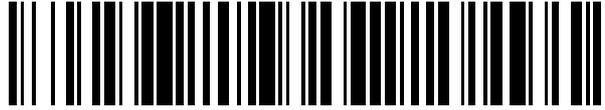


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 428**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2015 PCT/US2015/040296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16010975**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2015 E 15745645 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3169805**

54 Título: **Dispositivo electrónico activado bioquímicamente**

30 Prioridad:

**15.07.2014 US 201462024856 P
27.10.2014 US 201462069198 P
14.05.2015 US 201562161709 P
05.06.2015 US 201562171523 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2019

73 Titular/es:

**ILLUMINA, INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**BOYANOV, BOYAN;
MANDELL, JEFFREY, G.;
BAI, JINGWEI;
GUNDERSON, KEVIN, L.;
CHEN, CHENG-YAO y
PERBOST, MICHEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 697 428 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo electrónico activado bioquímicamente

Antecedentes de la invención

5 Esta descripción se refiere de forma general a la detección mediante biosensores, y más en concreto a los biosensores que se pueden utilizar para la secuenciación de ácidos nucleicos.

10 Las plataformas comerciales que están disponibles en la actualidad para la secuenciación de ADN son relativamente costosas. La mayoría de estas plataformas utilizan una estrategia de «secuenciación basada en la síntesis», así denominada porque los polímeros de ADN se sintetizan al mismo tiempo que se detecta la adición de cada monómero (a saber, nucleótido) a la estructura del polímero en crecimiento. Ya que la hebra que sirve de plantilla en el ADN dirige estrictamente la síntesis de un nuevo polímero de ADN, se puede inferir la secuencia de la plantilla de ADN a partir de la serie de monómeros nucleotídicos que se añadieron a la hebra en crecimiento durante la síntesis. Para el seguimiento de la reacción se utiliza un equipamiento relativamente caro, tal como láseres, óptica de detección y sistemas complejos para la introducción de los fluidos. Las plataformas comerciales más exitosas hasta la fecha también necesitan reactivos y equipamientos caros para amplificar las plantillas de ADN antes incluso de poder comenzar con la secuenciación basada en la síntesis. La complejidad y el coste de estas plataformas ha dificultado su uso en algunos contextos clínicos y de investigación en los que hay una clara necesidad de tecnología de secuenciación de ADN.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos para hacerlas más rentables, rápidas y cómodas. La presente descripción aborda esta necesidad y también da a conocer otras ventajas.

20 En la solicitud de patente internacional WO 2008/076406 A2 se describe un equipo que se puede utilizar para la secuenciación de ADN, en donde el aparato comprende una matriz de sensores fabricados de CMOS en pocillos, en donde los pocillos pueden comprender perlas de relleno.

Breve compendio de la invención

25 La presente invención da a conocer un método para conectar componentes de la reacción a sensores de carga y puede incluir las etapas de (a) aportar un soporte sólido que incluye numerosos sensores de carga, en donde cada uno de los sensores de carga tiene capacidad para conectarse a numerosos componentes de la reacción; (b) aportar un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto, en donde cada uno de los componentes de la reacción del tipo concreto se fija a un resto repelente; y (c) poner en contacto el soporte sólido con el fluido en las condiciones en las que (i) los numerosos componentes de la reacción del tipo concreto están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga, (ii) en el fluido hay un número de componentes de la reacción del tipo concreto mayor que el número de sensores de carga que hay en el soporte sólido; (iii) los componentes de la reacción del fluido se conectan a los sensores de carga; y (iv) el resto repelente fijado a cada uno de los componentes de la reacción impide que más de uno de los componentes de la reacción en los numerosos componentes de reacción se conecten a cada uno de los sensores de carga.

Breve descripción de las figuras

35 En la figura 1 se muestra una polimerasa conectada a un sensor de carga a través de un anclaje.

En la figura 2 se muestran polimerasas conectadas a sensores de carga a través de anclajes de ácido nucleico y fijadas a nucleótidos que se pueden diferenciar en función de la carga o de la proximidad al sensor.

40 En la figura 3 se muestran polimerasas conectadas a sensores de carga a través de anclajes de ácido nucleico y fijadas a nucleótidos que se pueden diferenciar en función de la carga.

En la figura 4 se muestra una polimerasa anclada a un sensor de carga, en donde el sensor de carga también está conectado a numerosos oligonucleótidos capaces de fijarse a los marcadores de los nucleótidos.

En la figura 5 se muestra un marcador nucleotídico que tiene dos oxígenos cargados negativamente en el extremo de un resto oligonucleotídico del marcador.

45 En la figura 6 se muestran las etiquetas con carga que se pueden detectar mediante un sensor de carga.

50 En la figura 7 se muestra el alineamiento de secuencias del fragmento Klenow (Pollxxo) y *Bsu*-LF (*Bsuxxx1*), en donde se han encerrado en cajas la localización del dominio del dedo de la hélice O del fragmento Klenow y la localización alineada en *Bsu*-LF. También se muestra en el inserto de la derecha un modelo que muestra las localizaciones tridimensionales de varios restos del dedo de la hélice O del fragmento Klenow yuxtapuestas con un modelo de un nanotubo.

En la figura 8 se muestra un sensor de carga que tiene una región estrechada y una polimerasa anclada a un sensor de carga en la región estrechada. La polimerasa está formando complejo con la hebra de la plantilla y la hebra

naciente de un ácido nucleico.

En la figura 9 se muestra un diagrama que representa un método para introducir un estrechamiento en el silicio mediante el uso de la oxidación local.

5 En la figura 10 se muestra un sensor de carga que está conectado a una polimerasa (Pol) a través de un anclaje que tiene una secuencia de ácido nucleico (representada de forma genérica como una secuencia de 10 nucleótidos). La polimerasa está formando complejo con un ácido nucleico destinatario y se indican los sitios de fijación para los marcadores asociados a los cuatro nucleótidos diferentes (ATP, GTP, CTP y TTP, respectivamente).

10 En la figura 11 se muestra un sensor de carga que está conectado a una polimerasa (Pol) a través de un anclaje que tiene una secuencia de ácido nucleico (representada de forma genérica como una secuencia de 10 nucleótidos). La polimerasa está formando complejo con un ácido nucleico destinatario y un análogo de CTP marcado. La marcación en el análogo de CTP incluye una región de ácido nucleico que tiene inosinas (I) y una región de especificidad (A'B'C') que se hibrida a una región complementaria del anclaje (ABC).

15 En la figura 12 se muestra una polimerasa anclada en cuatro estados posicionales diferentes con respecto al sensor de carga debido a la fijación de cuatro análogos de nucleótido diferentes. Cada uno de los análogos de nucleótido tiene un resto oligonucleotídico de la misma longitud que los otros 3 análogos de nucleótido, pero cada análogo de nucleótido tiene una secuencia de fijación específica que se fija a una región diferente del anclaje en comparación con las regiones en las que se fijan los otros análogos de nucleótido.

Descripción detallada de la invención

20 En la presente memoria se describen equipo, composiciones y métodos para la detección de una sola molécula útiles para aplicaciones tales como incorporación concreta de nucleótidos que se detectan en los procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos. Existe la necesidad de mejorar los sistemas de detección que den a conocer lecturas largas de secuenciación con muy alto rendimiento. Las realizaciones de la invención presentadas en la presente memoria satisfacen esta necesidad y dan a conocer otras ventajas también.

