla estacionaria que está situada en la celda de flujo, típicamente inmovilizando un ADN de doble cadena y desnaturalizando la cadena complementaria. Los reactivos, incluyendo un nucleótido (A, G, C o T) se hacen fluir más allá de la perla y se detecta luz si se ha incorporado un nucleótido. La intensidad de la señal de luz es proporcional al número de nucleótidos incorporados en una reacción simple. Entre la exposición de la perla a diferentes nucleótidos, se realiza también una etapa de lavado y el proceso se repite para detectar la incorporación del siguiente nucleótido.

El documento WO 2011/011823 A1 (PYROBETT PTE LTD) describe un método de pirosecuenciación, el cual se lleva a cabo sobre una plataforma giratoria. El documento WO 2004/046719 A1 (BIO-MOLECULAR HOLDINGS PTY LIMITED) describe métodos para analizar ácidos nucleicos, en los que se usa un dispositivo de centrifugación y partículas magnéticas.

También se conocen otros métodos de secuenciación mediante síntesis, por ejemplo usando nucleótidos etiquetados fluorescentemente. En un método de ese tipo, muestras de ADN son, en primer lugar, fragmentadas, y la doble hélice del ADN se funde en cadenas simples. Las moléculas de ADN simple son capturadas sobre una superficie en el interior de una celda de flujo y sirven como plantillas para el proceso de secuenciación por síntesis. Los nucleótidos etiquetados fluorescentemente son añadidos uno a uno, e incorporados en la cadena

complementaria creciente mediante una enzima de polimerasa de ADN. Los nucleótidos no utilizados se extraen por lavado. Tras la iluminación con un láser, los nucleótidos incorporados emiten luz que es detectada. La etiqueta fluorescente se retira con anterioridad a que se añada el siguiente nucleótido para que continúe el ciclo. El rastreo de la incorporación del nucleótido determina la secuencia exacta de cada molécula de ADN individual.

5 También se conoce la secuenciación por ligación. Este método de secuenciación de ADN usa ligasa enzimática de ADN para identificar el nucleótido presente en una posición dada de una secuencia de ADN. La sensibilidad de desajuste de una enzima de ligasa de ADN se usa para determinar la secuencia subyacente de la molécula objetivo de ADN. Véanse por ejemplo las patentes de EE.UU. nº 5.750.341 y nº 4.883.750.

10 Lo que se necesita es un aparato para realizar ensayos y análisis, que pueda ser usado en una diversidad de métodos químicos y de detección, y en particular para realizar ensayos que incluyan múltiples etapas de reacción y lavado tales como las usadas en la secuenciación de ácido nucleico. Además, lo que se necesita es un aparato que pueda ser usado como reemplazo conveniente para ensayos que requieran un entorno de paso a través, o para reemplazar ensayos de vasos de reacción fijos en donde, en caso de secuenciación de ácido nucleico, la acumulación de subproductos puede limitar la longitud de lectura de secuenciación máxima.

15 Un objeto de la presente invención consiste en superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior mencionada en lo que antecede, o proporcionar una alternativa útil.

20 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de uso de una plataforma giratoria que tiene al menos un pocillo para contener una superficie de soporte, y cargar al menos una superficie de soporte en cada pocillo. La superficie de soporte está adaptada para vincular o inmovilizar una primera o una segunda pareja de unión de un primer y un segundo par de parejas de vinculación. El primer y el segundo pares de vinculación forman parte de un ensayo, cuyo ensayo consiste preferentemente en secuenciación de un ácido nucleico, y más preferentemente es pirosecuenciación. Los reactivos para el ensayo se dispensan hacia el pocillo y para su contacto con la superficie de soporte, desde un punto externo de la plataforma. Los reactivos usados o consumidos pueden ser retirados por centrifugación mediante una rotación suficiente de la plataforma, y las superficies de soporte están retenidas en el pocillo durante la centrifugación. Cualquier método de retención de las superficies de soporte cae dentro del alcance de la presente invención y, a título de ejemplo solamente, las superficies de soporte son preferiblemente perlas magnéticas, y se usa un imán para retener las perlas magnéticas en los pocillos durante la centrifugación. En el contexto de la pirosecuenciación, con preferencia el ADN de una sola cadena (ssDNA) se aísla mediante la opción de lavado centrífugo. Los reactivos pueden ser retirados después de cada nueva adición de reactivo, o después de múltiples adiciones. La etapa de lavado centrífugo seca la superficie de soporte y la prepara para un reactivo posterior, y también extrae los subproductos indeseados del ensayo. La presente invención se refiere también a un aparato para hacer girar la plataforma y sujetar la superficie de soporte en el interior de un pocillo respectivo, y a kits que comprenden una plataforma y una superficie de soporte.

40 Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar secuenciación de ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:

45 proporcionar una plataforma que tenga al menos un pocillo para contener al menos una superficie de soporte, proporcionar al menos una superficie de soporte citada en el interior de cada uno de dichos pocillos, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una primera pareja de unión,

50 vincular o inmovilizar dicha primera pareja de unión en dicha superficie de soporte, y

dispensar un reactivo en cada pocillo citado desde un punto externo de dicha plataforma;

55 en donde, tras la citada etapa de dispensación, se hace que gire dicha plataforma suficientemente de tal modo que cualquier reactivo citado residual o que no haya reaccionado sea retirado de forma sustancialmente centrífuga desde cada pocillo citado y/o cada superficie de soporte citada,

en donde, durante la rotación, cada superficie de soporte citada está sujeta en el interior de cada pocillo citado.

60 Con preferencia, la secuenciación de ácido nucleico es pirosecuenciación.

65 Con preferencia, la superficie de soporte tiene forma de partícula magnética y dicha partícula magnética está sujeta magnéticamente en el interior de dicho pocillo mediante la colocación de un imán suficientemente cerca de dicha plataforma como para sujetar magnéticamente dicha(s) partícula(s) magnética(s) en el interior de dicho pocillo durante la rotación de dicha plataforma. Con preferencia, el imán tiene forma de placa o de anillo que asienta por debajo de la plataforma. En realizaciones preferidas, la placa magnética o el anillo está además adaptado para calentar dicho(s) pocillo(s) hasta alrededor de 150 °C, calentando con ello la citada superficie de soporte. Sin

embargo, en una realización alternativa, se dispone un electroimán para sujetar magnéticamente dicha(s) partícula(s) magnética(s) en el interior de dicho pocillo durante la rotación de la citada plataforma.

5 En realizaciones preferidas, la plataforma es sustancialmente circular y dichos pocillos están distribuidos en torno a la periferia de dicha plataforma circular. Con preferencia, alrededor de 2 a 500 pocillos están distribuidos en torno a la periferia de dicha plataforma, y el diámetro de dicha plataforma está comprendido entre aproximadamente 50 y 500 mm, y el espesor de dicha plataforma es de aproximadamente 1 a 6 mm. Con preferencia, los pocillos comprenden un volumen de entre aproximadamente 0,5 a 100 μ l o una profundidad de pocillo de aproximadamente 0,5 a 5 mm. Con preferencia, los pocillos están dimensionados para contener entre alrededor de 1 a alrededor de 50 superficies de soporte discretas.

15 En una realización alternativa, el pocillo incluye un rebaje para recibir dicha superficie de soporte durante la rotación de dicha plataforma, en donde dicho rebaje incluye un filtro adaptado para retener dicha superficie de soporte pero permitiendo que dicho reactivo pase a su través durante la rotación de dicha plataforma de tal modo que cualquier reactivo citado residual o sin reaccionar sea extraído de forma sustancialmente centrífuga desde cada uno de dichos pocillos y/o desde cada superficie de soporte citada.

20 Con preferencia, la plataforma está formada con un material plástico elegido en el grupo consistente en policarbonato, poliestireno, poliestireno de alto impacto, polietileno y polipropileno, o está formada a partir de vidrio o de cuarzo. Con preferencia, se ha dispuesto un canal en la periferia de dicha plataforma para recibir fluidos de desecho que son expulsados o centrífugos al exterior desde dicha plataforma durante la rotación.

25 Con preferencia, la primera pareja de unión es absorbida químicamente o unida covalentemente o iónicamente o con hidrógeno sobre la citada superficie de soporte, o las fuerzas de van der Waals inmovilizan dicha primera pareja de unión en dicha superficie de soporte.

30 Con preferencia, se dispensan una serie de reactivos en cada pocillo citado, y el primero de la serie de reactivos comprende la segunda pareja de vinculación a la primera pareja de unión, y los reactivos subsiguientes se eligen a partir de reactivos de lavado y/o enjuagado y reactivos para desarrollar una señal detectable. Con preferencia, el método de la invención comprende además la etapa de analizar la secuenciación de ácido nucleico durante y/o después de cada etapa de dispensación.

35 Con preferencia, el método de la invención comprende además la etapa de hacer girar la plataforma giratoria a una velocidad de entre aproximadamente 10 a 200 rpm mientras se está dispensando el citado reactivo, y hacer girar la plataforma giratoria a una velocidad mayor de 400 rpm para extraer sustancialmente por centrifugado dicho reactivo desde los citados pocillos. Con preferencia, la plataforma se hace girar a una velocidad suficientemente baja de modo que ningún reactivo sea extraído por centrifugación desde los pocillos durante las etapas de dispensación, y se hace girar a una velocidad suficientemente alta de tal modo que el reactivo sea retirado por centrifugación desde los pocillos durante las etapas de lavado o secado. Con preferencia, la velocidad suficientemente alta es mayor de 400 rpm, y puede ser de 1000, 2000, 3000, 4000 rpm, o más alta.

En algunas realizaciones preferidas, la plataforma se hace vibrar suficientemente para mezclar por completo entre sí dicho reactivo y dicha(s) superficie(s) de soporte.

45 También se describe en la presente memoria un kit que comprende una plataforma que tiene al menos un pocillo para contener una o más superficies de soporte, y al menos una superficie de soporte en el kit, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una primera pareja de unión. Con preferencia, la superficie de soporte está contenida en dicho pocillo y en donde una hoja desechable extraíble se adhiere a la superficie de dicha plataforma para retener dicha superficie de soporte en el citado pocillo. Con preferencia, el kit comprende uno o más reactivos para realizar secuenciación de ácido nucleico, y en particular para pirosecuenciación.

También se describe en la presente memoria un aparato para realizar secuenciación de ácido nucleico, comprendiendo dicho aparato:

55 un aparato para hacer girar una plataforma giratoria a una velocidad rotacional controlable predeterminada seleccionable por el usuario;

un aparato para encajar un imán en dicha plataforma giratoria para retener una partícula magnética en el interior de un pocillo de dicha plataforma;

60 opcionalmente, un aparato para dispensar una primera pareja de unión en dicho pocillo para inmovilizar la citada primera pareja de unión a dicha partícula magnética;

un aparato para dispensar un reactivo en dicho pocillo; y

65 opcionalmente, un aparato para dispensar un reactivo de lavado.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar secuenciación de ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 proporcionar una plataforma que tenga al menos un pocillo para contener al menos una superficie de soporte, proporcionar al menos una superficie de soporte citada en el interior de cada pocillo citado, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una segunda pareja de unión,
- 10 selectivamente: vincular o inmovilizar dicha segunda pareja de unión a dicha área de soporte, y dispensar un reactivo en cada pocillo citado desde un punto externo de dicha plataforma, en donde, tras la etapa de dispensación citada, se hace girar a dicha plataforma suficientemente para que cualquier reactivo residual o sin reaccionar sea extraído sustancialmente por centrifugación desde cada pocillo citado y/o desde cada superficie de soporte citada;
- 15 en donde, durante la rotación, cada superficie de soporte citada está sujeta en el interior de cada pocillo citado.
- 20 Con preferencia, una primera pareja de unión ha sido ya absorbida químicamente o covalentemente o iónicamente, o vinculada por hidrógeno sobre dicha superficie de soporte, o las fuerzas de van de Waals inmovilizan una primera pareja de unión en dicha superficie de soporte, y dicha segunda pareja de unión es vinculable a, o reaccionable con, dicha primera pareja de unión ya vinculada a dicha superficie de soporte.
- 25 Con preferencia, se dispensan una serie de reactivos en cada uno de dichos pocillos, y el primero de la serie de reactivos comprende la segunda pareja de unión a la primera pareja de unión, y los reactivos subsiguientes se eligen a partir de reactivos de lavado y/o enjuagado.
- 30 También se describe en la presente memoria un kit que comprende una plataforma que tiene al menos un pocillo para contener una o más superficies de soporte, y al menos una superficie de soporte, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para vincular selectivamente o inmovilizar una segunda pareja de unión.
- También se describe en la presente memoria un aparato para realizar secuenciación de ácido nucleico, tal como pirosecuenciación, comprendiendo dicho aparato:
- 35 un aparato para hacer girar una plataforma giratoria a una velocidad rotacional controlable predeterminada seleccionable por el usuario;
- 40 un aparato para encajar un imán en dicha plataforma giratoria para retener una partícula magnética en el interior de un pocillo de dicha plataforma;
- opcionalmente, un aparato para dispensar dicha segunda pareja de unión en el citado pocillo para inmovilizar selectivamente dicha segunda pareja de unión a la citada partícula magnética;
- 45 un aparato para dispensar un reactivo en dicho pocillo; y opcionalmente, un aparato para dispensar un reactivo de lavado.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 50 proporcionar una plataforma que tenga al menos un pocillo para contener al menos una superficie de soporte, proporcionar al menos una superficie de soporte citada en el interior de cada pocillo citado, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una pareja de unión de una cadena de ácido nucleico,
- 55 vincular o inmovilizar dicha pareja de unión de cadena de ácido nucleico en dicha superficie de soporte y a continuación vincular o inmovilizar selectivamente una cadena de ácido nucleico en dicha superficie de soporte, opcionalmente, desnaturalizar y extraer cualquier cadena de ácido nucleico complementaria, templando un cebador de secuenciación en dicha superficie de soporte, y
- 60 dispensar secuencialmente en cada uno de dichos pocillos desde un punto externo de la citada plataforma, una serie de reactivos que comprenden nucleótidos A, T, G y/o C, o los respectivos análogos de nucleótido adecuados, en donde, después de cada una, o de cualquiera, de dichas etapas de dispensación, la citada plataforma se hace girar suficientemente de tal modo que cualquier reactivo citado residual o sin reacción sea extraído sustancialmente por centrifugación desde cada pocillo citado y/o cada superficie de soporte citada;
- 65

en donde, durante la rotación, cada superficie de soporte citada está sujeta en el interior de cada pocillo.

5 Con preferencia, la cadena de ácido nucleico es ADN o ARN o una forma modificada de los mismos. Con preferencia, la secuenciación de una cadena de ácido nucleico es pirosecuenciación.

Con preferencia, la cadena de ácido nucleico está biotinilada y la pareja de unión de cadena de ácido nucleico comprende avidina o estreptavidina o un análogo para vincular la cadena de ácido nucleico biotinilada.

10 Con preferencia, cada superficie de soporte citada se pone en contacto secuencialmente con una serie de reactivos que comprenden nucleótidos A, T, G y/o C.

Con preferencia, la etapa de puesta contacto secuencial/dispensación comprende cualquiera de entre:

15 a.) cada nucleótido o su análogo se añade por separado y secuencialmente en un orden cualquiera deseado o predeterminado,

20 b.) los nucleótidos A+T+G+C o cualquier subconjunto predeterminado o deseado de estos últimos, se añaden como mezcla, y la mezcla se añade de nuevo, etc.

Con preferencia, comprende además la etapa de analizar dicha cadena de ácido nucleico durante y/o después de cada etapa de dispensación citada. Con preferencia, el análisis comprende detectar el siguiente par de base en dicha cadena de ácido nucleico correlacionando la salida de luz con el número de nucleótidos que han resultado vinculados a la cadena de ácido nucleico.

25 Con preferencia, la etapa de desnaturalización comprende calentar la cadena de ácido nucleico para efectuar la desnaturalización, o exponer la cadena de ácido nucleico a pH elevado.

30 Con preferencia, el método comprende la etapa de que, después de que la cadena de ácido nucleico citada ha sido desnaturalizada, se extrae la cadena complementaria mediante una etapa de enjuagado con un reactivo de enjuagado.