25 Los esquemas de sensores basados en semiconductores de óxidos metálicos complementarios (CMOS, por su nombre en inglés) se han utilizado para la secuenciación de ácidos nucleicos. Los esquemas de sensores basados en CMOS de hoy día explotan la detección electroquímica de los subproductos de la polimerización del ADN que se producen en una reacción de SBS (p. ej., protones o pirofosfato). Estos métodos proporcionan las ventajas de no necesitar luz ni marcadores. Al no necesitar luz, las reacciones no necesitan una óptica costosa para la detección. El coste y la complejidad de preparar los reactivos se reduce típicamente cuando se utilizan reactivos sin marcar. Sin embargo, las desventajas de los esquemas de sensores basados en CMOS de hoy día son que los subproductos de la reacción, que es lo que hay que detectar, se mueven y tienen la tendencia natural de difundirse desde la zona de la reacción, lo que puede dar lugar a una interferencia con los sitios vecinos cuando se intentan realizar reacciones de secuenciación multiplexadas. Dado el gran tamaño de la mayoría de los genomas y la escasa longitud de las lecturas de las reacciones de secuenciación típicas, la multiplexación es muy importante para conseguir los niveles de cobertura de la tecnología de secuenciación que se desean para la investigación y para las aplicaciones clínicas.

35 En la presente descripción se describe una modalidad de detección única que se puede utilizar para la secuenciación de ácidos nucleicos y para la detección de ácidos nucleicos y otros analitos en general. En la figura 1 se muestra una realización de ejemplo. Brevemente, la polimerasa 1 está inmovilizada en la compuerta 5 de un transistor de efecto campo (FET) con nanocable de silicio 2 con un anclaje 3. Optativamente, el nanocable puede estar hecho de otro material distinto al silicio o el nanocable puede estar remplazado por un nanotubo. Optativamente, el anclaje 3 puede ser una hebra de polímero conductivo, lo que se indica mediante la carga positiva 6 en el extremo del anclaje que está cerca de la polimerasa y la carga negativa 7 en el extremo del anclaje que está más alejado de la polimerasa y que está fijado a la compuerta 5. El ADN monocatenario 4 a secuenciar está fijado a la polimerasa 1 después de haber sido introducido en la solución junto con los nucleótidos y otros reactivos. A medida que se sintetiza la hebra complementaria, se generan perturbaciones en la distribución de cargas en la vecindad del FET 2, bien como un resultado de los cambios conformacionales de la polimerasa 1 o bien debido a la presencia de los nucleótidos, posiblemente modificados con una etiqueta eléctricamente activa en la vecindad del FET 2. Las modificaciones de la distribución de la carga las siente el nanocable-FET 2 y las detecta como una modulación de la corriente de transconductancia del FET.

50 Algunas ventajas del equipo basado en FET y los métodos presentados en la presente memoria son: (1) la sensibilidad a una única molécula se puede conseguir con un FET escalado adecuadamente, (2) se facilita un alto grado de paralelización (también denominado «multiplexabilidad») ya que la distorsión de cargas detectada se localiza en la vecindad de la polimerasa, con lo que se evita la interferencia entre los sitios de FET cercanos, (3) el uso optativo de un anclaje conductivo ayuda a transmitir la distorsión de la carga hacia la compuerta y reduce al mínimo los efectos indeseables del apantallamiento debido a la solución biológica, y (4) se puede fabricar con comodidad el FET con nanocable de silicio mediante procedimientos que son compatibles con la infraestructura para la fabricación de semiconductores.

Se debe entender que los términos utilizados en la presente memoria tienen su significado habitual a menos que se

especifique de otra manera. Más adelante se presentan ejemplos de varios términos utilizados en la presente memoria y sus definiciones.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «matriz» se refiere a una población de sensores de carga o moléculas que están conectadas a uno o varios sustratos en fase sólida, de tal manera que los sensores de carga o las moléculas se pueden diferenciar las unas de las otras según su posición relativa. Una matriz puede incluir diferentes moléculas que se localizan cada una en una posición accesible diferente (p. ej., en diferentes sensores de carga) en un sustrato en fase sólida. Como alternativa, una matriz puede incluir sustratos en fase sólida independientes en los que cada uno lleva una molécula diferente, en donde las diferentes moléculas de sonda se pueden identificar en función de la posición de los sustratos en la fase sólida sobre una superficie a la cual están fijados los sustratos en fase sólida, o según la posición de los sustratos en fase sólida en un líquido, tal como una corriente de fluido. Las moléculas de la matriz pueden ser cebadores de ácido nucleico, sondas de ácido nucleico, plantillas de ácido nucleico o enzimas para ácidos nucleicos, tales como polimerasas y exonucleasas.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «conectado» se refiere al estado de dos cosas que se juntan, atan, adhieren, conectan o fijan la una a la otra. Por ejemplo, un componente de reacción, tal como una polimerasa, puede estar conectado a un componente en fase sólida, tal como un sensor de carga, mediante un enlace covalente o uno no covalente. Un enlace covalente se caracteriza por que los átomos comparten pares de electrones entre ellos. Un enlace no covalente es un enlace químico que no implica la compartición de los pares de electrones y puede incluir, por ejemplo, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófilas e interacciones hidrófobas.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «sensor de carga» pretende significar un dispositivo de detección que traduce las perturbaciones de su superficie, o en el campo eléctrico que lo rodea, en una señal eléctrica. Por ejemplo, un sensor de carga puede traducir la llegada o salida de un componente de la reacción en una señal eléctrica. Un sensor de carga también puede traducir las interacciones entre dos componentes de la reacción, o los cambios conformacionales de un solo componente de reacción, en una señal eléctrica. Un sensor de carga ejemplar es un transistor de efecto campo (FET), tal como un nanotubo de carbono (NTC), un FET con nanotubo de carbono de una sola pared (SWNT, por su nombre en inglés), un FET con nanocable de silicio (SiNW, por su nombre en inglés), un FET de nanocinta de grafeno (y los FET de nanocinta relacionados fabricados de materiales 2D, tales como MoS₂, siliceno, etc.), FET de túnel (TFET) y los dispositivos de pendiente pronunciada por debajo del umbral (véase, por ejemplo, Swaminathan et al., *Proceedings of the 51st Annual Design Automation Conference on Design Automation Conference*, págs. 1-6, ISBN: 978-1-4503-2730-5 (2014) e Ionescu et al., *Nature* 479, 329-337 (2011)). Los ejemplos de sensores de FET y SWNT que se pueden utilizar en los métodos y equipos de la presente descripción se presentan en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2013/0078622 A1.

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «anclaje escindible» pretende significar un conector químico que tiene un enlace que se puede romper selectivamente mediante un tratamiento químico o físico. Por lo general, la rotura del enlace es selectiva con respecto al tratamiento químico o físico, y no tiene ningún efecto adverso significativo sobre los otros componentes de reacción que están presentes. Un anclaje escindible puede ser sensible a la rotura selectiva del enlace con agentes tales como, pero sin limitarse a ellos, luz, base, ácido, calor, enzimas y reactantes químicos. El campo eléctrico y la agitación física también se pueden utilizar para escindir el anclaje. En una realización preferida, el conector es un conector nucleotídico. En algunos casos, el conector comprende un sitio para la escisión mediante una endonucleasa de restricción específica de la secuencia. Sin embargo, los sitios de escisión específicos de la secuencia no necesitan estar presentes en algunos conectores que se utilizan según los métodos presentados en la presente memoria.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «repetición concatenada» pretende significar una cadena de repeticiones en serie de una secuencia de nucleótidos concreta en una única molécula de ácido nucleico. Las repeticiones concatenadas se pueden producir, por ejemplo, mediante la amplificación por círculo rodante (ACR) gracias a la cual la secuencia de nucleótidos repetida es el complemento de la plantilla que se replica mediante la ACR.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «anclaje conductivo» pretende significar un conector químico a través del cual se puede conducir la electricidad o a través del cual se pueden transmitir los efectos de un campo eléctrico. Un anclaje conductivo se puede utilizar para conectar químicamente un componente de la reacción con un sensor de carga y conducir la electricidad entre el componente de la reacción y el sensor de carga. Los anclajes conductivos de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos, los que tienen dopado una estructura de poliotiofeno, poli(3,4-etilendioxitiofeno), poliacetileno, polipirrol, polianilina, polifluoreno, polifenileno, polipireno, poliazuleno, polinaftalenos, policarbazol, poliindol o poliazepina. Los conectores que pueden ser útiles como anclajes conductivos también se presentan en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2010/0073847 A1.