35 Con preferencia, cada superficie de soporte citada está preparada para que cada reactivo subsiguiente citado seque sustancialmente dicha superficie de soporte por rotación de dicha plataforma para extraer sustancialmente por centrifugación cualquier reactivo residual de tal modo que no exista sustancialmente ninguna contaminación de dicha superficie de soporte con algún reactivo.

40 También se describe en la presente memoria un kit para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico, comprendiendo dicho kit una plataforma giratoria que tiene al menos un pocillo para contener una o más superficies de soporte, y al menos una superficie de soporte, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una pareja de unión de cadena de ácido nucleico.

45 También se describe en la presente memoria el uso de dicho kit para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico. Con preferencia, el ensayo consiste en pirosecuenciación.

También se describe en la presente memoria un aparato para secuenciación de una cadena de ácido nucleico, comprendiendo dicho aparato:

50 un aparato para hacer girar una plataforma giratoria a una velocidad rotacional controlable predeterminada seleccionable por el usuario;

un aparato para encajar un imán en dicha plataforma giratoria para retener una partícula magnética en el interior de un pocillo de dicha plataforma giratoria;

55 opcionalmente, un aparato para dispensar una pareja de unión de cadena de ácido nucleico en dicho pocillo para inmovilizar dicha pareja de unión de cadena de ácido nucleico en dicha partícula magnética;

60 opcionalmente, un aparato para dispensar una cadena de ácido nucleico en dicho pocillo para inmovilizar selectivamente dicha cadena de ácido nucleico en dicha partícula magnética;

opcionalmente, un aparato para desnaturalizar y opcionalmente extraer, cualquier cadena de ácido nucleico complementaria;

65 un aparato para dispensar nucleótidos A, T, G y/o C o sus respectivos análogos o combinaciones de los mismos en dicho pocillo;

un aparato para dispensar un reactivo de lavado; y

opcionalmente, un aparato para dispensar una o más soluciones de enzimas.

- 5 Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico, comprendiendo dicho método las etapas de:

proporcionar una plataforma que tenga al menos un pocillo para contener al menos una superficie de soporte,

- 10 proporcionar al menos una superficie de soporte citada en el interior de cada pocillo citado, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar selectivamente una cadena de ácido nucleico,

vincular selectivamente o inmovilizar una cadena de ácido nucleico en dicha superficie de soporte,

- 15 opcionalmente, desnaturalizar y extraer cualquier cadena de ácido nucleico complementaria, templando un cebador de secuenciación para dicha superficie de soporte, y

dispensar secuencialmente en cada pocillo, desde un punto externo de dicha plataforma, una serie de reactivos que comprenden nucleótidos A, T, G y/o C o los respectivos análogos de nucleótido adecuados, en donde, después de cada, o de cualquiera, de dichas etapas de dispensación, se hace que gire la citada plataforma suficientemente de tal modo que cualquier reactivo residual o sin reaccionar citado, sea sustancialmente extraído por centrifugación desde cada pocillo citado y/o cada superficie de soporte citada;

- 20 en donde, durante la rotación, cada una de dichas superficies de soporte está sujeta en el interior de cada pocillo citado.

Con preferencia, la superficie de soporte tiene ya inmovilizada en la misma una pareja de unión de cadena de ácido nucleico, y en donde dicha cadena de ácido nucleico se vincula selectivamente a dicha pareja de unión de cadena de ácido nucleico. Con preferencia, la cadena de ácido nucleico es ADN o ARN o una forma modificada de los mismos. Con preferencia, la cadena de ácido nucleico está biotinilada y la primera pareja de unión comprende avidina o estreptavidina o un análogo para vincular la cadena de ácido nucleico biotinilada.

- 30 También se describe en la presente memoria un kit que comprende una plataforma giratoria que tiene al menos un pocillo para contener una o más superficies de soporte, y al menos una superficie de soporte, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar selectivamente una cadena de ácido nucleico.

También se describe en la presente memoria el uso de dicho kit para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico.

- 40 También se describe en la presente memoria un aparato para secuenciar una cadena de ácido nucleico, comprendiendo dicho aparato:

un aparato para hacer girar una plataforma giratoria a una velocidad rotacional controlable predeterminada seleccionable por el usuario;

- 45 un aparato para encajar un imán con dicha plataforma giratoria para retener una partícula magnética en el interior de un pocillo de dicha plataforma giratoria;

opcionalmente, un aparato para dispensar una cadena de ácido nucleico hacia dicho pocillo para inmovilizar dicha cadena de ácido nucleico en la citada superficie de soporte;

- 50 opcionalmente, un aparato para desnaturalizar y opcionalmente extraer cualquier cadena de ácido nucleico complementaria;

un aparato para dispensar nucleótidos A, T, G y/o C o sus respectivos análogos o combinaciones de los mismos en contacto con la citada superficie de soporte;

un aparato para dispensar un reactivo de lavado; y

- 60 opcionalmente, un aparato para dispensar una o más soluciones enzimáticas.

En algunas realizaciones, la plataforma giratoria comprende una pluralidad de pocillos relativamente poco profundos que comprenden un volumen de entre alrededor de 0,5 y 100 μ l o una profundidad de alrededor de 0,5 a 3 mm. En otras realizaciones, los pocillos son relativamente profundos, de alrededor de 5 a 8 mm para contener perlas magnéticas que en sí mismas están adaptadas para inmovilizar una primera pareja de unión o adaptadas para inmovilizar selectivamente una segunda pareja de unión. En este ejemplo, las perlas se consideran áreas discretas,

- 65

y en cada pocillo puede estar contenida una o más perlas.

5 La primera o la segunda parejas de unión son preferiblemente vinculables a las perlas, las cuales son preferentemente perlas magnéticas. Se apreciará que si se emplean perlas magnéticas, el pocillo debe ser de profundidad y volumen suficientes como para contener las perlas de tal modo que las mismas no se desplacen centrífugamente durante la rotación del disco/plataforma. En realizaciones preferidas, el sistema tiene la capacidad de capturar perlas magnéticas en el interior de cada uno de los pocillos elevando un disco anular magnético hasta el lado inferior del disco/plataforma de la muestra, o activando un electroimán. En este ejemplo, las perlas magnéticas pueden estar contenidas en los pocillos y se puede aplicar una fuerza centrífuga suficiente mediante la rotación de la
10 plataforma para secar sustancialmente las perlas respecto a cualquier reactivo circundante. Se apreciará también que la plataforma puede comprender una pluralidad de matrices circulares de pocillos dispuestas concéntricamente. En algunas realizaciones, la primera pareja de unión es absorbida químicamente o por la superficie de la perla o partícula. En otras realizaciones, la primera pareja de unión está vinculada covalentemente o iónicamente o mediante hidrógeno a la superficie de la perla o partícula, y en otras realizaciones adicionales, las fuerzas de van der
15 Waals sujetan la primera pareja de unión a la superficie de la perla o partícula. Se apreciará que la segunda pareja de unión es vinculable o reaccionable con la primera pareja de unión ya vinculada a la superficie de la perla o partícula.

20 La presente invención es particularmente relevante en cuanto a métodos y ensayos tal como los métodos de secuenciación de ácido nucleico, por ejemplo la pirosecuenciación. Por ejemplo, la primera y la segunda parejas de unión son pares de parejas de vinculación (opcionalmente una de las cuales puede estar etiquetada detectablemente), las cuales se seleccionan preferiblemente a partir de avidina o estreptavidina o estreptactina o análogos y biotina o análogos.

25 Sin embargo, según se discute además en lo que sigue, una ventaja de la presente invención consiste en proporcionar de forma relativamente rápida y relativamente simple, etapas de lavado y volúmenes bajos residuales asociados de solución de lavado y reactivos.

30 La presente invención va a ser explicada ahora en el contexto de pirosecuenciación.

Se apreciará que en una primera realización, la superficie de soporte sujeta en el interior del pocillo está adaptada para inmovilizar una primera pareja de unión, la cual puede ser, por ejemplo, avidina o estreptavidina o análogos, y a continuación la avidina o estreptavidina o estreptactina o análogos pueden hacerse reaccionar consiguientemente con ADN de participación, biotinilados, en una primera etapa de procesamiento subsiguiente. Se apreciará además
35 que en una segunda realización, la superficie de soporte comprende ya una primera pareja de unión, y la superficie está adaptada para inmovilizar selectivamente una segunda pareja de unión. Por lo tanto, se apreciará que la superficie de soporte conforme a la primera realización puede ser considerada como "no funcionalizada", y la superficie de soporte conforme a la segunda realización puede ser considerada como "funcionalizada" o "pre-funcionalizada".

40 Con preferencia, el primero de la serie de reactivos comprende la segunda, o complementaria, pareja de unión respecto a la primera pareja de unión, y a continuación los reactivos subsiguientes se eligen a partir de reactivos de participación, de lavado o enjuagado, y según se discute más adelante.

45 Con preferencia, el método de la invención comprende además la etapa de analizar el ensayo de secuenciación de ácido nucleico durante y/o después de cada etapa citada de contacto o dispensación. En realizaciones preferidas, con anterioridad a poner en contacto las superficies de soporte con un reactivo subsiguiente, cada superficie de soporte citada se somete a una etapa de lavado o enjuagado con un reactivo de lavado. El reactivo de lavado puede ser cualquier reactivo que pueda extraer mediante lavado sustancialmente cualquier solución residual procedente de
50 la etapa previa de puesta en contacto, o que reduzca la cantidad de cualquier solución residual y los componentes presentes en dicha solución (agentes activos como, por ejemplo, apirasa u otras enzimas adecuadas que degradan los subproductos o reducen de otra manera la concentración de subproductos).

Mientras que el reactivo de lavado puede ser cualquier reactivo que pueda extraer mediante lavado sustancialmente cualquier solución residual a partir de la etapa previa de puesta en contacto/dispensación o reducir la cantidad de cualquier solución residual y los componentes presentes en dicha solución, y que puede ser un agente activo como apirasa, en otras realizaciones preferentemente la etapa de lavado para extraer el exceso de nucleótido está libre de apirasa, como se detalla en Mashayekhi F., y Ronaghi M., Análisis de factores limitativos de longitud de lectura en química de pirosecuenciación. Anal. Biochem. (2007), 363(2): 275-287. Según se detalla en Mashayekhi et al., la
60 sustitución de la etapa de lavado por una etapa de lavado libre de apirasa, ha demostrado que mejora la longitud de lectura de pirosecuenciación.

Con preferencia, la plataforma giratoria se hace girar a baja velocidad mientras se dispensan los reactivos, por ejemplo entre alrededor de 10 y 200 rpm, de modo que se extraigan los reactivos añadidos al sitio objetivo; y, la plataforma se hace girar a alta velocidad mientras se dispensan los reactivos, por ejemplo entre alrededor de 400 y
65 2000 rpm. Sin embargo, se apreciará que son también posibles otras velocidades de rotación.

En realizaciones preferidas, cada superficie de soporte citada está preparada para que cada reactivo subsiguiente citado "seque" sustancialmente dichas superficies de soporte mediante rotación de la citada plataforma para extraer por centrifugación cualesquiera reactivos residuales de tal modo que se reduzca de forma sustancial, con preferencia que no exista nada de contaminación de dicha superficie de soporte con el reactivo procedente de la etapa anterior.

También se describe en la presente memoria el uso de una combinación de la plataforma y la superficie de soporte para realizar un ensayo. También se describe en la presente memoria un kit que comprende la plataforma según se ha discutido en la presente memoria y una o más superficies de soporte, y opcionalmente uno o más reactivos para dicho ensayo.

Con preferencia, el aparato para hacer girar la plataforma es un motor, y las velocidades rotacionales predeterminadas son seleccionables por el usuario y están comprendidas entre alrededor de 10 y 5000 rpm. El aparato está también dotado, con preferencia, de un sistema de extracción de vacío para extraer los reactivos de desecho que son expulsados fuera de la plataforma giratoria.

La presente invención va a ser explicada ahora en el contexto de la pirosecuenciación.

20 Pirosecuenciación

Con preferencia, el método de secuenciación de ácido nucleico empleado es pirosecuenciación. Sin embargo, se apreciará que se pueden utilizar otros métodos de secuenciación de una cadena de ácido nucleico, según se discute con mayor detalle a continuación.

Con preferencia, dicha cadena de ácido nucleico es ADN o ARN o una(s) forma(s) modificada(s) de los mismos, por ejemplo después del tratamiento con bisulfito o bases adicionales de cobertura que no están presentes en los ácidos nucleicos naturales. Se apreciará que copias de la cadena de ácido nucleico están retenidas en cada una de las una o más áreas discretas.

Con preferencia, la plataforma giratoria es sustancialmente circular y tiene un diámetro de entre alrededor de 50 y 500 mm. Con preferencia, la plataforma giratoria comprende entre alrededor de 2 y 500 pocillos que están equiespaciados del centro de la plataforma giratoria. Se apreciará que el diámetro puede ser cualquier diámetro, y el diámetro puede ser elegido de modo que albergue el número de pocillos, el cual puede ser 1 o un número mayor. En realizaciones preferidas, los pocillos están distribuidos o posicionados de manera sustancialmente uniforme alrededor de la periferia de la plataforma giratoria para formar una matriz sustancialmente circular.

Con preferencia, los pocillos contienen superficies de soporte, las cuales tienen forma de perlas, que con preferencia son perlas magnéticas que están adaptadas para vincular selectivamente, capturar o inmovilizar una cadena de ácido nucleico (por ejemplo, la plantilla de secuenciación o el cebador de secuenciación). Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas la cadena de ácido nucleico está biotilada y las áreas discretas comprenden avidina, y preferentemente estreptavidina o un análogo, para enlazar la cadena de ácido nucleico biotilada. Alternativamente, las superficies de soporte o las perlas están adaptadas para vincular, capturar o inmovilizar avidina, y con preferencia estreptavidina, y en una etapa subsiguiente, la cadena de ácido nucleico biotilado está selectivamente inmovilizada en la unión de avidina/estreptavidina a las superficies de soporte. Sin embargo, se apreciará que están disponibles otras técnicas químicas para inmovilizar una cadena de ácido nucleico en áreas discretas. La presente invención no se limita a que pueda ser empleada una sola técnica química para inmovilizar la cadena de ácido nucleico en áreas discretas. En otras realizaciones, los agentes de unión de plantillas pueden ser en forma de unión de ligando, cebador universal/sonda o un anticuerpo.

En una realización, los pocillos pueden ser pocillos de poca profundidad, los cuales pueden comprender un volumen de entre alrededor de 0,5 a 100 μ l. Se apreciará que los pocillos de poca profundidad pueden ser de cualquier volumen. En algunas realizaciones, los pocillos son de alrededor de 1 a 5 mm de diámetro. Sin embargo, se apreciará que los pocillos pueden ser de cualquier diámetro o forma.

Con preferencia, la plataforma giratoria está formada ventajosamente con materiales plásticos, aunque no obstante, los expertos en la materia apreciarán que son posibles otros materiales, tal como vidrio o cuarzo. Con preferencia, el material plástico se elige en el grupo consistente en policarbonato, poliestireno, o polipropileno. También se contempla que la plataforma giratoria pueda ser también una estructura laminada. En cualquier caso, el material con el que está formada la plataforma giratoria debe ser capaz de resistir la rotación sin deformación, y potencialmente resistir los efectos térmicos durante la desnaturalización del ácido nucleico, según se discute con mayor detalle en lo que sigue.

En algunas realizaciones, la plataforma giratoria, que puede ser un disco sustancialmente circular, comprende además un canal dispuesto en la periferia de la plataforma para recibir fluidos de desecho que son expulsados o centrifugados hacia fuera desde la superficie de la plataforma giratoria durante su rotación. Se apreciará que, una

vez que cada etapa o número de etapas de la reacción de secuenciación ha sido completada, el reactivo de desecho o no usado en los pocillos debe ser retirado para conseguir longitudes de lectura largas. La creación de fuerza centrífuga por rotación de la plataforma giratoria provoca que los fluidos de desecho sean expulsados hacia fuera de la plataforma, y con el fin de mejorar la manipulación de los fluidos de desecho se ha proporcionado un canal.

5 Alternativamente, los reactivos de desecho pueden ser expulsados de la plataforma cada 20, 30, 40 ó 50 ciclos de adición de nucleótido, o justamente antes de que los reactivos se hayan diluido suficientemente como para inhibir la reacción.

En esta realización, se apreciará que la masa total de la plataforma giratoria se incrementará según se añadan a los pocillos reactivos de pirosecuenciación adicionales, y a continuación se expulsan de la plataforma después de que se complete cada reacción de pirosecuenciación. Por lo tanto, en una realización alternativa, puede ser deseable que la plataforma giratoria no incluya ningún canal y que el alojamiento dentro del cual está situada la plataforma giratoria esté configurado de modo que tenga un canal dispuesto adyacente a la periferia de la plataforma, de tal modo que los fluidos de desecho que sean expulsados de la superficie de la plataforma giratoria durante su rotación sean recogidos en este canal "estacionario".

10

15

El experto en la materia, familiarizado con las técnicas y la química subyacentes en la pirosecuenciación, podrá apreciar que la cadena de ácido nucleico inmovilizada en las superficies de soporte puede necesitar ser desnaturizada para extraer la cadena de ácido nucleico complementaria. La desnaturización puede ser lograda mediante cualquier método, si bien los ejemplos preferidos comprenden calentar los pocillos y las superficies de soporte o incluso la plataforma giratoria completa hasta una temperatura suficiente para la desnaturización, por ejemplo entre 94 y 99 °C, o exponer las superficies de soporte a un solvente calentado a más de 94 °C, tal como un tampón. Alternativamente, las superficies de soporte pueden ser expuestas a una composición desnaturizante (por ejemplo, composiciones que comprenden NaOH). Otros métodos incluyen el calentamiento por infrarrojos o una radiación equivalente. Se apreciará que la plataforma giratoria debe estar formada por materiales que sean capaces de resistir tales condiciones de desnaturización.

20

25

La plataforma giratoria podría estar habilitada para calentar y enfriar con el fin de hibridizar o fundir el ADN con el ácido nucleico capturado objetivo o con el cebador de secuenciación capturado. En el caso de la pirosecuenciación, una vez que el dsADN objetivo ha sido capturado y desnaturizado, se añade un cebador de secuenciación para hibridizar el ssADN o, alternativamente, el ssADN se hibridiza con el cebador de secuenciación capturado. En este caso, la plataforma giratoria puede ser calentada para extraer cualesquiera estructuras terciarias del ssADN, y a continuación enfriada para hibridizar el cebador de secuenciación con el objetivo inmovilizado.

30

Se apreciará que el calentamiento de la cámara puede añadir algo a la complejidad del dispositivo, dado que cuando se usan volúmenes relativamente pequeños de reactivos, la cámara se hermetiza con medios adecuados. Alternativamente, se puede usar una capa de aceite para reducir la evaporación durante la fase de calentamiento. El experto es conocedor de otros medios adecuados. Alternativamente, se podría añadir el reactivo desnaturizante al ssADN capturado y al cebador de secuenciación, a continuación se puede añadir tampón de un pH más bajo para reducir el pH y templar el cebador de secuenciación en el ADN objetivo. Una vez templado, el tampón de pH puede ser expulsado para su desecho.

35

40

El experto en la materia podrá apreciar que la presente invención, en varias realizaciones, está capacitada para proporcionar muchas ventajas. Por ejemplo, la presente invención permite una longitud de lectura de base incrementada en comparación con los dispositivos y métodos de la técnica anterior. Para explicarlo, los métodos de la técnica anterior realizan pirosecuenciación en un tubo microcentrífugo (o similar) de 0,2 ml, y los reactivos se añaden al tubo secuencialmente para detectar la secuencia del ADN presente en el tubo. Los nucleótidos se añaden secuencialmente a la reacción que contiene el ADN en el tampón de reacción, todas las enzimas y el (los) sustrato(s). La reacción se lleva a cabo en una placa de 96 ó 24 pocillos. Las placas se calientan (28 °C) y se agitan durante la reacción. Con ello, el volumen de nucleótidos añadido es más o menos equivalente al volumen que se evapora, lo que no da como resultado una dilución de cada mezcla de reacción sino una acumulación de subproductos. Los métodos de la técnica anterior adolecen del inconveniente de que las longitudes de lectura son comparativamente cortas, lo que es más probable en base a la acumulación de productos de degradación, por ejemplo los generados por la actividad de la apirasa. La presente invención no presenta los inconvenientes conocidos a partir del estado de la técnica debido a que la cadena de ácido nucleico inmovilizada está en contacto con un nucleótido, y los restantes nucleótidos así como todos los productos y subproductos de reacción, son después sustancialmente extraídos de los pocillos según se ha descrito en lo que antecede, y la superficie de contacto también se lava opcionalmente antes de ponerse en contacto con un reactivo de nucleótido subsiguiente. Se contempla que es posible una longitud de lectura de base de más de 300 ó 400 bases, y con mejoras en la química potencialmente de más de 1000 bases.

45

50

55

60

Otras ventajas resultarán evidentes para el experto en la materia; sin embargo, por motivos de claridad, la invención proporciona un aparato relativamente más simple que las celdas de flujo pasante de la técnica anterior. Incluso las ventajas adicionales se refieren a secuenciación que potencialmente es relativamente más rápida que los métodos y dispositivos de la técnica anterior, y que requieren volúmenes de reactivos potencialmente más bajos en comparación con la técnica anterior. Una limitación adicional de algunos métodos de la técnica anterior, y en

65

particular del método de realización de pirosecuenciación, consiste en el tiempo tan largo que se necesita para un ciclo de reacción, es decir, la adición de un nucleótido. En algunos casos, el tiempo necesario para un ciclo de redacción es normalmente de alrededor de 60 segundos o incluso más, el cual está basado en el tiempo necesario para degradar todos los nucleótidos restantes del ciclo de reacción anterior. Solamente después de completar la degradación de sustancialmente todos los nucleótidos restantes del ciclo de reacción anterior, se añade el siguiente nucleótido. Se apreciará que el aparato, según se describe en la presente memoria, permite que los nucleótidos restantes sean retirados a una velocidad mucho más alta (es decir, mediante etapas de centrifugación, etapas de lavado). Esto da como resultado un tiempo de ciclo mucho más corto para una base que sea incorporada. Sin pretender limitar la presente invención, se entiende que el tiempo del ciclo puede ser reducido a aproximadamente 15 segundos, creando con ello una reducción aproximada de al menos cuatro veces el tiempo de ejecución. Sin embargo, se contempla que el tiempo del ciclo pueda ser reducido incluso más.

La presente invención también permite la manipulación mejorada del fluido en comparación con algunos dispositivos de la técnica anterior. También es posible que la presente invención pueda proporcionar una sensibilidad incrementada en comparación con los dispositivos de la técnica anterior dado que puede usar un fotomultiplicador de alta velocidad en vez de una matriz CCD.

La pirosecuenciación es un método secuenciación de ADN en base al principio de "secuenciación por síntesis" que se basa en la detección de liberación de pirofosfato por incorporación de nucleótido en vez de terminación de cadena con didesoxinucleótidos. La "secuenciación por síntesis" incluye tomar una cadena simple de ADN que va a ser secuenciada, y a continuación sintetizar su cadena complementaria enzimáticamente. Los métodos de "secuenciación por síntesis" se basan en la detección de la actividad de una polimerasa de ADN (una enzima de síntesis de ADN) detectando un subproducto de reacción de la reacción de adición de nucleótido de la polimerasa de ADN ($\text{ADN} + x\text{dNTP} \rightarrow \text{ADN}_{+1} + \text{PPi}$ o un subproducto diferente dependiendo de x, donde x puede ser también ATP). En la reacción de secuenciación, el PPi se cuantifica usando una cascada de enzima que genera luz.

1. Sulfurilasa: $\text{APS} + \text{PPi} \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4$

2. Luciferasa: $\text{Luciferina} + \text{ATP} \rightarrow \text{Oxoluciferina} + \text{PPi} + \text{Luz}$

3. Apirasa: degradación de los dNTPs y ATP restantes.

Además, existen varias reacciones conocidas en el estado de la técnica que pueden ser usadas para cuantificar los subproductos como por ejemplo, el uso de PPK (fosfoenol piruvato diquinasa) que transforma $\text{PPi} + \text{PEP} + \text{AMP} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{Pi}$. Además, los subproductos pueden ser detectados, por ejemplo, mediante cambio en el pH o cambios en otro parámetro detectable. Los métodos de "secuenciación por síntesis" pueden estar basados alternativamente en la detección de la actividad de una ligasa de ADN que detecta un subproducto de reacción de la reacción de adición de cebador de ligasa de ADN. Los expertos en la materia son conocedores de métodos adecuados.

Esencialmente, el método permite la secuenciación de una cadena simple de ADN sintetizando la cadena complementaria a lo largo de la misma, el par de base en un instante, y detectando la base que se añadió realmente en cada etapa. El ADN de plantilla o el cebador de secuenciación, se inmoviliza, y se añaden soluciones de nucleótidos A, C, G y/o T después de la reacción, secuencialmente. La luz se produce solamente cuando el nucleótido añadido complementa la primera base desemparejada o bases de la plantilla. La secuencia de nucleótidos añadidos que producen señales detectables, por ejemplo señales quimioluminiscentes, permite la determinación de la secuencia de la plantilla. La plantilla de ssADN se hibridiza con un cebador de secuenciación o viceversa, y se incuba con las enzimas de ADN polimerasa, y opcionalmente con ATP sulfurilasa, luciferasa y/o apirasa y, a título de ejemplo, con los substratos adenosina 5'fosfosulfato (APS) y luciferina. Otras cascadas de reacción que proporcionan una señal detectable son bien conocidas por el experto en la materia.

En una amplia visión general, la pirosecuenciación sigue las siguientes etapas generales:

1. La adición de uno de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótido (dNTPs) o derivados adecuados del mismo, a la plantilla de cadena de ácido nucleico. La polimerasa de ADN incorpora el dNTP complementario o su derivado en la plantilla, lo que libera pirofosfato (PPi) estequiométricamente.

2. El ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente PPi en ATP. Este APT dispara la conversión mediada por luciferasa de luciferina en oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada con luciferasa, se detecta y se analiza.

3. Los nucleótidos y el ATP no incorporados, son degradados posteriormente mediante apirasa u otras enzimas adecuadas.

Varias modificaciones en el protocolo de pirosecuenciación clásica son bien conocidas en el estado de la técnica, y son muy adecuadas para ser llevadas a cabo en un aparato conforme a la presente invención. Puesto que la luz

producida en cada etapa de incorporación de nucleótido simple es proporcionar a la cantidad de nucleótido incorporado, un software adecuado permite la transformación de la información de luz generada en un patrón de secuencia de nucleótido específica. En pirosecuenciación clásica, el patrón de luz se denomina "programa". Además, dicho software permite con preferencia la cuantificación de relaciones de incorporación de poblaciones mixtas en posiciones específicas.

La presente invención contempla métodos de secuenciación que comprenden las etapas de inmovilizar la plantilla de ácido nucleico o el objetivo que va a ser secuenciado o el cebador de secuenciación y ciclos de adiciones de nucleótido por etapas. Mientras que la presente invención ha sido ejemplificada con respecto a pirosecuenciación, se apreciará que la presente invención es también útil para otras químicas de secuenciación de ácido nucleico, y en particular químicas tales que se benefician de un entorno de flujo pasante y de una fase sólida. La presente invención puede evitar también algunas de las etapas mencionadas con anterioridad, o al menos hacerlas más convenientes. La pirosecuenciación requiere que esté presente la plantilla de ssADN. Opcionalmente, la superficie de soporte sirve también para capturar dsADN y desnaturalizar dicho dsADN para dejar ssADN, por ejemplo con un cebador de secuenciación templado, listo para pirosecuenciación, eliminando con ello la necesidad de una etapa de aislamiento separada.

Específicamente, el experto en la materia podrá entender que el término "secuenciación de ADN de flujo pasante" incluye, por ejemplo, un método de inmovilización de una plantilla de ácido nucleico o un cebador de secuenciación, hibridizar el cebador en la plantilla o viceversa, y realizar una síntesis mediada por cebador de una manera paso a paso en presencia de nucleótidos en donde los nucleótidos incluyen, por ejemplo opcionalmente, una porción de terminación de extensión de cadena, tal como una porción dideoxi, y opcionalmente una etiqueta detectable (por ejemplo, secuenciación de Sanger). Una realización de un método adicional de secuenciación de ácido nucleico comprende las etapas de: incorporar un nucleótido etiquetado en la cadena de extensión de cebador; identificar el nucleótido incorporado, y extraer la porción de terminación de extensión de cadena y la etiqueta de modo que la extensión de cadena esté lista para su incorporación en un nucleótido sucesivo.

El experto en la materia podrá entender también que el término "secuenciación de ADN de flujo pasante" incluye, por ejemplo, secuenciación de ácido nucleico por ligación. Debe quedar claro que el término "secuenciación de ácido nucleico por ligación" comprende inmovilizar una plantilla de ácido nucleico o un cebador de secuenciación, hibridizar el cebador en la plantilla o viceversa, seguido de rondas sucesivas de ligación de ADN de, por ejemplo, nucleótidos etiquetados o sondas etiquetadas cortas.

También debe quedar claro para el experto en la materia que la presente invención contempla cualquier método de secuenciación de ADN que comprenda etapas de inmovilización de ácido nucleico y adición paso a paso de nucleótido y detección.

El método de la invención puede incluir también una etapa de lavado opcional o de tratamiento enzimático que puede mejorar la extracción del reactivo residual o que no haya reaccionado.

En una realización, la etapa de puesta en contacto secuencial o de dispensación comprende cualquiera de entre:

a.) nucleótidos A seguidos de T seguidos de G y después seguidos de C, seguidos de A de nuevo, etc., o

b.) se añaden nucleótidos A+T+G+C como mezcla, y a continuación se añade la mezcla de nuevo, etc.

En otra realización, cada área de soporte citada se pone en contacto secuencialmente con una serie de reactivos que comprenden nucleótidos A, T, G y/o C. La etapa de puesta en contacto secuencial comprende uno de los siguientes:

a.) cada nucleótido o su análogo, se añade separadamente y secuencialmente en cualquier orden deseado o predeterminado,

b.) los nucleótidos A+T+G+C o cualquier subconjunto predeterminado o deseado de estos últimos, se añade en forma de mezcla, y la mezcla se añade de nuevo, etc.

La etapa a.) de puesta en contacto secuencial es particularmente útil para la metodología de pirosecuenciación, y la etapa b.) de puesta en contacto secuencial es particularmente útil si se utilizan nucleótidos etiquetados, tal como nucleótidos etiquetados fluorescentemente donde cada uno de ellos está etiquetado con un tinte diferente.

Se apreciará que el método en su totalidad es iterativo en el sentido de que la secuencia de nucleótidos puede ser añadida en cualquier orden predefinido y/o cualquier combinación predefinida, y la secuencia repetida un número de veces según se requiera para secuenciar la plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, se puede añadir A, T, G y/o C solamente en un sitio de mutación conocido. La ventaja de esta realización consiste en que este procedimiento acelera la detección de mutación conocida, dado que se requieren adiciones de un menor número de bases.

Con preferencia, el método de la invención comprende además la etapa de analizar la cadena de ácido nucleico restante y/o después de dicha etapa de puesta en contacto. El análisis puede ser cualquier análisis, aunque no obstante se puede apreciar que, en el contexto de la pirosecuenciación, la etapa de análisis comprende en cada etapa de dicho análisis identificar el par de base siguiente en la cadena de ácido nucleico correlacionando la salida de luz con el número de nucleótidos que han sido incorporados en la cadena de ácido nucleico. El experto puede adoptar todas las medidas técnicas apropiadas y adecuadas para detectar la incorporación de un nucleótido. Por ejemplo, un detector adecuado para detectar la luz producida por la reacción es un tubo fotomultiplicador (PMT). Se apreciará que según se hace girar la plataforma giratoria, las muestras pasan por el detector, preferiblemente todas las muestras pasan por el detector.