60 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cambio de señal conformacional» significa la aparición, desaparición o alteración de una señal detectable desde una molécula en respuesta a un cambio en la estructura, forma o disposición de las partes de la molécula. Por ejemplo, el cambio de señal se puede deber a un cambio en la interacción de un marcador con una primera parte de la molécula para interactuar con una segunda parte de la

molécula. Con el término, cuando se cita específicamente, se pretenden diferenciar los cambios de la señal que surge desde un marcador de una molécula debido a un cambio en la interacción del marcador con un reactante que se fija específicamente a la molécula o a un cambio de la interacción del marcador con un producto que es resultado de la actividad catalítica de la molécula.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «conformacionalmente marcado», cuando se utiliza en referencia a una molécula, significa que tiene al menos un marcador que responde a un cambio en la estructura de la molécula, un cambio en la forma de la molécula o un cambio en la disposición de las partes de la molécula. La molécula puede ser, por ejemplo, una polimerasa, transcriptasa inversa, exonucleasa u otra enzima de ácido nucleico, tales como las que se presentan más adelante en la presente memoria. Las partes de la molécula pueden ser, por ejemplo, átomos que cambian la localización relativa debido a la rotación de aproximadamente uno o varios enlaces químicos que se encuentran en la estructura molecular entre los átomos. Las partes de la molécula pueden ser dominios de una macromolécula, tales como las que se suelen conocer en la técnica pertinente. Por ejemplo, las polimerasas incluyen dominios que se denominan los dominios de los dedos, de la palma y del pulgar. En el caso de las proteínas, las partes pueden ser regiones de estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. El marcador o marcadores pueden estar conectados a la molécula, por ejemplo, mediante un enlace covalente. No obstante, el marcador o marcadores no necesitan estar conectados a la molécula y pueden estar, por ejemplo, localizados muy cerca de la molécula. En realizaciones concretas, el marcador no está conectado a un reactante ni a un producto de la molécula, tal como un nucleótido o ácido nucleico.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «diferente», cuando se utiliza con referencia a los ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos tienen una secuencia de nucleótidos que no es la misma que la de las demás. Dos o más ácidos nucleicos diferentes pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de toda su longitud. Como alternativa, dos o más ácidos nucleicos diferentes pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de una parte sustancial de su longitud. Por ejemplo, dos o más ácidos nucleicos diferentes pueden tener partes de la secuencia nucleotídica destinataria que son diferentes para las dos o más moléculas, mientras que también tienen una parte de la secuencia universal que es la misma en las dos o más moléculas. El término «diferente» se puede aplicar de igual forma a otras moléculas, tales como las polimerasas y las enzimas para ácidos nucleicos.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «cada», cuando se utiliza con referencia a una colección de elementos, pretende identificar un elemento individual en la colección, pero no hace referencia necesariamente a cada elemento de la colección. Se pueden producir excepciones si la descripción o el contexto lo dictaminan explícitamente y con claridad de otra manera.

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «comunicación fluidica», cuando se utiliza con referencia a una molécula en un fluido y a un sitio en contacto con el fluido, hace referencia a la capacidad que tiene la molécula para moverse en o por el fluido que ha de entrar en contacto o introducirse en el sitio. El término también se puede referir a la capacidad que tiene la molécula para separarse del sitio o salir de él para pasar a la solución. La comunicación fluidica se puede producir cuando no hay barreras que impidan que la molécula entre en el sitio, se ponga en contacto con el sitio, se separe del sitio y/o se salga del sitio. Sin embargo, se entiende que existe una comunicación fluidica incluso si se retrasa, reduce o altera la difusión, siempre que el acceso no esté absolutamente impedido.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «marcador», cuando se utiliza en referencia a un componente de la reacción, pretende significar un componente de la reacción que se puede detectar o un resto de un componente de la reacción que se puede detectar. Un marcador útil es un marcador con carga (también denominado etiqueta cargada o etiqueta con carga) que se puede detectar mediante un sensor de carga. Un marcador puede ser intrínseco a un componente de la reacción que se ha de detectar (p. ej., un aminoácido cargado de una polimerasa) o el marcador puede ser extrínseco al componente de la reacción (p. ej., una modificación de un aminoácido que no se produce de manera natural). En algunas realizaciones, un marcador puede incluir numerosos restos que tienen funciones independientes. Por ejemplo, un marcador puede incluir un componente conector (tal como un ácido nucleico) y un componente para etiquetar con carga.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «no natural», cuando se utiliza en referencia a un resto de una molécula, pretende hacer referencia a un resto que no se encuentra conectado a la molécula en su medio natural o en un sistema biológico sin alterar por una intervención técnica humana. Típicamente, los restos no naturales son modificaciones sintéticas de moléculas que hacen que las moléculas sean diferentes desde el punto de vista estructural o químico con respecto a la molécula sin modificar o a las moléculas que tienen modificaciones naturales. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «no natural», cuando se utiliza con referencia a un análogo utilizado para un procedimiento, pretende significar un análogo que no se encuentra en el medio natural donde tiene lugar el procedimiento. Típicamente, los análogos no naturales son análogos sintéticos que son diferentes desde el punto de vista estructural o químico a los otros tipos de moléculas de la clase al cual pertenece el análogo.

60 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «ácido nucleico» pretende ser coherente con su uso en la técnica e incluye ácidos nucleicos que se producen de manera natural o análogos funcionales de los mismos. Los

análogos funcionales particularmente útiles son capaces de hibridarse a un ácido nucleico de una forma específica de la secuencia, o permiten que se les use como una plantilla para replicar una secuencia de nucleótidos concreta. Los ácidos nucleicos que se producen de manera natural tienen por lo general un esqueleto que contiene enlaces fosfodiéster. Una estructura de análogo puede tener una conexión alternativa al esqueleto que incluye cualquiera de los distintos conocidos en la técnica, tales como el ácido peptidonucleico (PNA, por su nombre en inglés) o el ácido nucleico bloqueado (LNA, por su nombre en inglés). Los ácidos nucleicos que se producen en la naturaleza suelen tener un azúcar de desoxirribosa (p. ej., el encontrado en el ácido desoxirribonucleico (ADN)) o un azúcar de ribosa (p. ej., el encontrado en el ácido ribonucleico (ARN)).

Un ácido nucleico puede contener cualquiera de una multitud de análogos de estos restos de azúcar que se conocen en la técnica. Un ácido nucleico puede incluir bases nativas o no nativas. En este sentido, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o varias bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina, timina, citosina o guanina, y un ácido ribonucleico puede tener una o varias bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo, adenina, citosina o guanina. Se conocen en la técnica las bases no nativas útiles que se pueden incluir en un ácido nucleico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «nucleótido» pretende incluir nucleótidos naturales, análogos de los mismos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, didesoxirribonucleótidos y otras moléculas conocidas como nucleótidos. El término se puede utilizar para hacer referencia a una unidad monomérica que está presente en un polímero, por ejemplo, para identificar una subunidad presente en una hebra de ADN o ARN. El término también puede utilizarse para hacer referencia a una molécula que no está necesariamente presente en un polímero, por ejemplo, una molécula que es capaz de incorporarse, gracias a una polimerasa, en un polinucleótido de una manera dependiente de la plantilla. El término puede hacer referencia a una unidad nucleosídica que tiene, por ejemplo, 0, 1, 2, 3 o más fosfatos en el carbono en 5'. Por ejemplo, los tetrafosfonucleótidos y los pentafosfonucleótidos pueden ser particularmente útiles. Los nucleótidos naturales de ejemplo incluyen, sin limitación, ATP, UTP, CTP, GTP, ADP, UDP, CDP, GDP, AMP, UMP, CMP, GMP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dADP, dTDP, dCDP, dGDP, dAMP, dTMP, dCMP y dGMP.