En realizaciones preferidas, con anterioridad a la puesta en contacto de las áreas discretas en una superficie de soporte citada con cada reactivo consiguiente, se someten a una etapa de lavado o enjuagado con un reactivo de lavado. El reactivo de lavado puede ser cualquier reactivo que sea adecuado para extraer mediante lavado la solución residual de la etapa previa de puesta en contacto, con preferencia para extraer mediante lavado sustancialmente toda la solución residual de la etapa previa de puesta en contacto. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el reactivo de lavado es el tampón en el que se lleva a cabo la etapa de reacción siguiente. El reactivo de lavado puede contener también potenciadores de lavado, tales como, a título de ejemplo, apirasa, fosfatasa, etc. Los reactivos de lavado adecuados son bien conocidos por el experto en la materia.

Según se ha discutido con anterioridad, la etapa de desnaturalización puede comprender calentar la cadena de ácido nucleico para efectuar la desnaturalización, o exponer la cadena de ácido nucleico a una enzima o mezcla de enzimas adecuada.

En realizaciones preferidas, el método de la invención comprende la etapa de que, después de que la cadena de ácido nucleico se desnaturaliza, la cadena complementaria se extrae mediante una etapa de enjuagado con un reactivo de enjuagado.

El aparato para dispensar dicha cadena de ácido nucleico, para dispensar nucleótidos A, T, G y/o C, y para dispensar reactivo de lavado, puede ser cualquier aparato, aunque con preferencia, el aparato es similar a la tecnología del tipo de inyección de tinta, piezo actuada o impulsada por pulsos de aire. El aparato está también dotado, con preferencia, de un sistema de extracción de vacío para extraer los reactivos de desecho que son expulsados de la plataforma giratoria. El aparato está también dotado de un medio de detección adecuado para detectar la luz producida por la reacción de pirosecuenciación. Los detectores adecuados podrán ser conocidos por el experto en la materia, por ejemplo un fotomultiplicador que puede estar montado por encima de la plataforma giratoria.

El aparato para desnaturalizar y opcionalmente extraer cualquier cadena de ácido nucleico puede comprender un aparato para calentar la plataforma a alrededor de 94 °C, o dispensadores adicionales de jeringa o peristálticos que dispensen reactivos calientes u otros productos químicos desnaturalizantes.

En una metodología de detección alternativa, se monta uno o más medidores de pH de estado sólido bajo cada pocillo de la plataforma. La plataforma es por lo tanto reutilizable puesto que las perlas magnéticas pueden ser usadas para soportar el ADN enlazado para la detección de la secuencia, y los pocillos pueden ser lavados según se ha descrito anteriormente entre cada ciclo de secuenciación. Una vez que la secuenciación está completa, las perlas pueden ser liberadas extrayendo el imán desde por debajo de la plataforma, y la plataforma puede ser lavada por completo y a continuación cargada con nuevas muestras para análisis. El solicitante contempla que la plataforma pueda también ser desechable dado que el coste de los ISFETs (51), si están personalizados para la plataforma, puede ser suficientemente bajo (es decir, como chips semiconductores) para hacer que resulte viable el desecho de la plataforma de detección de ISFET después de su uso.

El experto en la materia podrá apreciar que cuando una polimerasa añade un nucleótido, se libera un ion H⁺, cambiando con ello el pH local, lo que puede ser detectado, por ejemplo, mediante medidores de pH de estado sólido. A título de ejemplo, hacemos referencia al documento US 2010/0151479 de DNA Electronics Ltd., el cual divulga un aparato de detección que comprende un Transistor de Efecto de Campo Sensible a los Iones (ISFET) dispuesto para generar una señal eléctrica de salida en respuesta a fluctuaciones localizadas de carga iónica en, o adyacentes a, la superficie del transistor. En este ejemplo, se miden las fluctuaciones de carga iónica en vez de los valores absolutos. Esta alternativa simplifica la química puesto que el nucleótido natural puede ser añadido secuencialmente, y cuando se detecta un cambio de pH, las perlas son capturadas, el pocillo se lava, y se añade una nueva ronda de nucleótido.

Con preferencia, cuando se usa un sistema de detección de ISFET o una plataforma reutilizable, se emplearán las perlas magnéticas para capturar el ssADN. Con una plataforma de detección de ISFET desechable, la superficie de la puerta del ISFET podría estar recubierta para capturar el ssADN, o también se podrían usar perlas magnéticas.

Conforme a un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un detector de ISFET con la plataforma giratoria de la invención, y que emplea superficies de soporte extraíbles discretas en cada pocillo. Con

preferencia, los elementos de detección de ISFET forman la base de cada pocillo.

El destinatario experto comprenderá que la invención comprende las realizaciones y características divulgadas en la presente memoria, así como todas las combinaciones y/o permeaciones de las realizaciones y características divulgadas.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones preferidas de la invención van a ser descritas ahora, a título de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

la figura 1A es una vista en planta de la plataforma giratoria de la invención;

la figura 1B es una vista lateral de la plataforma giratoria mostrada en la figura 1A;

la figura 1C es una vista en sección tomada por la línea 1C-1C de la figura 1B;

la figura 2A es una vista en perspectiva, y la figura 2B es una vista en perspectiva seccionada, de una realización de la plataforma giratoria mostrada en la figura 1;

la figura 3 es una vista en sección de un aparato que tiene la plataforma giratoria mostrada en la figura 1A instalada en el mismo;

la figura 4 muestra un aparato de detección óptica que utiliza óptica de enfoque para monitorizar una reacción;

la figura 5 muestra un aparato de detección óptica que utiliza formación de imagen directa para monitorizar una reacción;

las figuras 6A a C muestran alturas de pico de pirosecuenciación para A) Estreptavidina Mag Sefarosa, B) MyOne Estreptavidina C1, y C) Neutravidina Speed-Beads Magnética de Sera-Mag;

la figura 7 muestra picos de pirosecuenciación logrados para perlas de Estreptavidina Mag Sefarosa usando una frecuencia de mezcla más alta;

la figura 8 muestra un pico alto a continuación de la adición de enzima y de mezclas de substrato a un amplicón de PCR inmovilizado en Neutravidina SpeedBeads Magnética de Sera-Mag lavada a una velocidad de centrifugación de 1500 rpm;

la figura 9 muestra señales de cambio de fase y de pico más anchas observadas durante pirosecuenciación usando ADN objetivo inmovilizado en perlas de Dynabeads MyOne Estreptavidina C1;

la figura 10 es una fotografía de una plataforma de producción real que muestra perlas magnéticas cargadas en los pocillos 1 a 3;

las figuras 11 y 12 son vistas en perspectiva de una plataforma conforme a la invención encajada con un motor para hacer girar la plataforma, y muestran un anillo magnético periférico anular en una primera posición en la que existe una fuerza magnética pequeña o nula aplicada a la plataforma;

las figuras 13 y 14 son vistas laterales en sección que muestran el anillo magnético en una primera y una segunda posiciones, respectivamente, y

la figura 15 es otra realización de la invención, y muestra una plataforma que tiene pocillos que están configurados y dispuestos de tal modo que bajo rotación, las perlas giran en una cavidad y el fluido de desecho es impulsado por una fuerza centrífuga a través de una frita o filtro similar.

Definiciones

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la terminología siguiente conforme a las definiciones establecidas en lo que sigue; también debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es solamente con el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitativa. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que un experto en la materia entiende normalmente para los mismos en el sector al que pertenece la invención.

A menos que el contexto requiera claramente otra cosa, a través de la descripción y de las reivindicaciones, las palabras “comprenden”, “comprendiendo” y similares deben ser entendidas en el sentido inclusivo en oposición al

sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de “incluir, pero sin limitarse a ello”.

En lo que sigue, o donde no se indique otra cosa, “%” significará “% en peso”; “relación” significará “relación de peso”, y “partes” significará “partes en peso”.

5 A pesar de que los rangos numéricos y los parámetros que establecen el alcance amplio de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos son considerados de manera tan precisa como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente algunos errores resultantes necesariamente de las desviaciones estándar encontradas en sus mediciones de prueba respectivas.

10 Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en la presente memoria no están calificadas con el término “alrededor de”. Se entiende que si se usa el término “alrededor de” explícitamente o no, hay que entender que cada cantidad dada en la presente memoria está referida al valor dado real, y se entiende que también se refiere a la aproximación a un valor dado tal que podría ser inferido en base a un experto en la materia, incluyendo aproximaciones debidas a condiciones experimentales y/o de medición para tal valor dado.

15 Los términos “predominantemente” y “sustancialmente”, según se utilizan en la presente memoria, significan que comprenden más del 50% en peso, a menos que se indique otra cosa.

20 La mención a un rango numérico usando puntos extremos, incluye todos los números comprendidos dentro de ese rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

25 El término “preferido” y “con preferencia” se refiere a realizaciones de la invención que pueden aportar determinados beneficios, bajo ciertas circunstancias. Sin embargo, otras realizaciones pueden ser también preferidas, bajo iguales o distintas circunstancias. Además, la mención a una o más realizaciones preferidas no implica que no sean útiles otras realizaciones, y no se pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

30 El listado de elementos enumerados no implica que cualquiera de ellos, o todos los elementos, sean mutuamente exclusivos. El listado de elementos enumerados no implica que cualquiera de ellos, o todos los elementos, sean colectivamente exhaustivos ni nada así, a menos que se indique otra cosa de manera expresamente específica. El listado de elementos enumerados no implica que los elementos estén ordenados de alguna manera conforme al orden en que los mismos han sido enumerados.

35 Según se usa en la presente memoria, el término “pareja de unión” debe entenderse que significa uno de un par de la pareja de unión, el cual puede ser cualquier par de ligando/receptor. Uno del par de pareja de unión se menciona como “primera pareja de unión” y el otro del par de pareja de unión se menciona como la “segunda pareja de unión”. Por ejemplo, los pares de pareja de unión pueden ser estreptavidina/avidina y biotina. Los pares de pareja de unión pueden incluir, por ejemplo, estreptavidina y ácido nucleico biotinilado.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término “giratoria” está previsto que signifique adaptado para ser girado. También debe entenderse que los términos “perla”, “partícula” y “soporte sólido” se usan de forma intercambiable, al igual que “plataforma” o “disco”.

45 **Realización preferida de la invención**

En esta solicitud se describen numerosas realizaciones, y se presentan únicamente con fines ilustrativos. No se pretende que las realizaciones descritas sean limitativas en ningún sentido. La invención es ampliamente aplicable a numerosas realizaciones, como resultará fácilmente evidente a partir de la divulgación de la presente memoria. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle como para permitir que los expertos en la materia pongan en práctica la invención, y debe entenderse que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar otros cambios sin apartarse del alcance de la presente invención. En consecuencia, los expertos en la materia reconocerán que la presente invención puede ser puesta en práctica con diversas modificaciones y alteraciones. Ahora se hará referencia a los dibujos, en donde los números de referencia iguales se refieren a partes iguales a través de los mismos.

Ahora se va a describir una realización preferida de la presente invención con referencia a pirosecuenciación. La descripción de una realización preferida con referencia a pirosecuenciación no debe ser tomada como limitativa de la invención a ensayos de pirosecuenciación.

60 Con referencia a la figura 1, se proporciona una plataforma (o disco) giratoria en forma de disco 1 de policarbonato, que comprende dos o más pocillos 2 adaptados para contener al menos una superficie de soporte en forma de perla para retener selectivamente una cadena de ácido nucleico para realizar secuenciación del ácido nucleico. Los pocillos 2 son con preferencia de 2-3 mm de diámetro, y están situados alrededor de la circunferencia del disco a intervalos equiespaciados. Por ejemplo, un disco 1 que tiene un diámetro de 120 mm tiene una circunferencia de 377 mm, y que forma áreas discretas de 2 de 3 mm de diámetro separadas por 6 mm (entre centros de los sitios 2

de las áreas discretas/objetivos) a un radio de 55 mm desde el centro del disco 1, da como resultado aproximadamente 57 pocillos alrededor de la periferia del disco 1. Sin embargo, el número de pocillos podría ser un número más pequeño o más grande usando un disco 1 más grande o áreas discretas más pequeñas, por ejemplo de 0,5 mm de diámetro con una separación de, por ejemplo, 1 mm, o cualquier combinación de las mismas. Con preferencia, los pocillos 2 son pocillos de poca profundidad, que comprenden un volumen de entre alrededor de 0,5 a 100 μ l.

Se puede apreciar otra realización en la figura 2, en la que las características iguales han sido identificadas con números de referencia iguales. En este ejemplo, las plataformas giratorias son de 200 mm de diámetro con 50 pocillos equiespaciados alrededor de la periferia. Los pocillos son de alrededor de 3 mm de diámetro, y pueden estar fabricados con materiales que incluyen policarbonato, poliestireno transparente, y poliestireno blanco de alto impacto (HIPS). Los espesores de la plataforma son típicamente de 1 mm a 5 mm, y las profundidades de los pocillos de alrededor de 4 mm.

El método de secuenciación preferentemente empleado es pirosecuenciación. Sin embargo, se apreciará que se pueden utilizar otros métodos de secuenciación de una cadena de ácido nucleico, según se ha discutido con anterioridad. Con preferencia, los pocillos 2 contienen superficies de soporte adaptadas para inmovilizar selectivamente la cadena de ácido nucleico. Por ejemplo, la cadena de ácido nucleico puede estar biotinilada y las superficies de soporte pueden comprender estreptavidina para vincular la cadena de ácido nucleico biotinilado a las mismas. Sin embargo, se apreciará que se encuentran disponibles otras sustancias químicas para inmovilizar una cadena de ácido nucleico en las superficies de soporte.

De acuerdo con un método de la invención para realizar secuenciación de una cadena de ácido nucleico, se proporciona una plataforma giratoria 1 y la cadena de ácido nucleico se inmoviliza en superficies de soporte que están contenidas en pocillos 2. A continuación, cualquier cadena de ácido nucleico complementaria se desnatura y se extrae, por ejemplo calentando la plataforma 1 y por lo tanto las superficies de soporte hasta alrededor de/aproximadamente 94 °C. Las superficies de soporte se ponen a continuación en contacto secuencialmente con nucleótidos A, T, G y/o C mediante dispensación de un reactivo adecuado en el pocillo 2, en donde entre cada etapa de puesta en contacto se hace que gire la plataforma 1 de tal modo que cualquier nucleótido residual o que no haya reaccionado se extrae sustancialmente por centrifugación desde el pocillo 2.

El método de la invención comprende además la etapa de analizar la cadena de ácido nucleico durante y/o después de cada etapa citada de puesta en contacto. La etapa de análisis comprende detectar el siguiente par de base en la cadena de ácido nucleico correlacionando la salida de luz resultante de la incorporación del nucleótido con el número de nucleótidos que han resultado enlazados a la cadena de ácido nucleico. Un detector adecuado para detectar la luz producida por la reacción es un fotomultiplicador. Se apreciará que según se hace que gire la plataforma giratoria 1, todas las muestras pasan por el detector. Si no se ha incorporado ningún nucleótido, entonces no existe ninguna señal luminosa y la mezcla de reacción se expulsa (ya sea cada ciclo o ya sea cada 10⁹-50⁹ ciclo (por ejemplo), pero menos del 80⁹ ciclo) usando fuerza centrífuga, y comienza otra ronda con el siguiente nucleótido.

En realizaciones preferidas, con anterioridad a la puesta en contacto del pocillo 2 con un nucleótido consiguiente, cada superficie de soporte 2 se somete a una etapa de lavado o enjuagado con un reactivo de lavado. El reactivo de lavado puede ser cualquier reactivo que pueda extraer mediante lavado sustancialmente cualquier solución residual a partir de la etapa previa de puesta en contacto, y se prefiere un tampón de PCR.

Con preferencia, la plataforma giratoria 1 se hace girar a baja velocidad mientras se dispensan reactivos de nucleótido y enzima, por ejemplo entre alrededor de 10 y alrededor de 200 rpm, y la plataforma 1 se hace girar a alta velocidad mientras se dispensa el reactivo de lavado, por ejemplo entre alrededor de 400 y 4000 rpm.