Los nucleótidos no naturales también se denominan en la presente memoria análogos de nucleótido, que incluyen los que no están presentes en un sistema biológico natural o que no se incorporan sustancialmente en los polinucleótidos mediante una polimerasa en su medio natural, por ejemplo, en una célula no recombinante que expresa la polimerasa. Los nucleótidos no naturales particularmente útiles incluyen los que se incorporan en una hebra polinucleotídica mediante una polimerasa a una velocidad que es sustancialmente más rápida o más lenta que la velocidad a la cual se incorpora en la hebra otro nucleótido, tal como un nucleótido natural cuya base se aparea con la misma base complementaria de Watson y Crick, mediante la polimerasa. Por ejemplo, un nucleótido no natural se puede incorporar a una velocidad que es al menos 2 veces diferente, 5 veces diferente, 10 veces diferente, 25 veces diferente, 50 veces diferente, 100 veces diferente, 1.000 veces diferente, 10.000 veces diferente o más cuando se compara con la velocidad de incorporación de un nucleótido natural. Un nucleótido no natural puede ser capaz de extenderse adicionalmente después de incorporarse en un polinucleótido. Los ejemplos incluyen análogos de nucleótido que tienen un hidroxilo en 3' o análogos de nucleótido que tienen un resto terminador reversible en la posición en 3' que se puede retirar para permitir la extensión adicional de un polinucleótido que ha incorporado el análogo de nucleótido. Los ejemplos de restos terminadores reversibles que se pueden utilizar se describen, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.427.673; 7.414.116 y 7.057.026 y las solicitudes de patente internacional en virtud del PCT WO 91/066678 y WO 07/123744. Se entenderá que, en algunas realizaciones, un análogo de nucleótido que tienen un resto terminador en 3' o que carece de un hidroxilo en 3' (tal como un análogo didesoxinucleotídico) se puede utilizar en las condiciones en las que el polinucleótido que ha incorporado el análogo de nucleótido ya no se extiende más. En algunas realizaciones, el nucleótido o nucleótidos no incluirán un resto terminador reversible, o el nucleótido o nucleótidos no incluirán ningún resto terminador en absoluto. Son también útiles los análogos de nucleótido con modificaciones en la posición 5'.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «resto protector» pretende que signifique un compuesto o porción del mismo que está conectado a un componente de la reacción para impedir que el componente de la reacción sufra ningún tipo de reacción concreta. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede estar fijada a una enzima para ácido nucleico de tal manera que la molécula de ácido nucleico impide que se degrade la enzima para ácido nucleico o se quede modificada por un tratamiento que, si no, provocaría la degradación o modificación de la enzima. Un anticuerpo también puede servir para fijarse a un componente de la reacción y proteger así al componente de la reacción frente a la degradación, inactivación u otra reacción.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «componente de la reacción» se pretende que signifique una molécula que participa en una reacción. Los ejemplos incluyen reactantes que se consumen en una reacción, productos que se crean en una reacción, catalizadores, tales como las enzimas, que facilitan una reacción, solventes, sales, tampones y otras moléculas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «resto repelente» se pretende que signifique una molécula o parte de la misma que ocupará un espacio para impedir o inhibir la ocupación de otra molécula en el espacio o para inhibir la yuxtaposición de otra molécula cerca del espacio. Un resto repelente puede actuar mediante la exclusión

estérica, repulsión de la carga, repulsión hidrófoba-hidrófila, u otras fuerzas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «resto terminador», cuando se utiliza en referencia a un nucleótido, significa una parte del nucleótido que inhibe o impide que el nucleótido forme un enlace covalente con un segundo nucleótido. Por ejemplo, en el caso de los nucleótidos que tienen un resto de pentosa, un resto terminador puede impedir la formación de un enlace fosfodiéster entre el oxígeno en 3' del nucleótido y el fosfato en 5' del segundo nucleótido. El resto terminador puede ser parte de un nucleótido que es una unidad monomérica presente en un polímero de ácido nucleico o el resto terminador puede ser parte de un nucleótido libre (p. ej., un nucleótido trifosfato). El resto terminador que es parte de un nucleótido puede ser reversible, de tal manera que el resto terminador se puede modificar para devolverle al nucleótido su capacidad para formar un enlace covalente con un segundo nucleótido. En realizaciones concretas, un resto terminador, tal como un resto terminador reversible, puede estar conectado en la posición 3' o en la posición 2' de un resto de pentosa de un análogo de nucleótido.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «soporte sólido» se refiere a un sustrato rígido que es insoluble en líquidos acuosos. El sustrato puede ser poroso o no poroso. El sustrato puede optativamente ser capaz de captar un líquido (p. ej., debido a la porosidad), pero lo típico es que sea suficientemente rígido de tal manera que el sustrato no se empape sustancialmente cuando tome el líquido y no se contraiga sustancialmente cuando el líquido se retira al secarlo. Un soporte sólido no poroso suele ser impermeable a los líquidos o a los gases. Los soportes sólidos de ejemplo incluyen, pero sin limitarse a ellos, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (entre ellos, acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno, y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, TeflonTM, olefinas cíclicas, poliimididas, etc.), nilón, cerámica, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice, entre ellos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, haces de fibras ópticas y polímeros. Los soportes sólidos particularmente útiles para algunas realizaciones se localizan dentro de un equipo de celdas de flujo. Las celdas de flujo de ejemplo se presentan con más detalle más adelante.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «tipo» (o «especie») se utiliza para identificar las moléculas que comparten la misma estructura química. Por ejemplo, una mezcla de nucleótidos puede incluir varias moléculas de dCTP. Las moléculas de dCTP se ha de saber que todas ellas son del mismo tipo o especie. De igual forma, cada una de las moléculas de ADN que tienen la misma secuencia de nucleótidos son del mismo tipo o especie.

Las realizaciones presentadas a continuación y recogidas en las reivindicaciones se pueden conocer una vez vistas las definiciones de más arriba.

La presente descripción describe equipo, composiciones y métodos útiles para la detección de una sola molécula en aplicaciones tales como la detección de la incorporación de nucleótidos en los procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos. El equipo, las composiciones y los métodos presentados en la presente memoria son particularmente útiles, por ejemplo, en las reacciones de secuenciación de una sola molécula de ácido nucleico, tal como la secuenciación basada en la síntesis. Sin embargo, se apreciará que el aparato, las composiciones y los métodos presentados en la presente memoria se pueden utilizar para cualquier otro esquema de detección idóneo, que incluye, pero sin limitarse a ello, la detección de una sola molécula.

En la presente memoria se describe un primer método de secuenciación de ácidos nucleicos. El método puede incluir las etapas de (a) aportar una polimerasa anclada a un sensor de carga en soporte sólido; (b) aportar uno o varios nucleótidos marcados, en donde la presencia del marcador puede ser detectada por el sensor de carga cuando el marcador está cerca del sensor de carga; y (c) detectar la incorporación del nucleótido marcado en una hebra naciente complementaria a un ácido nucleico de plantilla.

La polimerasa utilizada en el primer método de la secuenciación de ácidos nucleicos puede estar anclada al sensor de carga en soporte sólido con un anclaje que comprende ácido nucleico. Por ejemplo, el anclaje puede comprender ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o ácido peptidonucleico (PNA, por su nombre en inglés).

En algunas realizaciones del primer método de la secuenciación de ácidos nucleicos, el nucleótido marcado está marcado en el fosfato en la posición y del nucleótido. El marcador puede comprender un oligonucleótido y, optativamente, el oligonucleótido es capaz de hibridarse a un ácido nucleico inmovilizado.

Además, optativamente, el ácido nucleico inmovilizado que se utiliza en el primer método de secuenciación de ácidos nucleicos es parte de un anclaje, en donde el anclaje inmoviliza una polimerasa al sensor de carga en el soporte sólido.

En algunas configuraciones del primer método de secuenciación de ácidos nucleicos, la polimerasa se mantiene en una cercanía de menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nm del sensor de carga.

En algunas realizaciones del primer método de secuenciación de ácidos nucleicos, el marcador se escinde del nucleótido después de la incorporación, por ejemplo, mediante la polimerasa.

Optativamente en el primer método de secuenciación de ácidos nucleicos, uno o varios nucleótidos marcados comprenden numerosas etiquetas con carga. Por ejemplo, uno o varios nucleótidos marcados pueden comprender una sola etiqueta cargada para cada uno de los cuatro tipos de nucleótidos. La etiqueta cargada puede ser una

etiqueta con carga negativa, por ejemplo, que comprende uno o varios de: un grupo fosfato, DMT y/o FMOC. Como alternativa, la etiqueta cargada puede ser un etiqueta con carga positiva, que optativamente comprende una amina primaria.

5 El uno o varios nucleótidos marcados en el primer método de secuenciación de ácidos nucleicos puede comprender numerosos oligonucleótidos diferentes (a saber, restos oligonucleotídicos) capaces de hibridarse a numerosas secuencias de anclaje inmovilizadas. Como alternativa, o además, numerosos oligonucleótidos diferentes pueden ser capaces de hibridarse en muchas posiciones diferentes dentro de un anclaje concreto utilizado para inmovilizar una polimerasa.

10 En algunas realizaciones del primer método de la secuenciación de ácidos nucleicos, el uno o varios nucleótidos marcados comprenden 4 etiquetas cargadas diferentes y cada uno de dichos nucleótidos marcados comprende un oligonucleótido capaz de hibridarse a la misma secuencia de anclaje inmovilizada.

15 En algunas realizaciones del primer método de secuenciación de ácidos nucleicos, el anclaje de la polimerasa y las marcaciones en los nucleótidos marcados contienen desoxirribonucleótidos que se fijan el uno al otro de manera complementaria, ribonucleótidos que se fijan el uno al otro de manera complementaria, o desoxirribonucleótidos que se fijan a los ribonucleótidos de manera complementaria. Por ejemplo, el anclaje de la polimerasa y los marcadores de los nucleótidos marcados pueden formar una doble cadena ADN:ADN, una doble cadena ARN:ARN o una doble cadena heteromérica ADN:ARN. Los desoxirribonucleótidos o los ribonucleótidos pueden ser análogos de nucleótido que incrementan o modifican la estabilidad de la doble cadena. Por ejemplo, se pueden utilizar ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-O-Me) o 2'-fluoro (2'-F). Las modificaciones del ARN con 2'-O-me y 2'-F se sabe que incrementan la temperatura de fusión de las dobles cadenas ARN:ARN de 0,5 °C a 1 °C por par de bases, pero solo dan lugar a pequeños cambios en la estabilidad del ARN:ADN (Majlessi et al., *Nucleic Acids Res.* 26: 2224-9 (1998)). El incremento de la estabilidad de los pares de bases del ARN:ARN modificado se puede utilizar para colocar de manera exacta la etiqueta junto con el anclaje de ARN, tal y como se debate más abajo.

25 Además, el sensor de carga puede estar funcionalizado con oligonucleótidos de captura y el nucleótido marcado puede comprender un marcador oligonucleotídico que se hibrida a uno o varios de los oligonucleótidos de captura en el primer método de secuenciación de ácidos nucleicos.

El sensor de carga utilizado en el primer método de secuenciación de ácidos nucleicos puede comprender un FET con nanocable. Optativamente, el sensor de carga comprende un nanotubo de carbono.

30 El sensor de carga del primer método de secuenciación de ácidos nucleicos puede ser parte de una matriz de sensores de carga.

La etapa de detección del primer método de secuenciación de ácidos nucleicos puede comprender la detección de numerosas incorporaciones en sucesión.

35 Los métodos y el equipo presentados en la presente memoria pueden dar a conocer lecturas de secuenciación de ácidos nucleicos largos; lecturas rápidas; capacidad de secuenciación con gran rendimiento; y una plataforma escalable para la secuenciación. En algunas realizaciones, cualquier compromiso en la exactitud de una única lectura se puede mitigar mediante la realización varias lecturas solapantes debido a la capacidad que tienen los métodos y el equipo presentados en la presente memoria para ofrecer un gran rendimiento en el número de lecturas realizadas en paralelo.

40 En la figura 1 se muestra un sensor de ejemplo. Aquí, una polimerasa 1 crea un sitio de reacción donde los nucleótidos se pueden incorporar en una plantilla 4 de ADN cebado. La polimerasa 1 está conectada a un FET 2 con nanocable mediante un anclaje 3. El equipo ofrece sensibilidad para una sola molécula. Los cambios en la distribución de la carga en el sitio de reacción (p. ej., cambios de conformación de la polimerasa, incorporación de nucleótidos, llegada o salida de etiquetas cargadas, cambios en la distancia de la polimerasa al sensor de carga, etc.) se transmiten a la compuerta y se pueden detectar.

45 En realizaciones concretas, un equipo o método de la presente descripción utiliza transistores FinFET profundamente escalados como sensores de carga para una única molécula. Los sensores FinFet se benefician de la tecnología ya en desarrollo por los fabricantes líderes de semiconductores. Además, se pueden utilizar los componentes publicados con anterioridad, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, (1) los utilizados para la inmovilización de la lisozima sobre el NTC para observar la procesividad de la enzima en tiempo real, tal y como se describe en Choi et al., *Science*, 335, 319 (2012), (2) los utilizados para inmovilizar el fragmento Klenow de la Pol I sobre el NTC y observar la procesividad del ADN en tiempo real, tal y como se describe en Olsen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 135, 7885 (2013), (3) los utilizados para descifrar un mecanismo de transducción a medida que se mueven los restos cargados debido al movimiento alostérico de la proteína, tal y como se describe en Chi et al., *NanoLett* 13, 625 (2013). Los métodos actuales también pueden utilizar el equipo, los componentes del equipo y los métodos presentados en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2013/0078622 A1.

El equipo y los métodos presentados en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2013/0078622 A1 da a conocer una longitud de apantallamiento de Debye de 1 a 2 nm en NaCl a 50-100 mM. En este equipo, el

movimiento alostérico debe darse cerca del punto de conexión de la polimerasa al transistor. De igual forma, el movimiento alostérico debe ser dependiente de la base para permitir la discriminación en tiempo real de los diferentes tipos de nucleótidos. Tal resolución no se ha demostrado con anterioridad.