Con referencia a la figura 3, la presente invención proporciona también aparatos para su uso con la plataforma giratoria 1, para secuenciación de una cadena de ácido nucleico. El aparato comprende un motor 50 para hacer girar la plataforma 1 a una velocidad rotacional controlable predeterminada seleccionable por el usuario, tal como un motor capaz de proporcionar velocidades rotacionales de entre alrededor de 10 y 4000 rpm. El aparato está también previsto para dispensar la cadena de ácido nucleico en los pocillos 2 para inmovilizar la cadena de ácido nucleico en las superficies de soporte. Dicho aparato puede adoptar una forma de tecnología de tipo chorro de tinta o de un dispensador 7 adecuado tal como una bomba de jeringa. El aparato está también previsto para dispensar nucleótidos A, T, G y/o C, para su puesta en contacto con las superficies de soporte, y para dispensar un reactivo de lavado. De nuevo, dicho aparato puede adoptar una forma de tecnología de tipo chorro de tinta. El aparato está también previsto para desnaturar y extraer cualquier cadena de ácido nucleico complementaria, y dicho aparato puede adoptar forma de una bobina de calentamiento (no representada en esta figura), dispuesta en el interior del alojamiento 4.

También se ha proporcionado un detector 8 adecuado para detectar la luz producida por la reacción de pirosecuenciación. Los detectores adecuados podrán ser conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo un fotomultiplicador que puede ser montado por encima de la plataforma giratoria 1. Ahora se hace referencia particular a las figuras 4 y 5, las cuales muestran varias realizaciones de detectores fotomultiplicadores para su uso en la

invención. Un primer detector fotomultiplicador óptico utiliza óptica de enfoque (figura 4) y el segundo usa formación de imagen directa (figura 5). La figura 4 detalla un lente de enfoque 10, una abertura 11, una superficie fotosensible 12, un fotomultiplicador 13, y electrónica de detección 14. La figura 5 detalla una abertura 15, una superficie fotosensible 15, un detector fotomultiplicador 17 y electrónica de detección 18.

5 La plataforma giratoria 1 puede hacerse girar a baja velocidad para dispensar la enzima y la mezcla de nucleótido(s) (es decir, a 200 rpm o menos), donde la fuerza centrífuga es suficientemente baja como para no mover la mezcla de los pocillos 2 y para permitir que la reacción avance y la detección óptica sea completada. Se pueden añadir reactivos de lavado a alta velocidad del rotor (es decir, 400+ rpm) de modo que el lavado extraiga todos los reactivos desde los pocillos 2 y no haya contaminación sustancialmente entre los pocillos 2.

Ejemplos

Pirosecuenciación que hace uso de perlas magnéticas

15 El uso de pirosecuenciación para determinar la secuencia de nucleótido de un ADN objetivo, requiere la inmovilización del ADN objetivo en un soporte sólido. Una descripción simple del protocolo de pirosecuenciación es como sigue:

20 1) Inmovilización de ADN de doble cadena biotinilado en un soporte sólido.

2) Separación de la cadena no biotinilada mediante desnaturalización química.

3) Extracción de la cadena no biotinilada mediante lavado.

4) Templado del cebador de oligonucleótido para facilitar el inicio del proceso de secuenciación.

5) Adición de enzima y mezclas de sustrato para habilitar pirosecuenciación.

30 6) Dispensación del primer desoxiribonucleótido (dNTP), que se incorpora en el ADN objetivo mediante polimerasa de ADN (asegurando que ambos nucleótidos son complementarios).

7) Tras la incorporación de la base complementaria, se libera una molécula de pirofosfato la cual se convierte en una señal luminosa a través de una cascada de reacciones enzimáticas. La intensidad de la señal se usa para determinar si están presentes uno o más nucleótidos en una fila.

8) El dNTP en exceso no incorporado, se degrada para asegurar que no se incorpore durante la siguiente parte de la reacción de secuenciación. Esto asegura que la secuencia permanece en sincronización entre todas las plantillas objetivo.

9) Continuar la reacción de secuenciación añadiendo la siguiente base complementaria.

La inmovilización de ADN biotinilado, que se usa en la reacción de pirosecuenciación, puede ser lograda usando partículas 55 de perla magnética recubiertas con estreptavidina o neutravidina. Las partículas magnéticas 55 ofrecen una gran área superficial y permiten la movilidad en el interior de la solución de reacción, incrementando la capacidad de unión y la probabilidad de localización del ADN objetivo biotinilado.

En este ejemplo, la inmovilización de la plantilla de ADN se consiguió mezclando las partículas 55 de perla magnética con el ADN objetivo biotinilado junto con un tampón de enlace en el pocillo 2 de una plataforma/disco 1 durante un período de tiempo establecido (por ejemplo, 10 minutos). A continuación del período de inmovilización, la plantilla sin enlazar y el sobrenadante que contenía otros diversos reactivos, que son indeseados en la reacción de pirosecuenciación, fueron extraídos mediante centrifugación. Con anterioridad a la centrifugación, se puso en contacto un anillo magnético 20 con la plataforma, inmovilizando las partículas magnéticas en el fondo del pocillo. El anillo magnético se dejó caer a menos de 1 mm por debajo de la superficie de la plataforma, proporcionando un campo magnético suficiente para retener las partículas de perla magnética en el interior del pocillo mientras se permitía que la plataforma girara y centrifugara el sobrenadante hacia el exterior a velocidades mayores de 2000 rpm. Se aplicó una etapa de lavado usando un tampón que contenía detergente para asegurar una extracción suficiente del sobrenadante. Se usaron las mismas etapas de centrifugación para extraer el tampón de lavado.

La desnaturalización de la cadena de ADN no biotinilado se consiguió usando hidróxido de sodio desnaturalizante, el cual fue aplicado durante no más de 20 segundos. El desnaturalizante fue extraído usando centrifugación y un tampón de lavado aplicado para optimizar la extracción. De nuevo, se aplicó el anillo magnético para permitir la centrifugación del sobrenadante mientras se retenían las partículas de perla magnética en el interior de los pocillos.

Para facilitar la reacción de pirosecuenciación, se añadió un cebador de secuenciación y se hibridizó en el ADN objetivo mediante un proceso de calentamiento de la muestra por encima de 80 °C, y enfriamiento a una temperatura

por debajo de 30 °C.

Al terminar el proceso de templado, la mezcla de enzima de pirosecuenciación fue dispensada en los pocillos junto con una mezcla de sustrato que contenía APS y luciferina. Las partículas de perla magnética fueron vibradas en la solución de reacción para asegurar que la reacción ocurriera aleatoriamente. Para explicar esto, la plataforma fue vibrada suficientemente de modo que las perlas fueran agitadas y por lo tanto la solución y las partículas de las perlas fueron mezcladas por completo entre sí.

Finalmente, se determinó la secuencia dispensando una pequeña cantidad de un dNTP en la mezcla de reacción y midiendo una señal luminosa si existía la base complementaria en ese punto de la secuencia. Se dejó pasar un período de 1 minuto para asegurar que el exceso de dNTP sin enlazar fuera degradado por la apirasa. La secuencia se determinó dispensando uno cualquiera de los dNTP. Como la plataforma se hizo girar durante la reacción, también fue vibrada para asegurar que las perlas magnéticas se mantuvieran en movimiento constante y para impedir adicionalmente que las mismas se agregaran o se aglutinaran entre sí.

Partículas de perla magnética

Se evaluaron varios tipos de partículas de perla magnética en cuanto a su rendimiento.

- Dinabeads MyOne Estreptavidina C1 (Invitrogen): perlas superparamagnéticas de 1 µm de diámetro con una monocapa de estreptavidina recubierta covalentemente en la superficie de la perla hidrofílica.
- Sera-Mag Magnetic SpeedBeads (Thermo Scientific): partículas magnéticas a base de carboxilato modificado de 1 µm, realizadas mediante un proceso de núcleo-carcasa, recubiertas covalentemente con neutravidina.
- Streptavidin Mag Sepharose (GE Life Science): estreptavidina acoplada a perlas de sefarosa que contienen magnetita.

Las partículas de perla magnética se valoraron en cuanto a:

- 1) capacidad para inmovilizar ADN objetivo biotinilado;
- 2) permanecer en el interior de un pocillo durante el proceso de centrifugación;
- 3) evitar un enlace no específico de proteína durante la reacción de pirosecuenciación.

Resultados

Inmovilización

Se encontró que la totalidad de los tres tipos de perlas fueron capaces de inmovilizar ADN biotinilado. Se observaron las alturas de la señal de pico de pirosecuenciación, más alta para la Sera-Mag Magnetic SpeedBeads Neutravidina seguida de la Dynabeads MyOne Estreptavidina C1 y después la Streptavidin Mag Sepharose (véanse las figuras 6A a C). La señal para las perlas de Streptavidin Mag Sepharose fue significativamente más baja en comparación con los otros dos tipos de perlas. Se descubrieron dos razones: en primer lugar, debido al tamaño y al peso de las perlas, éstas no se mezclaron bien bajo condiciones vibratorias estándar; en segundo lugar, el color oscuro de las perlas atenuó la señal luminosa mediante absorbancia. Una solución a la primera cuestión fue vibrar a una frecuencia más alta. En efecto, las frecuencias de vibración más altas permitieron una mejor mezcla y por lo tanto, mejores alturas de pico de señal (véase la figura 7).

Centrifugación

Se determinó que con el fin de conseguir una extracción óptima de las moléculas de reacción indeseadas desde el ADN inmovilizado, la velocidad rotacional para la centrifugación necesitaba estar por encima de 2000 rpm. Los resultados usando ADN aislado de la reacción de cadena de polimerasa, con centrifugación de lavado a 1500 rpm, demostraron un pico alto tras la adición de la enzima y la mezcla de sustrato (véase la figura 8). Los picos de secuenciación resultantes fueron atenuados significativamente. La causa del pico alto tras la adición de la enzima y del sustrato pudieron ser explicados por la pobre extracción de los constituyentes de PCR durante las etapas de lavado siguientes a la inmovilización del ADN en las partículas de perla magnética. El dNTP residual procedente del PCR habría sido todo incorporado tras la adición de la enzima y de la mezcla de sustrato, completando la secuencia instantáneamente, proporcionando con ello un solo pico alto con una atenuación subsiguiente del resto de la reacción de secuenciación debido a una pequeña plantilla restante no incorporada. Los datos demostraron que se necesitó una velocidad mayor de 2000 rpm para conseguir la extracción completa del sobrenadante.

La aplicación de velocidades de centrifugación mayores de 2000 rpm dio como resultado que todas, salvo las perlas de estreptavidina mag sefarosa, fueron desplazadas de los pocillos. Debido a su tamaño más grande, estas perlas

permanecieron en el interior de los pocillos a velocidades mayores de 2000 rpm.

Vinculación no específica

5 Debido a la composición de la carcasa externa de algunas de las perlas, la vinculación no específica de las enzimas usadas en la reacción de pirosecuenciación puede tener un efecto adverso sobre los picos y la secuencia resultantes. Una característica de este fenómeno consiste en el ensanchamiento de los picos. Esto se atribuye a una reducción de la apirasa de la enzima, lo que degrada el exceso de nucleótidos sin vincular. Cantidades reducidas de apirasa darán también como resultado un exceso de nucleótidos que se incorporan de manera no síncrona, provocando que la secuencia cambie de fase. La secuencia resultante se convierte con ello en incomprensible ya que se observan picos para inyecciones de nucleótido que no se espera que tengan ninguna señal.

15 Tales cuestiones fueron observadas respecto a las perlas Dynabeads MyOne Estreptavidina C1 (véase la figura 9). De hecho, tanto las anchuras de pico como las alturas de pico no específicas fueron mayores en comparación con las otras dos perlas. Las perlas menos afectadas fueron las partículas de perla de Streptavidin Mag Sepharose. Sin pretender limitarnos a ninguna teoría, se cree que la carcasa externa de sefarosa es inerte, evitando con ello la formación de enlace no específico. Por el contrario, la superficie de la perla para las partículas de perlas de Dynabeads MyOne Estreptavidina C1 contiene una carga que atrae a la apirasa cargada opuestamente, vinculándola con ello a la perla. La apirasa de enlace puede que no sea ya usada para degradar los nucleótidos en exceso, provocando un cambio de fase en la secuencia.

Conclusión

25 En base a las observaciones respecto a los distintos tipos de perlas, se concluyó que la perla óptima para su uso eran las perlas de Streptavidin Mag Sepharose, aunque se debe apreciar que otras perlas son también viables para el método de la invención. Las partículas magnéticas fueron capaces de inmovilizar el ADN objetivo con centrifugación de lavado llevada a cabo a ciertas velocidades para asegurar plantillas más limpias para secuenciación. La carcasa externa inerte también significa que el enlace no específico de las enzimas de pirosecuenciación no fue una cuestión que afecte al rendimiento de secuenciación por incorporación no síncrona de dNTP.

30 Las figuras 6A a C muestran alturas de pico de pirosecuenciación para: A) Streptavidin Mag Sepharose, B) MyOne Streptavidin C1, y C) Sera-Mag Magnetic Speed-Beads Neutravidin. Un picomol de plantilla de ADN fue añadido a una solución de 10 µl de tampón de enlace e incubado durante 10 minutos. Las perlas inmovilizadas fueron lavadas en solución tampón con anterioridad a la posterior desnaturalización con NaOH. Se añadió cebador de secuenciación a una concentración de 400 nM y se templó calentando a 80 °C durante 60 segundos y después se enfrió a 30 °C. Se añadió la enzima y el sustrato, y la reacción de pirosecuenciación se realizó de nuevo usando 15 ciclos de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Los picos más altos se observaron para la Sera-Mag Magnetic SeppedBeads Neutravidin.

40 La figura 7 muestra picos de pirosecuenciación logrados para las perlas de Streptavidin Mag Sepharose usando una frecuencia de mezcla más alta. Los picos de la señal se incrementaron a partir de una altura de pico simple media de 5 sobre 40 unidades. Sin embargo, debido a la atenuación de la señal a través del color más oscuro de las partículas de perla magnética, las alturas de pico no excedieron de la observada para las otras dos perlas.

45 La figura 8 muestra un pico alto a continuación de la adición de mezclas de enzima y sustrato a un amplicón de PCR inmovilizado en Sera-Mag Magnetic SpeedBeads Neutravidin lavado a una velocidad centrífuga de 1500 rpm. Los picos de reacción de secuenciación subsiguientes a continuación de la adición de la mezcla de enzima y sustrato, fueron significativamente atenuados. Las mismas perlas no permanecieron en el interior del pocillo tras centrifugación por encima de 2000 rpm.

50 La figura 9 muestra un cambio de fase y señales de pico más anchas observadas durante la pirosecuenciación usando ADN objetivo inmovilizado en perlas de Dynabeads MyOne Streptavidin C1. La figura 25 es una fotografía de una plataforma de producción real que muestra perlas magnéticas cargadas en pocillos 1 a 3. Las figuras 26 y 27 son vistas en perspectiva de una plataforma conforme a la invención encajada con un motor para rotación de la plataforma, y muestran un anillo magnético periférico anular en una primera posición donde existe una fuerza magnética pequeña o nula aplicada a la plataforma. Las figuras 28 y 29 son vistas laterales en sección que muestran el anillo magnético en una primera y una segunda posiciones, respectivamente. En la segunda posición, el anillo está situado suficientemente cerca de la plataforma para que ejerza una fuerza magnética sobre cualquiera de las perlas magnéticas contenidas en los pocillos.

55 La figura 15 es otra realización de la invención, y muestra una plataforma que tiene pocillos que están configurados y dispuestos de tal modo que, bajo rotación, las perlas giran en una cavidad y el fluido de desecho es impulsado por la fuerza de centrifugación a través de una frita o filtro similar.

65 Según se ha discutido con anterioridad, la determinación de una secuencia de ADN puede ser lograda mediante el

uso de la aplicación de pirosecuenciación (véase Agah A., Aghajan M., Mashayekhi F., Amini S., Davis R., Plummer J.D., Ronaghi M., Griffin P.B., "Un modelo multi-enzima para pirosecuenciación, *Nuclei Acids Res.*, 2004; 32: e 166). La secuenciación se consigue detectando la liberación de pirofosfatasa a continuación de la incorporación de tres desoxiribonucleósidos de cebado y cinco trifosfatos de cebado (dNTP) complementarios en una plantilla de cadena simple por medio de la enzima de polimerasa de ADN. Inicialmente, la pirofosfatasa debe ser convertida en trifosfato adenosina (ATP) mediante la enzima de sulfurilasa. Es la reacción de ATP con luciferina, a través de la enzima de luciferasa, la que genera una señal luminosa, indicativa de la incorporación del nucleótido y por tanto, de la secuencia de la cadena de la plantilla. Para permitir la incorporación y la detección del siguiente nucleótido sin interferencia del nucleótido previamente añadido, se usa la enzima de apirasa. La apirasa degradará el exceso de nucleótido con anterioridad a la adición del siguiente nucleótido.

Durante el proceso de pirosecuenciación, existe una acumulación de subproductos tales como nucleótidos de sulfato y difosfato. Estos subproductos inhiben las enzimas dando como resultado una reducción de la calidad de la señal durante la ejecución de una secuencia larga. Por ejemplo, la inhibición de la apirasa da como resultado la extracción de los nucleótidos no incorporados que conduce a la incorporación no sincronizada de bases y por tanto de una pobre detección de señal. Como resultado, la longitud de la secuenciación usando la aplicación de pirosecuenciación queda normalmente limitada a no más de 60 nucleótidos (véase, Mashayekhi F., Ronaghi M., "Análisis de factores de limitación de longitud de lectura en la química de secuenciación", *Anal. Biochem.*, 2007; 363; 275-287).

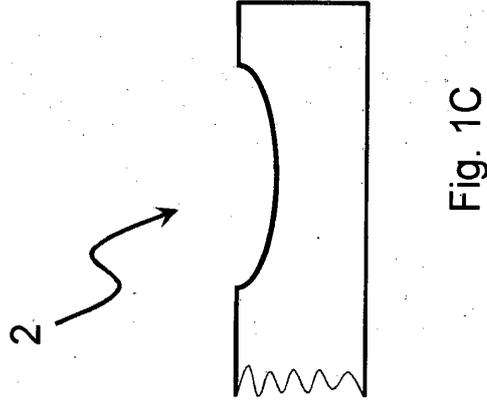
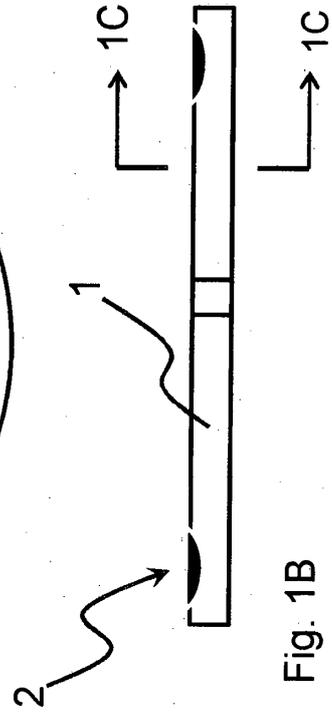
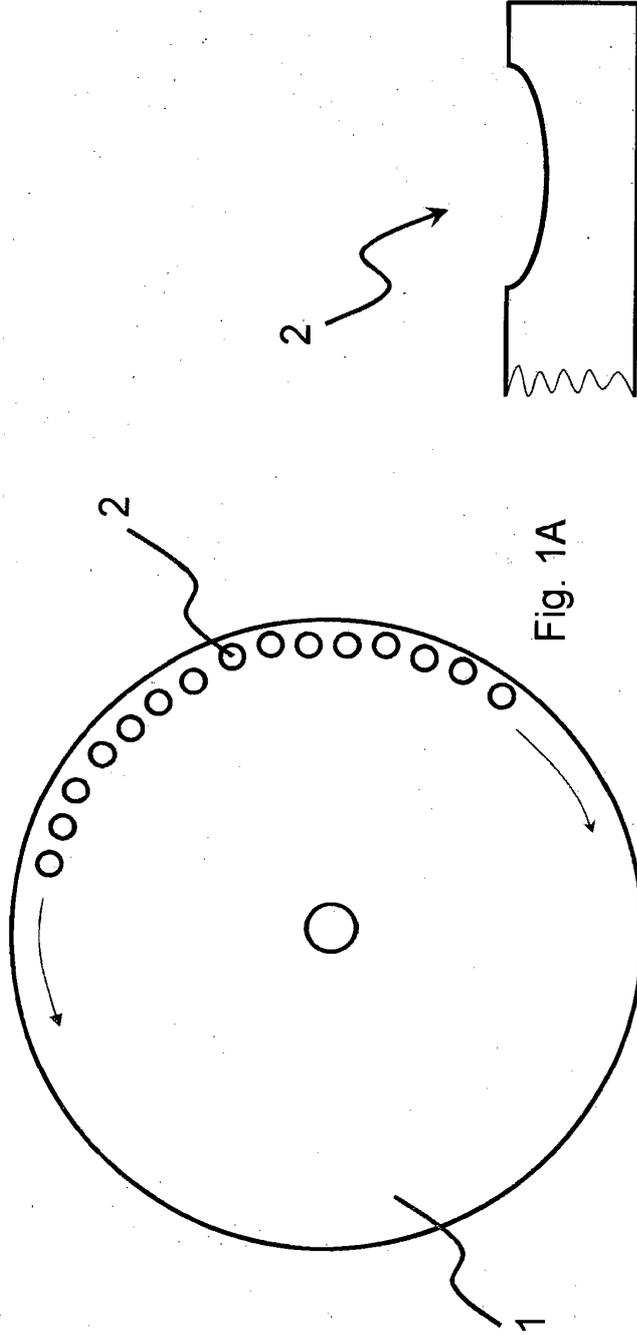
Por lo tanto, con el fin de reducir los efectos de la inhibición de subproductos, y de incrementar la longitud de lectura, la presente invención permite que los componentes de reacción sean extraídos por lavado tras un número de exposiciones de nucleótido, permitiendo que se añada reactivo fresco para que continúe la siguiente sección de la secuencia, mientras se asegura que la plantilla permanece vinculada al soporte.

Aunque la presente invención ha sido ilustrada y descrita con referencia a realizaciones que actualmente se contempla que son el mejor modo, o los mejores modos, de llevar a cabo dicha invención durante la puesta en práctica real, se comprenderá que se pueden realizar diversos cambios en cuanto a la adaptación de la invención a realizaciones diferentes sin apartarse de los conceptos inventivos más amplios divulgados en la presente memoria y abarcados por las reivindicaciones que siguen.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de pirosecuenciación de una molécula de polinucleótido, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 proporcionar una plataforma giratoria que tiene al menos un pocillo abierto para contener al menos una superficie de soporte, estando dicho pocillo abierto configurado o dimensionado de tal modo que un reactivo depositado en el mismo es extraíble por centrifugación desde dicho pocillo abierto y hacia fuera de dicha plataforma mediante rotación suficiente de dicha plataforma;
- 10 proporcionar al menos una superficie de soporte citada en forma de partícula magnética en cada pocillo abierto citado, en donde dicha superficie de soporte está adaptada para inmovilizar una molécula de polinucleótido o tiene inmovilizada sobre la misma una molécula de polinucleótido; si no existe ninguna molécula de polinucleótido ya inmovilizada sobre la misma, inmovilizar una molécula de polinucleótido sobre dicha partícula magnética;
- 15 templar un cebador de oligonucleótido en una cadena simple de dicha molécula de polinucleótido;
- dispensar en cada pocillo abierto citado desde un punto externo de la citada plataforma, una serie de reactivos de pirosecuenciación, en donde después de una o más etapas de dispensación citadas, dicha plataforma se hace girar suficientemente de tal modo que cualquier reactivo citado residual o sin reaccionar sea extraído sustancialmente por
- 20 centrifugación desde cada pocillo abierto citado y hacia fuera de dicha plataforma, en donde durante la rotación, cada partícula magnética citada está sujeta magnéticamente en el interior de cada pocillo citado;
- realizar un ensayo respecto a la presencia de un grupo pirofosfato en cada pocillo citado, comprendiendo dicha etapa de ensayo detectar una señal luminosa en cada pocillo abierto citado; y
- 25 repetir dichas etapas de dispensación y ensayo, secuenciando con ello dicha molécula de polinucleótido.
- 2.- Un método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de posicionar un imán suficientemente cerca de dicha plataforma para sujetar magnéticamente dicha(s) partícula(s) magnética(s) en el interior de dichos pocillos abiertos, durante la rotación de dicha plataforma.
- 30 3.- Un método según la reivindicación 2, en donde dicho imán tiene forma de placa o de anillo, estando además opcionalmente adaptado para calentar dicho(s) pocillo(s) hasta alrededor de 150 °C, calentando con ello dicha(s) partícula(s) magnética(s).
- 35 4.- Un método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de encajar un electroimán para sujetar magnéticamente dicha(s) partícula(s) magnética(s) en el interior de dicho pocillo durante la rotación de dicha plataforma.
- 40 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha plataforma es sustancialmente circular, y alrededor de 2 a 500 pocillos abiertos han sido distribuidos en torno a la periferia de dicha plataforma circular, en donde, opcionalmente, el diámetro de dicha plataforma está comprendido entre alrededor de 50 y 500 mm, y el espesor de dicha plataforma es de alrededor de 1 a 6 mm, o en donde, opcionalmente, dichos pocillos abiertos comprenden un volumen de entre alrededor de 0,5 y 100 µl o la profundidad de un pocillo es de
- 45 alrededor de 0,5 a 5 mm, o dichos pocillos abiertos están dimensionados para contener entre alrededor de 1 y alrededor de 50 partículas magnéticas.
- 6.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha plataforma está formada por material plástico seleccionado en el grupo consistente en policarbonato, poliestireno, poliestireno de alto impacto, polietileno y polipropileno, o está formada a partir de vidrio o de cuarzo.
- 50 7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de polinucleótido es absorbida químicamente o covalentemente o iónicamente, o vinculada por hidrógeno sobre cada partícula magnética citada, o las fuerzas de van der Waals inmovilizan dicha molécula de polinucleótido en cada partícula magnética citada.
- 55 8.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichos reactivos de pirosecuenciación se eligen en el grupo consistente en una o más enzimas, en donde dichas enzimas incluyen con preferencia una o más de entre ADN polimerasa, ATP sulfúrilasa, luciferasa y apirasa, substratos, en donde dichos substratos incluyen con preferencia adenosina 5'fosfosulfato (APS) y/o luciferina, nucleótidos A, T, G y/o C o los respectivos análogos de nucleótido adecuados, reactivos de lavado, y reactivos de enjuagado.
- 60 9.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de hacer girar la plataforma giratoria se realiza a una velocidad de entre alrededor de 400 y alrededor de 1000 rpm para extraer sustancialmente por centrifugación dicho reactivo desde dichos pocillos, y comprendiendo además la etapa de hacer girar la plataforma giratoria a una velocidad de alrededor de 10 a 200 rpm mientras se dispensa dicho reactivo.
- 65

- 10.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de hacer vibrar la plataforma para mezclar por completo entre sí dicho reactivo y dicha(s) partícula(s) magnética(s).
- 5 11.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula de polinucleótido es ADN o ARN o una forma modificada de los mismos.
- 10 12.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula de polinucleótido está biotinilada, y dicha(s) partícula(s) magnética(s) comprende(n) avidina o estreptavidina o un análogo para enlazar la molécula de polinucleótido biotinilada.
- 13.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha dispensación de la serie de reactivos de pirosecuenciación comprende cualquiera de:
- 15 a) añadir cada nucleótido o su análogo por separado y secuencialmente en cualquier orden deseado o predeterminado, o
- b) añadir nucleótidos A+T+G+C o cualquier subconjunto predeterminado o deseado de éstos como mezcla, y repetir opcionalmente la adición una o más veces.
- 20 14.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de polinucleótido es una molécula de polinucleótido de doble cadena y el método comprende además desnaturalizar la molécula de polinucleótido de doble cadena con anterioridad al templado, y en donde dicha desnaturalización comprende opcionalmente calentar dicha molécula de polinucleótido de doble cadena para efectuar desnaturalización, o
- 25 exponer dicha molécula de polinucleótido de doble cadena a pH elevado.
- 15.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de lavar dicho(s) pocillo(s) abierto(s) con un reactivo de lavado y, opcionalmente, un tratamiento enzimático, en donde dicha etapa de lavado ocurre con preferencia después de una o más etapas de dispensación.