5 Una realización que se puede utilizar para superar las limitaciones de algunos equipos que utilizan la detección alostérica se representa en un diagrama en la figura 2. Aquí, la polimerasa se puede inmovilizar en un sensor de carga, tal como un nanotubo de carbono con una sola pared, nanocable de silicio o FinFET. La inmovilización puede ser mediante anclajes que incluyen ADN, ARN, PNA o análogos de los mismos. Por comodidad para la demostración, el diagrama muestra cuatro polimerasas ancladas al sensor de carga, en donde cada polimerasa también está fijada a un tipo de nucleótido diferente marcado en el fosfato de la posición γ . Tal y como se muestra, 10 los nucleótidos tienen un resto oligonucleotídico conectado al fosfato en γ . Un nucleótido marcado en β o γ con fosfato que se empareja adecuadamente a una hebra plantilla de un ácido nucleico destinatario se mantendrá en el sitio mediante una polimerasa, que también está fijada a la plantilla, un tiempo suficiente para que el resto oligonucleotídico se hibride temporalmente al anclaje (p. ej., mediante la complementariedad de bases de Watson y Crick). La hibridación hace que el resto oligonucleotídico distorsione el campo que rodea al sensor de carga, lo que produce una señal detectable debido al cambio en la corriente del transistor a través del sensor de carga. El diagrama muestra que el resto oligonucleotídico entra en un campo que está a menos de 1 a 2 nm del sensor de carga. El nucleótido marcado idóneamente en el fosfato en β o γ se incorporará en una hebra naciente que está hibridada al ácido nucleico de plantilla. Esto, a su vez, hará que se rompa el enlace entre el β -fosfato y el nucleótido recién incorporado. Como resultado, el resto oligonucleotídico (tanto si está conectado en la posición β como en la posición γ del nucleótido) queda libre para deshibridarse del anclaje y alejarse por difusión del sensor de carga, con lo que se devuelve el campo que rodea al sensor a su estado sin alterar. La aparición y desaparición de la señal a medida que el campo que rodea al sensor de carga se distorsiona y regresa luego al estado sin alterar, respectivamente, se puede correlacionar con la incorporación de un nucleótido en la hebra naciente del ácido nucleico destinatario.

25 Determinadas realizaciones pueden explotar la fijación sinérgica del nucleótido marcado en el fosfato γ a la polimerasa y al anclaje. La estabilidad del complejo formado por el resto oligonucleotídico y el anclaje puede ser relativamente baja, de manera que el complejo no se forme con el nucleótido marcado en el fosfato γ que tampoco está fijado a la polimerasa (a saber, los nucleótidos marcados en el fosfato γ que están libres en la solución no se fijan sustancialmente al anclaje). Sin embargo, se añade el efecto sinérgico de las afinidades del resto nucleotídico por la polimerasa y del resto oligonucleotídico por el anclaje para permitir una afinidad de fijación sustancial en total. En algunas realizaciones, el efecto sinérgico puede explotar una combinación de afinidad de fijación específica entre el marcador del nucleótido y el anclaje junto con la débil afinidad producida por las interacciones de fijación inespecíficas. Por ejemplo, la fijación específica puede ser resultado del apareamiento de bases estándar de Watson y Crick, y las interacciones de fijación inespecífica pueden ser resultado de las interacciones de bases promiscuas (p. 30 ej., inosina) con los nucleótidos nativos. Así pues, cuando el nucleótido marcado en el fosfato γ se fija a la polimerasa durante la incorporación, se produce una fijación sinérgica que incrementa enormemente la estabilidad de la interacción entre el resto oligonucleotídico y el anclaje. Después de que el fosfato en γ sea escindido por la polimerasa, se pierde el efecto sinérgico y el resto oligonucleotídico se disociará del anclaje.

El tipo de nucleótido que se incorpora en la hebra naciente en cada posición de la hebra plantilla se puede 40 determinar basándose en las propiedades únicas de los marcadores incorporados en cada tipo de nucleótido. Por ejemplo, se pueden diferenciar cuatro tipos de dNTP mediante la posición en la que el resto oligonucleotídico se hibrida al anclaje, la longitud del resto oligonucleotídico y/o la presencia de un resto cargado en el marcador. En la figura 2 se da a conocer un ejemplo donde se consigue la discriminación de cuatro estados mediante 2 etiquetas con carga (que no son los fosfatos cargados negativamente del resto oligonucleotídico) y dos posiciones de hibridación 45 al anclaje. En concreto, la dCTP está marcada únicamente con un resto extrínseco cargado negativamente, la dTTP está marcada únicamente con un resto extrínseco cargado positivamente, dATP y dGTP se diferencian de los otros dos tipos de nucleótidos basándose en la ausencia de cualquier resto de carga extrínseco, y la dATP se diferencia de la dGTP basándose en la cercanía diferencial de los restos oligonucleotídicos al sensor de carga cuando se hibridan al anclaje.

50 Se entenderá que se pueden diferenciar diferentes tipos de nucleótidos en función de toda una serie de combinaciones de restos con carga positiva, restos con carga negativa y/o posición de la hibridación al anclaje. Como alternativa, o adicionalmente, los restos con carga utilizados para diferenciar los diferentes tipos de nucleótidos pueden diferir en la fuerza de las cargas, incluso si las cargas tienen el mismo signo. La configuración de ejemplo que se muestra en la figura 3 da a conocer una discriminación de cuatro estados basada en una única 55 posición de hibridación al anclaje y cuatro restos con cargas diferentes. En concreto, tanto la dGTP como la dCTP contienen restos cargados negativamente que se diferencian de dATP y dTTP, y la dGTP se puede diferenciar de la dCTP debido a la carga que es diferenciablemente mayor que la carga de la dCTP. De igual forma, la dATP y la dTTP se pueden diferenciar la una de la otra debido a la mayor carga positiva sobre el resto de dATP en comparación con el resto de dTTP.

60 Tal y como se observó anteriormente en la presente memoria, se puede mejorar la precisión de la colocación de la etiqueta en las posiciones específicas de hibridación a lo largo de un anclaje mediante el uso de un anclaje que tiene ribonucleótidos y un marcador de nucleótido que tiene las bases de ARN modificadas con 2'-O-Me y 2'-F. Las

configuraciones alternativas pueden usar un anclaje que contiene ribonucleótidos modificados con 2'-O-Me y 2'-F con un marcador que tiene ribonucleótidos, o bien tanto el anclaje como el marcador pueden incluir una mezcla de ribonucleótidos nativos y ribonucleótidos modificados con 2'-O-Me y 2'-F. Aunque es posible utilizar un anclaje y/o resto oligonucleotídico que está compuesto principalmente por ARN, podría ser deseable utilizar un anclaje y/o oligonucleótido basado en ADN o basado en PNA para evitar la sensibilidad a las nucleasas que está asociada al ARN. Por ejemplo, un anclaje y/o oligonucleótido basado en ADN o basado en PNA puede incluir ribonucleótidos nativos o análogos de ribonucleótidos no nativos para conseguir las ventajas de fijación presentadas en la presente memoria al mismo tiempo que se reduce el riesgo de las nucleasas realicen una digestión indeseada. En otras realizaciones, el anclaje puede incluir uno o varios desoxirribonucleótidos que son complementarios a los ribonucleótidos de un marcador de nucleótido o, como alternativa, el anclaje puede incluir ribonucleótidos que son complementarios a los desoxirribonucleótidos de un marcador de nucleótido.

Un anclaje que conecta una polimerasa a un sensor de carga puede tener diferentes posiciones de fijación para diferentes análogos de nucleótido, tal y como se presenta en varias realizaciones de ejemplo en la presente memoria. Las posiciones de fijación para dos o más análogos de nucleótido pueden ser solapantes o pueden ser independientes sin solapamiento. Por ejemplo, tal y como se muestra en la figura 10, los sitios de fijación para los análogos de ATP y GTP se solapan en el anclaje en 2 nucleótidos (a saber, hay 1 nucleótido de desfase entre los dos sitios de fijación). Con el propósito de ilustrar, la secuencia del anclaje se describe como una serie de nucleótidos genéricos «N». Se puede utilizar cualquiera entre las muchas secuencias que están de acuerdo con las reglas de complementariedad y las fuerzas y especificidades de hibridación deseadas. Tal y como también se muestra en la figura 10, los sitios de fijación para ATP y TTP sobre el anclaje no tienen ningún solapamiento, son independientes y están separados por 1 nucleótido. Según la longitud del anclaje, la longitud de los sitios de fijación y la longitud de los restos oligonucleotídicos que portan los análogos de los nucleótidos podrían solaparse algunos, todos o ninguno de los sitios de fijación en el anclaje.

El resto oligonucleotídico de un análogo de nucleótido puede tener una secuencia de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia complementaria sobre un anclaje. En algunas realizaciones, el resto oligonucleotídico puede también incluir posiciones nucleotídicas promiscuas que se fijan inespecíficamente a un anclaje. Tales posiciones pueden proporcionar una interacción débil entre el resto oligonucleotídico y el anclaje que facilita la formación de una estructura híbrida específica. Por ejemplo, tal y como se muestra en la figura 11, un resto oligonucleotídico puede incluir varias inosinas (I) que se sabe que se fijan de manera promiscua, aunque débilmente, a los cuatro nucleótidos nativos del ADN. El resto oligonucleotídico y el anclaje pueden formar un complejo débil a través de las interacciones entre las inosinas del resto oligonucleotídico y los nucleótidos nativos del anclaje. Esto puede permitir que porciones específicas de la secuencia (p. ej., indicadas como ABC y su complemento A'B'C' en la figura) se asocien con más rapidez de lo que lo harían si hubiera sido necesario que difundieran para la formación un complejo débil. Además, una vez que se ha formado un complejo específico, las inosinas pueden proporcionar más estabilidad.

El resto oligonucleotídico de ejemplo de la figura 11 incluye posiciones de nucleótidos promiscuos que flanquean ambos lados de la secuencia específica. No obstante, se debe saber que se pueden localizar una o varias posiciones de nucleótidos promiscuos sólo sobre el lado en 5' o en 3' de la secuencia específica. Otros ejemplos de posiciones de nucleótidos promiscuos incluyen los formados por la síntesis de oligonucleótidos degenerados o los formados con otros análogos de nucleótido que se sabe en la técnica que se hibridan de manera promiscua con 2 o más tipos de nucleótidos.

En los ejemplos mostrados en la figura 10 y en la figura 11, así como otros ejemplos presentados en la presente memoria, el anclaje es un ácido nucleico que se hibrida a un resto oligonucleotídico de un análogo de nucleótido. Se debe saber que se pueden utilizar otros compañeros de fijación como anclaje y resto marcador en vez de los ácidos nucleicos. Los sitios de fijación pueden ser independientes o solapantes, tal y como se ejemplifica más arriba para los ácidos nucleicos. De igual forma, los sitios de fijación pueden incluir una combinación de compañeros de interacción débiles e inespecíficos junto con los compañeros de interacción específicos y más fuertes.

Varias realizaciones presentadas en la presente memoria han ejemplificado el uso de numerosos análogos de nucleótido diferentes que tienen restos oligonucleotídicos de diferente longitud. En tales realizaciones, los diferentes tipos de nucleótidos se pueden diferenciar basándose en la diferente longitud de los restos oligonucleotídicos. Como alternativa, diferentes análogos de nucleótido pueden tener restos oligonucleotídicos de la misma longitud. Sin embargo, cada análogo de nucleótido puede tener una secuencia de fijación específica que se fija a una región diferente de un anclaje en comparación con las regiones donde se fijan los otros análogos de nucleótido. En la figura 12 se muestra una configuración de ejemplo, en donde la fijación de la polimerasa a los diferentes análogos de nucleótido coloca la polimerasa en uno de los cuatro estados diferenciables. El resto oligonucleotídico para el análogo de ATP se fija en una posición del anclaje que está más cerca del punto de conexión del anclaje a la polimerasa, el resto oligonucleotídico para el análogo de TTP se fija en una posición del anclaje que está más lejana del punto de conexión del anclaje a la polimerasa, y los restos oligonucleotídicos para los análogos de GTP y CTP se fijan, respectivamente, en posiciones independientes del anclaje que están a distancias intermedias de los sitios de fijación para los otros dos análogos de nucleótido. Como tal, la fijación de los diferentes análogos de nucleótido a la polimerasa colocará la polimerasa a diferentes distancias del sensor de carga (p. ej., provocando la formación de bucles de tamaños diferentes en el anclaje, tal y como se muestra en la figura). Los diferentes tipos de nucleótidos

se pueden diferenciar basándose en las diferencias de las señales producidas por las diferentes distancias de la polimerasa al sensor. En las realizaciones en donde uno o varios de los análogos de nucleótido incluye una etiqueta cargada u otro resto detectable (p. ej., conexión al extremo del resto oligonucleotídico que es distal al resto nucleotídico), la fijación entre el resto oligonucleotídico y el anclaje colocará el resto detectable a diferentes distancias del sensor de carga. En este caso, los diferentes tipos de nucleótidos se pueden diferenciar basándose en la diferencia de las señales producidas por las diferentes distancias de los restos detectables al sensor.

Tal y como se demuestra por la realización representada en el diagrama de la figura 4, el anclaje que conecta la polimerasa al sensor de carga no necesita ser capaz de hibridarse a las etiquetas presentes en los nucleótidos. Más bien, el sensor de carga puede estar funcionalizado para conectarse a uno o varios oligonucleótidos que son complementarios a uno o varios de los tipos de nucleótidos que se detectan. La discriminación de los diferentes nucleótidos se puede conseguir basándose en el signo de la carga, en la fuerza de la carga, en la longitud del resto oligonucleotídico que se hibrida al oligonucleótido u oligonucleótidos conectados a la superficie, o en la cercanía/posición sobre el oligonucleótido u oligonucleótidos conectados a la superficie a la que se hibrida el resto oligonucleotídico, o una combinación de los mismos.

Las ventajas de varias configuraciones presentadas más arriba incluyen, por ejemplo, solventar los problemas de apantallamiento mediante la colocación de las cargas a menos de 1 a 2 nm de la compuerta con precisión atómica, capacidad para conseguir un mayor nivel de modulación de la corriente a través del uso de etiquetas con carga, y la apertura del espacio de las polimerasas disponibles, ya que para la detección no se necesita el movimiento alostérico específico de la base.

Una etiqueta con carga de ejemplo que puede ser útil en el equipo y los métodos presentados en la presente memoria es un resto de fosfato, por ejemplo, localizado en el extremo 5' de un resto de ácido nucleico. Este resto se puede añadir con facilidad durante los protocolos de síntesis de oligonucleótidos disponibles y dará lugar a dos oxígenos cargados negativamente en el extremo del resto oligonucleotídico, tal y como se muestra en la figura 5. La fosforilación química durante la síntesis de oligonucleótidos se puede conseguir con la conversión del grupo protector DMT en un grupo fosfato en 5' mediante el uso de 2-[2-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (disponible en Glen Research, Sterling VA, catálogo n.º CPR 10-1900). Se pueden fabricar una serie de etiquetas con carga que tienen diferente número de cargas negativas mediante el uso de Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (disponible en Glen Research, Sterling VA, catálogo n.º 10-1922-xx), 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (disponible en Glen Research, Sterling VA, catálogo n.º 10-1920-xx), 1-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]-3-[5-fluorenometoxicarboniloxipentilamido]-propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (disponible en Glen Research, Sterling VA, catálogo n.º 10-1921-xx), o dendrímeros oligonucleotídicos que contienen diferentes cantidades de restos de DMT (4,4'-dimetoxitritilo) o Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo), tales como los disponibles en Glen Research o los que se muestran en la figura 6. Una etiqueta útil cargada positivamente es la 2-[2-(4-monometoxitritil)aminoetoxi]etil-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforamidita (disponible en Glen Research, Sterling VA, catálogo n.º 10-1905-xx). Otro resto útil cargado positivamente es una amina primaria en 5' que tendría una única carga positiva al pH apropiado.

La tabla 1 da a conocer una lista de modificaciones y cargas útiles que se pueden utilizar como marcadores en un equipo o método presentado en la presente memoria.