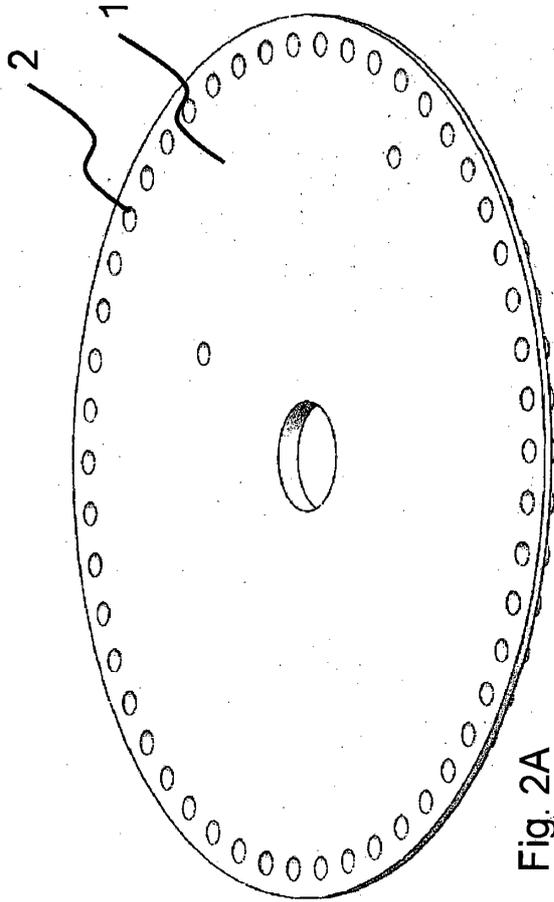


Fig. 2A

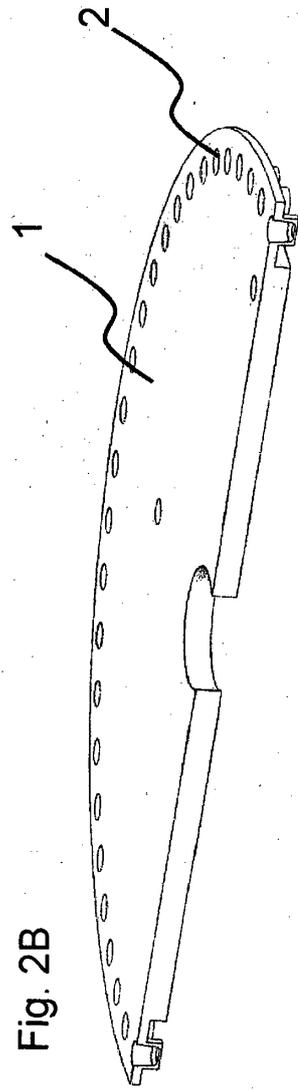


Fig. 2B

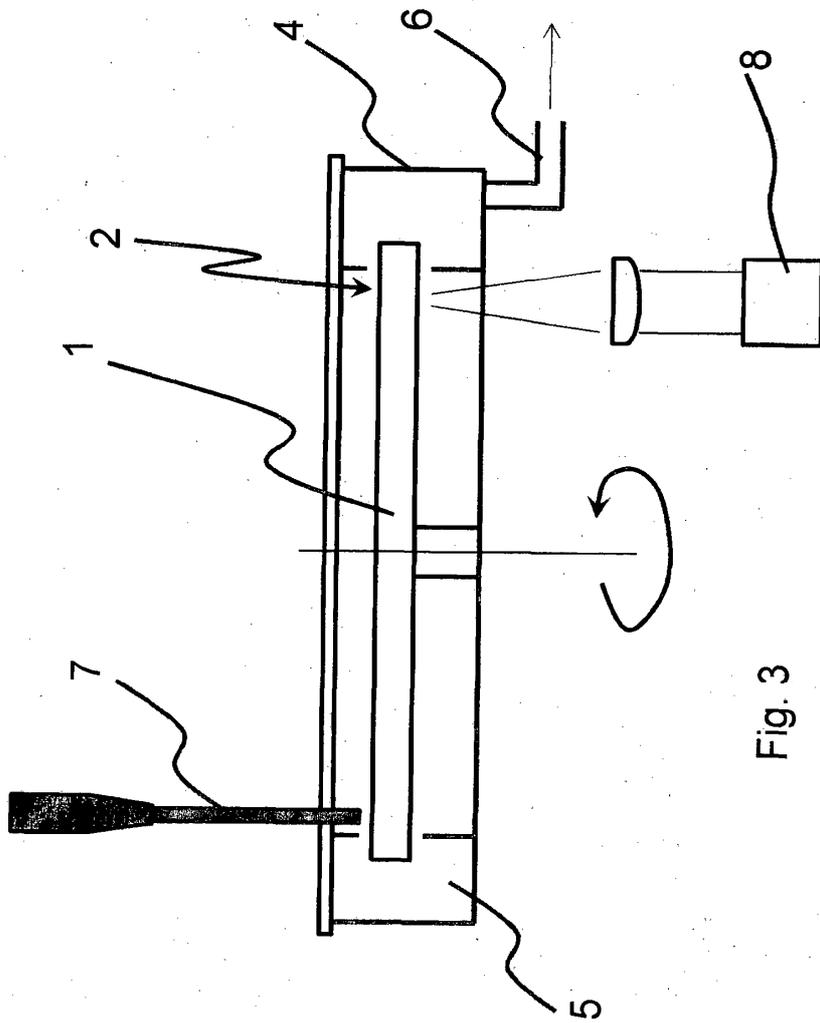


Fig. 3

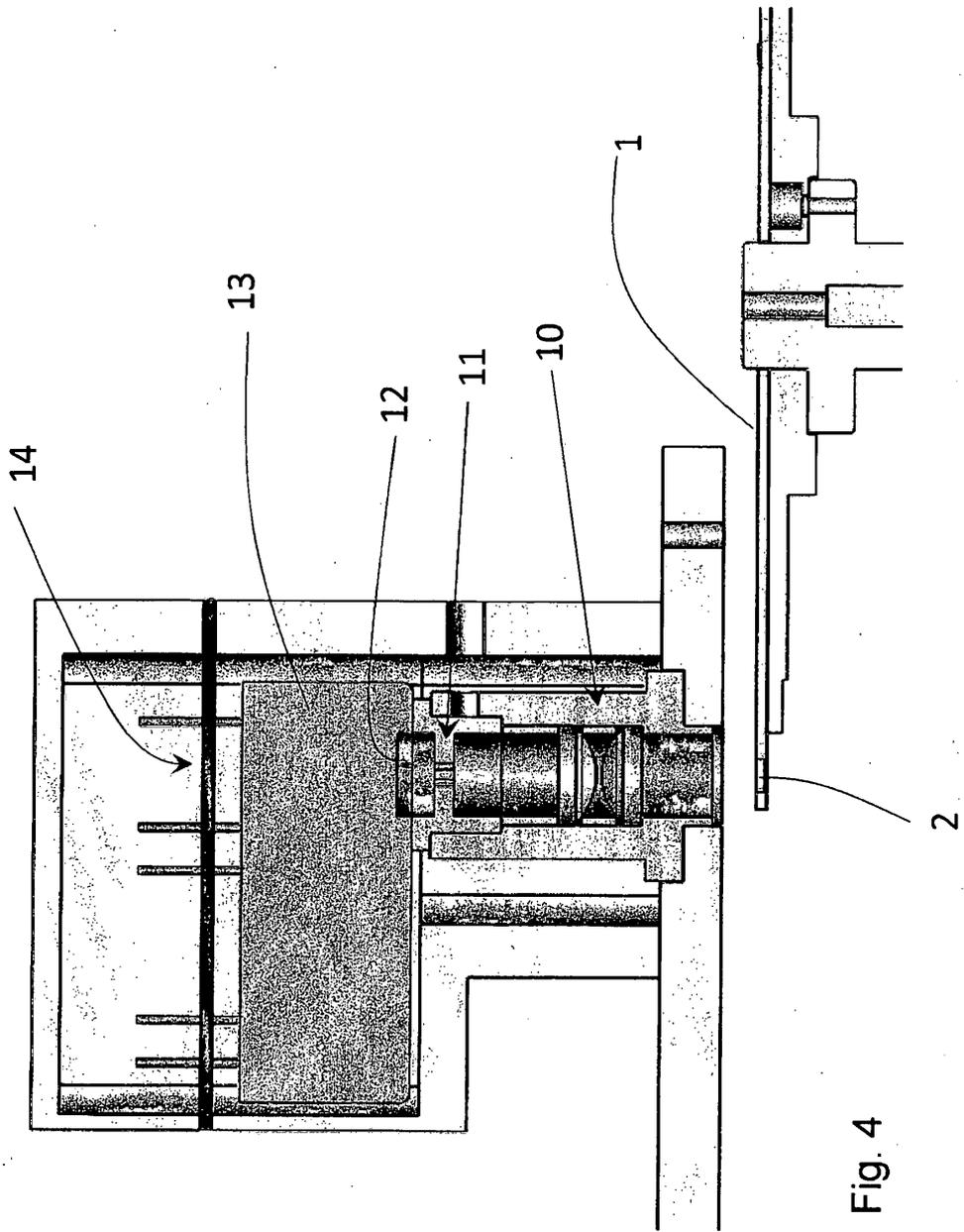


Fig. 4

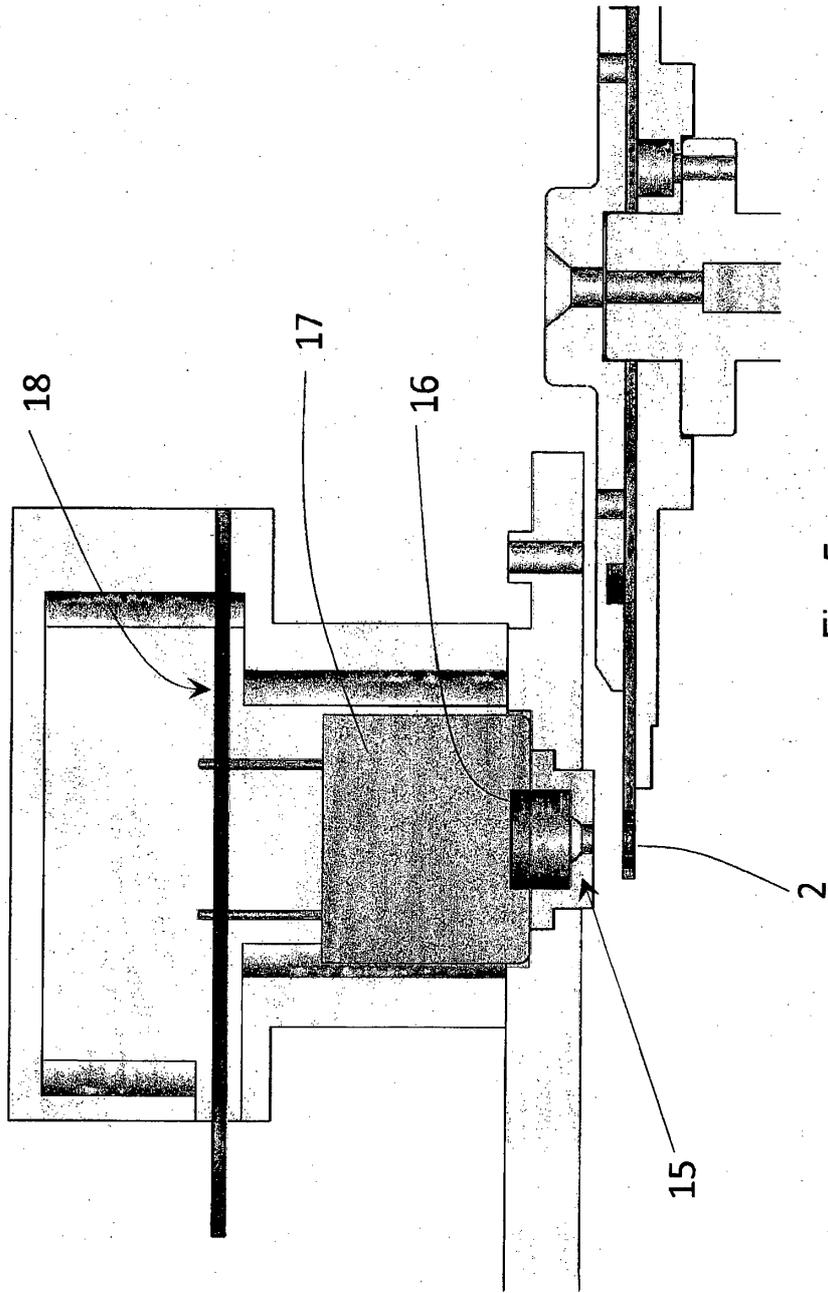


Fig. 5

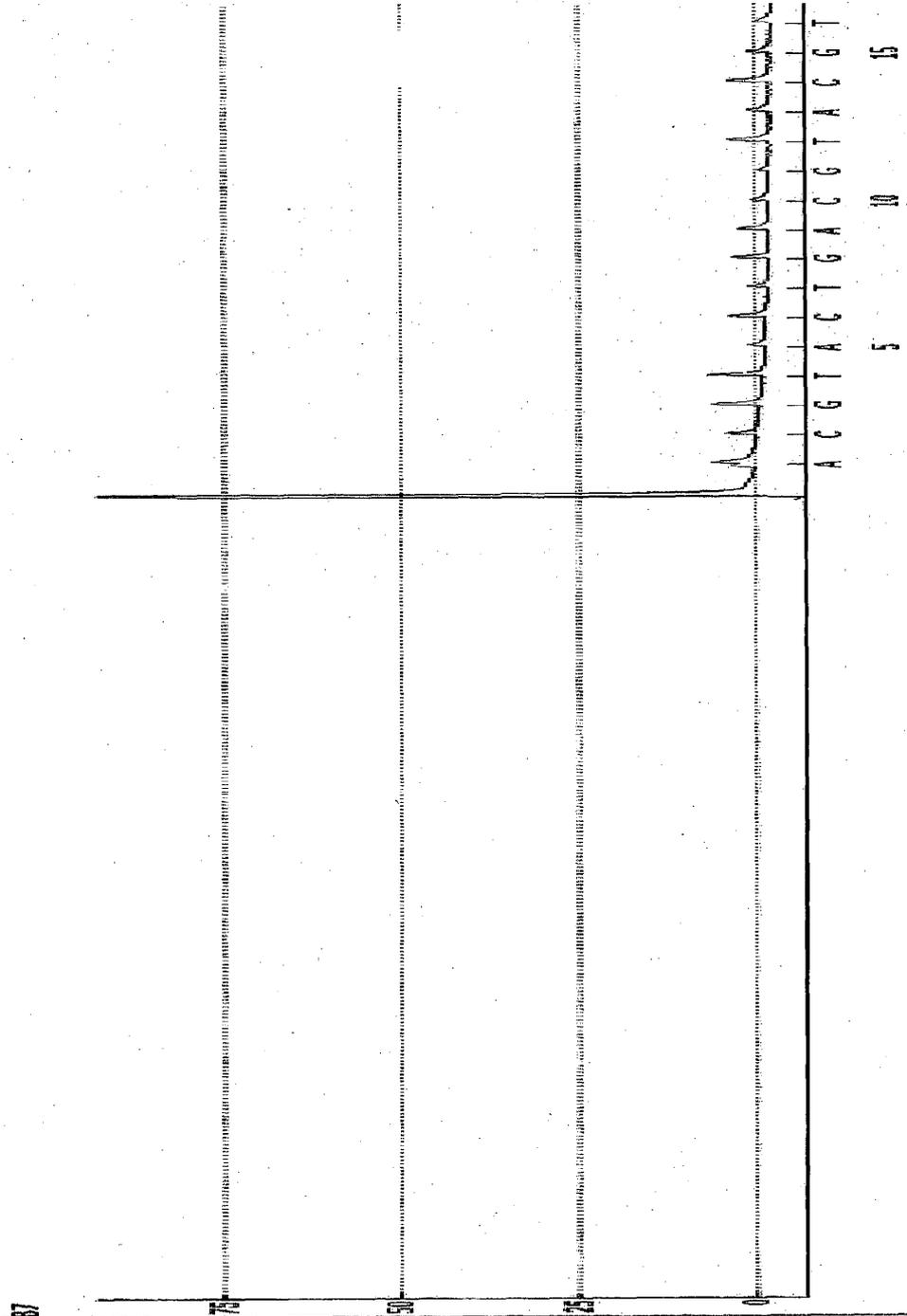


Fig. 8

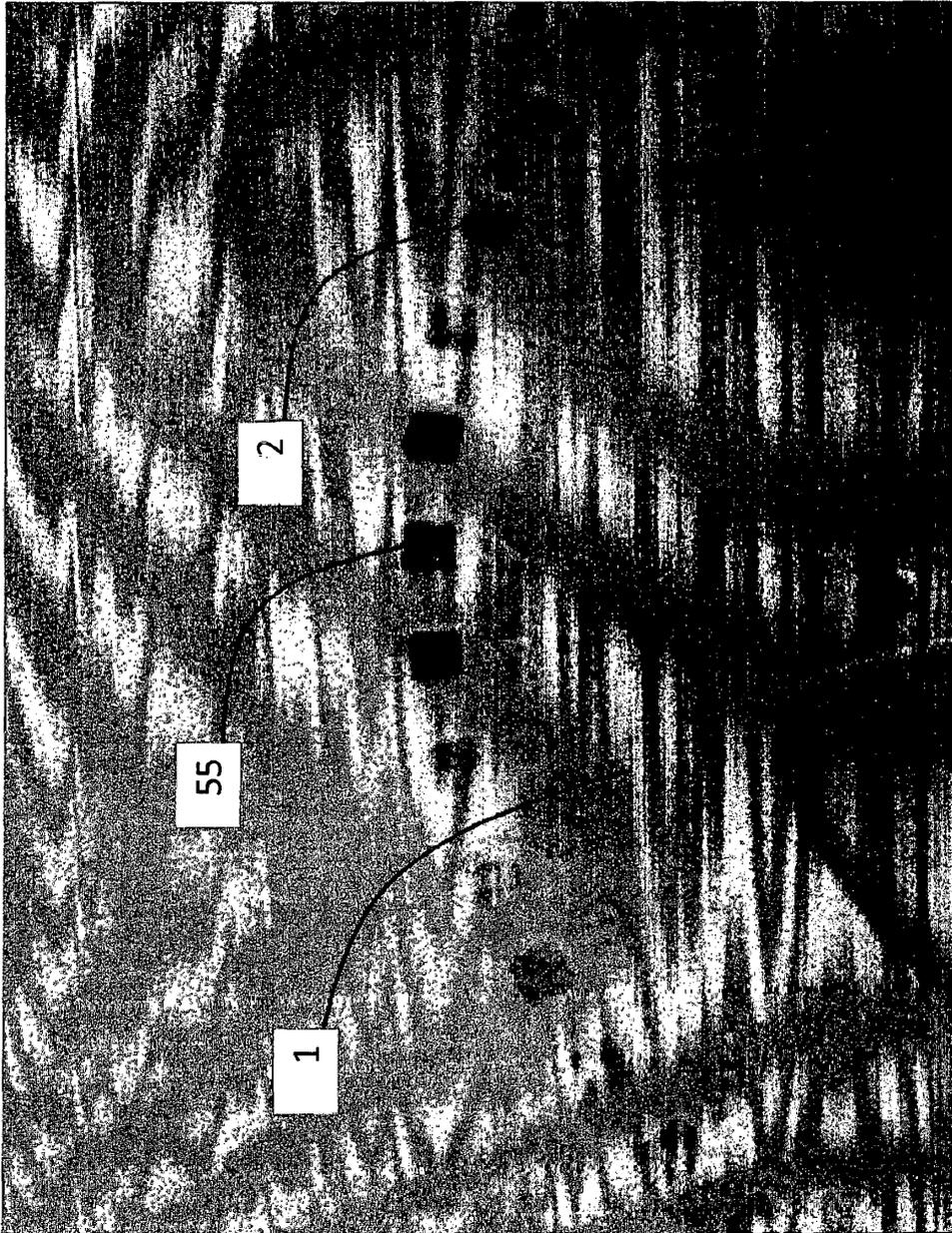


Fig. 10

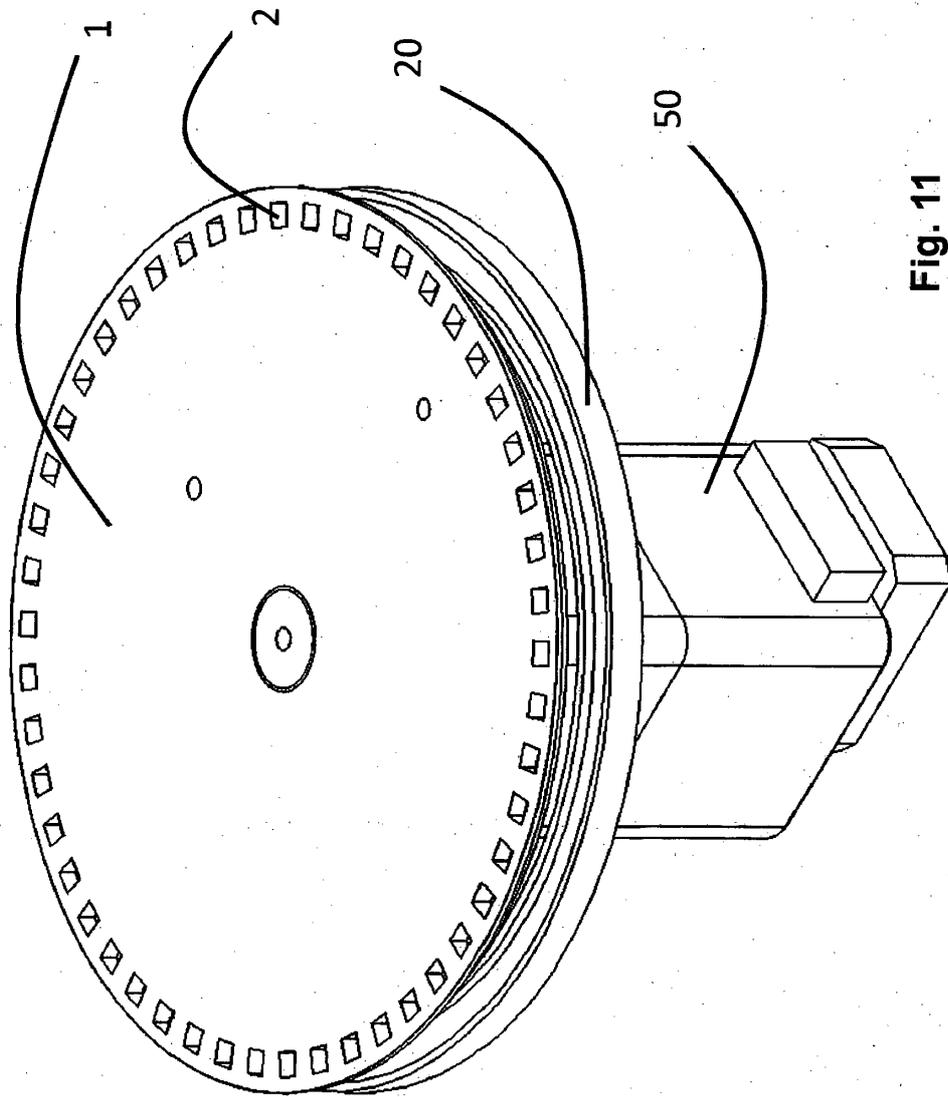


Fig. 11

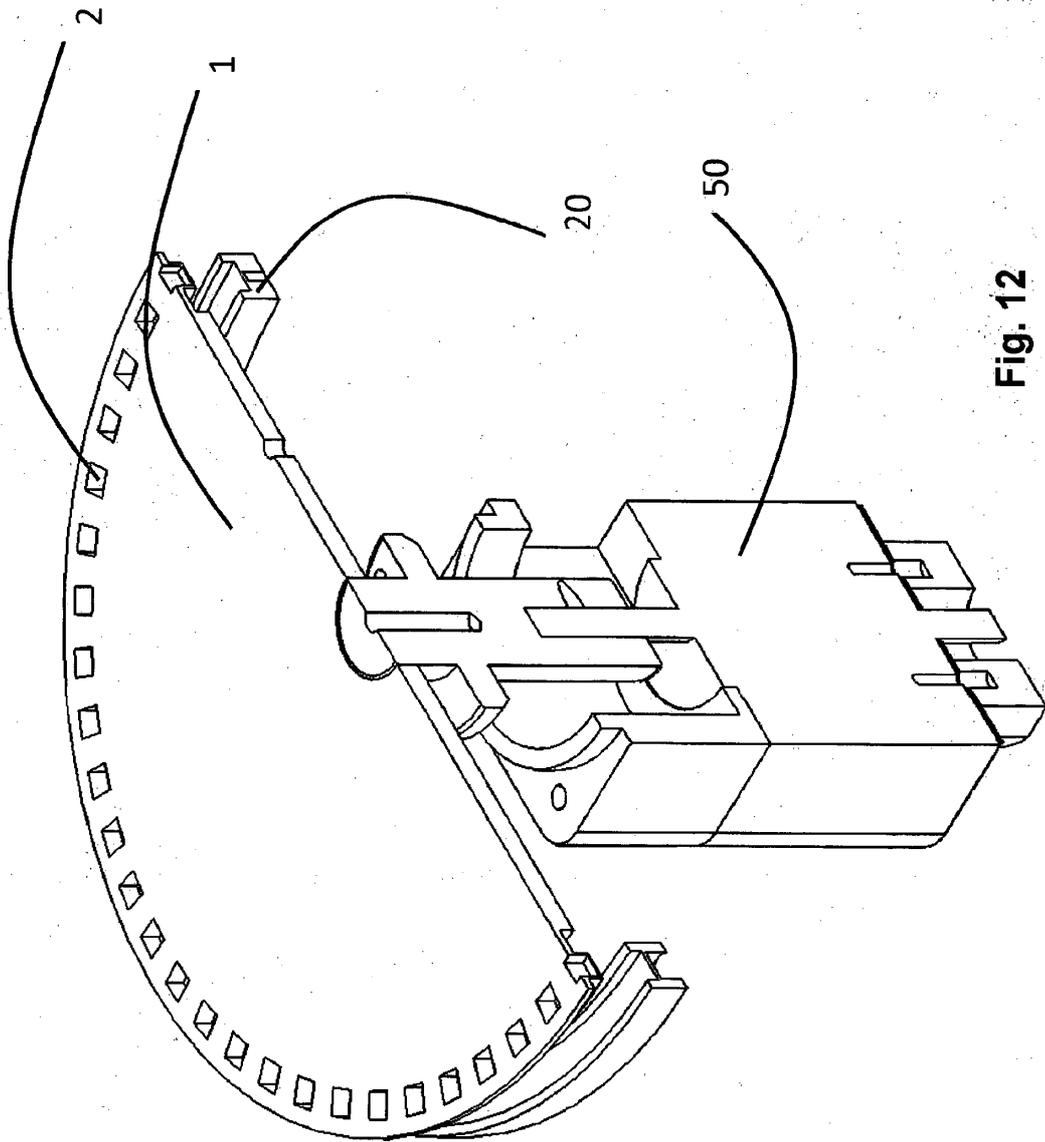


Fig. 12

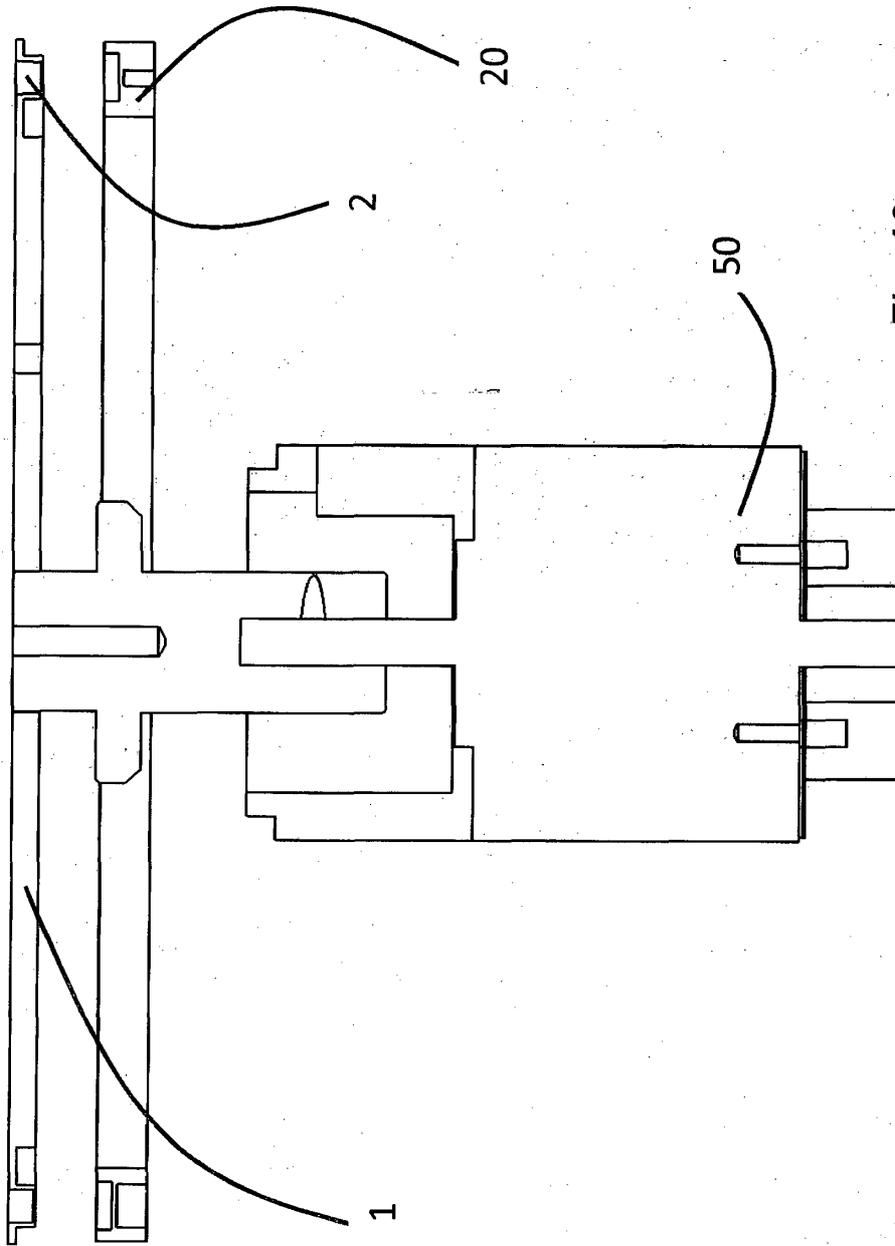


Fig. 13

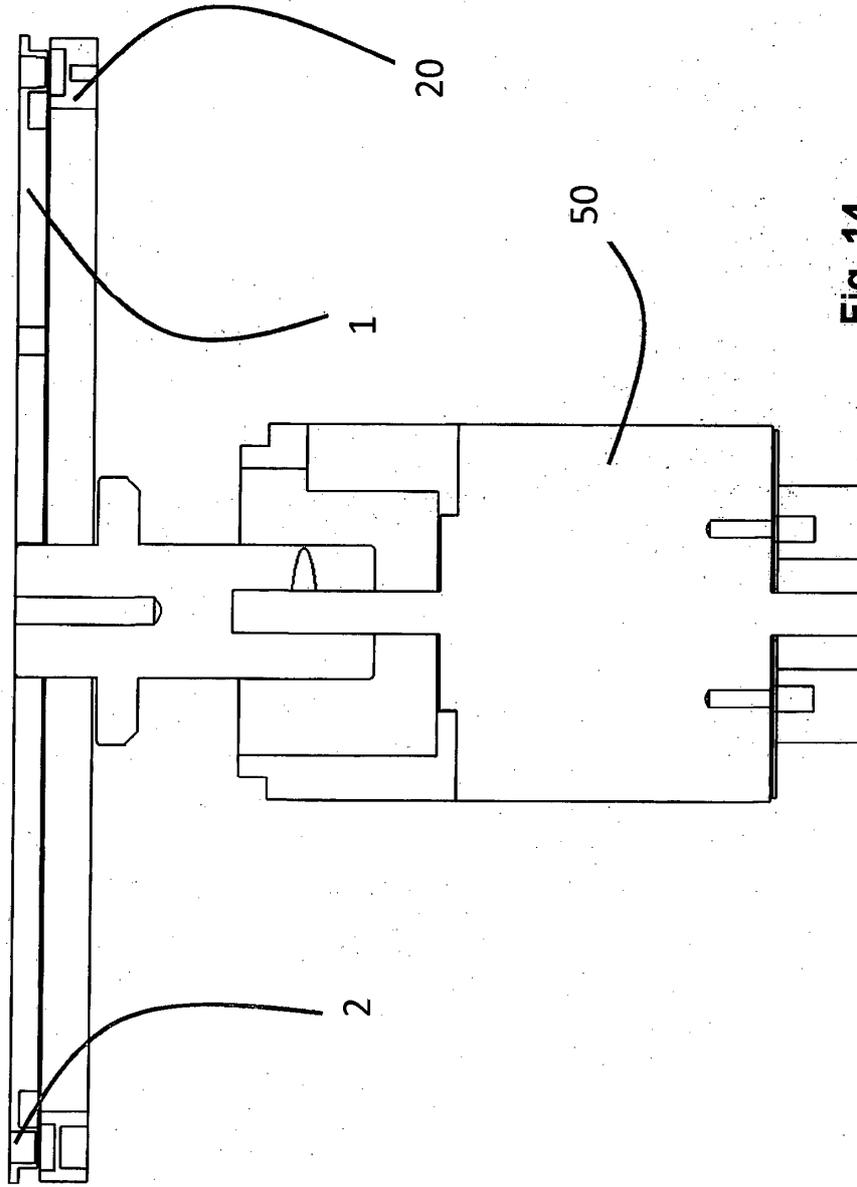


Fig. 14

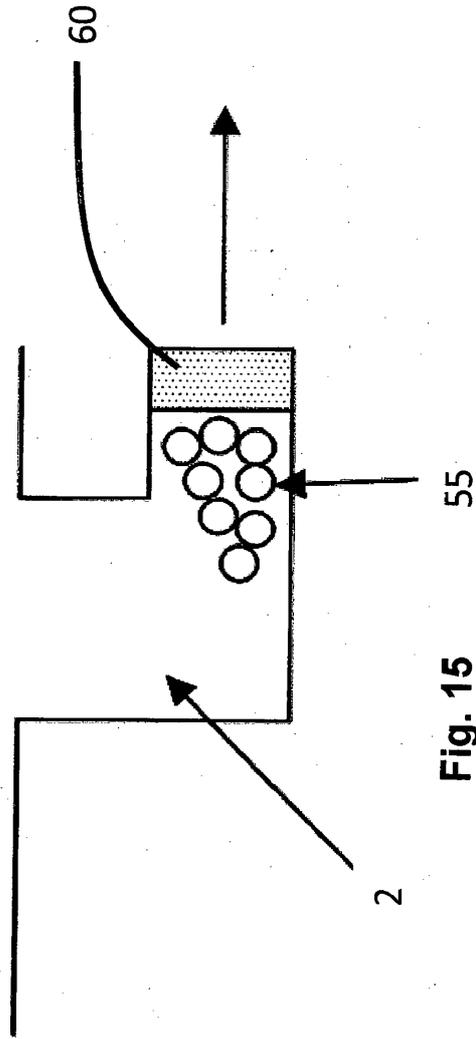


Fig. 15