Tabla 1

Extremo en 5'	Reactivos	Estado final de la carga
5' OH	N/A	Neutro
5' Fosfato	CPR 10-1900 (Glen Res.)	-2
5' Fosfato (×2)	CPR 10-1900 y duplicador simétrico (Glen Res.)	-4
5' Fosfato (×3)	CPR 10-1900 y triplicador simétrico (Glen Res.)	-6
Amina primaria en 5'	Modificador 5 de amino en 5'	+1

Se describe en la presente memoria un método para conectar componentes de la reacción a sensores de carga. El método puede incluir las etapas de (a) aportar un soporte sólido que incluye numerosos sensores de carga, en donde cada uno de los sensores de carga tiene una capacidad para conectarse a numerosos componentes de la reacción; (b) aportar un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto; y (c) poner en contacto el soporte sólido con el fluido en las condiciones en las que (i) numerosos componentes de la reacción

del tipo concreto están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga, (ii) en el fluido hay una cantidad de componentes de la reacción del tipo concreto más grande que la cantidad de sensores de carga en el soporte sólido; y (iii) los componentes de la reacción del tipo concreto en el fluido se conectan a los sensores de carga en las condiciones que dan lugar a un soporte sólido en donde cada uno de los sensores de carga está conectado a uno solo de los componentes de la reacción.

La invención da a conocer un método para conectar componentes de la reacción a sensores de carga que puede incluir las etapas de (a) aportar un soporte sólido que incluye numerosos sensores de carga, en donde cada uno de los sensores de carga tiene una capacidad para conectarse a numerosos componentes de la reacción; (b) aportar un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto, en donde cada uno de los componentes de la reacción del tipo concreto está fijado a un resto repelente; y (c) poner en contacto el soporte sólido con el fluido en las condiciones en las que (i) numerosos componentes de la reacción del tipo concreto están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga, (ii) en el fluido hay una cantidad de componentes de la reacción del tipo concreto que es mayor que la cantidad de sensores de carga en el soporte sólido; (iii) los componentes de la reacción en el fluido se conectan a los sensores de carga, y (iv) el resto repelente fijado a cada uno de los componentes de la reacción impide que cada uno de los sensores de carga se conecte a más de uno de los componentes de la reacción en los numerosos componentes de la reacción.

Un método para conectar los componentes de la reacción a los sensores de carga puede incluir las etapas de (a) aportar un soporte sólido que incluye numerosos sensores de carga, en donde cada uno de los sensores de carga tiene una capacidad para conectarse a numerosos componentes de la reacción; (b) aportar un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto; (c) poner en contacto el soporte sólido con el fluido en las condiciones en las que (i) los numerosos componentes de la reacción del tipo concreto están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga, (ii) en el fluido hay una cantidad de componentes de la reacción del tipo concreto que es mayor que el número de sensores de carga en el soporte sólido; y (iii) los componentes de la reacción del tipo concreto en el fluido se conectan a los sensores de carga, con lo que forman sensores de carga modificados que están conectados a numerosos componentes de la reacción del tipo concreto del fluido; y (d) retirar uno o varios de los componentes de la reacción del tipo concreto de cada uno de los sensores de carga modificados para dejar solo uno de los componentes de la reacción del tipo concreto conectado a cada uno de los sensores de carga modificados.

Los dispositivos de carga útiles incluyen dispositivos analíticos que pueden incorporar un componente de la reacción en contacto espacial directo con un elemento de transducción de un modo que permite la conversión rápida y cómoda de los acontecimientos de la reacción en señales detectables. Los dispositivos basados en transistores de efecto campo (FET, por su nombre en inglés) pueden traducir directamente las interacciones entre los componentes de la reacción (p. ej., polimerasas) y la superficie del transistor en señales eléctricas legibles. En un FET estándar, la corriente fluye a lo largo de un camino conductivo (el canal) que está conectado a dos electrodos (la fuente y el drenaje). La conductancia del canal entre la fuente y el drenaje se enciende y apaga mediante un tercer electrodo (compuerta) que puede acoplarse capacitivamente a través de una delgada capa dieléctrica.

En determinadas realizaciones, los FET se configuran para conseguir que detecten una única molécula. Más en concreto, estos sensores de carga se pueden configurar para seguir la dinámica de una reacción de una única molécula. En un equipo o método presentado en la presente memoria se puede utilizar cualquier tipo de canal conductivo que se encuentra por lo general en los transistores de efecto campo. Los canales conductivos de ejemplo están formados por metales, óxidos metálicos, semiconductores o conductores a escala nanométrica, tales como nanocables, o grafeno.

Los sensores de carga particularmente útiles para la detección de una única molécula son los nanotubos de carbono de una sola pared (SWNT, por su nombre en inglés). Véanse, por ejemplo, Star et al., *Nano. Lett.* 3, 459 (2003); Star et al., *Org Lett.* 6, 2089 (2004); Besterman et al., *Nano. Lett.* 3, 727 (2003); Gruner, *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 322 (2005); Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 4984 (2003) y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2013/0078622 A1. Los SWNT son conductores muy pequeños, típicamente del orden de aproximadamente 1 nm de diámetro.

Un SWNT puede estar revestido con un polímero, metal o nanopartícula de óxido metálico quimiosselectivos, o con componentes de la reacción de tipo proteínas, ácidos nucleicos o anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Besterman et al., *Nano. Lett.* 3, 727 (2003); y Chen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 4984 (2003). Los componentes de la reacción sueltos se pueden conectar a estos SWNT y a otros sensores de carga con los métodos presentados en la presente memoria.

En algunas realizaciones, a un sensor de carga se le puede conectar un único componente de la reacción mediante la creación de un solo defecto covalente en el sensor de carga, por ejemplo, con las técnicas presentadas en Goldsmith et al., *Science* 315, 77 (2007). Por ejemplo, un SWNT se puede fabricar para que tenga un solo defecto, de tal manera que se pueden usar una serie de químicas de conexión para unir un único componente de la reacción al sitio del defecto reactivo de manera selectiva, sin revestir el resto del SWNT con otros componentes de la reacción. Los SWNT también se pueden conectar a los componentes de la reacción mediante medios no covalentes, por ejemplo, mediante las técnicas presentadas en Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3838 (2001). Estos métodos

se pueden modificar tal y como se presenta en la presente memoria para que a un SWNT se fije de manera fiable un único componente de la reacción por medios no covalentes.

5 Los SWNT son semiconductores con huecos de banda electrónicos que pueden variar desde 1 eV a efectivamente cero. Los SWNT son útiles como canales conductivos porque los dispositivos sensores de una única molécula se pueden fabricar a partir de los cables de SWNT de cualquier tipo, con o sin electrodos de compuerta, y en sustratos de vidrio, plástico o silicio. Los SWNT útiles y sus configuraciones para la detección de una única molécula se presentan en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2013/0078622 A1.

10 Otros sensores de carga que pueden modificarse para ser usados en un equipo o método presentado en la presente memoria incluyen, sin limitación, FET con nanocable de silicio (SiNW), FET hechos de materiales III-V, FinFET de silicio, FET de nanocinta de grafeno así como FET de nanocinta de otros materiales bidimensionales, tales como MoS₂ y siliceno, FET de túnel (TFET, por su nombre en inglés), y dispositivos de pendiente pronunciada por debajo del umbral (véase, por ejemplo, Swaminathan et al., *Proceedings of the 51st Annual Design Automation Conference on Design Automation Conference*, pág 1-6, ISBN: 979-1-4503-2730-5 (2014) e Ionescu et al., *Nature* 479, 329-337 (2011)). También pueden ser útiles los nanotubos de carbono.

15 Numerosos sensores de carga se pueden dar a conocer en la forma de una matriz de sensores de carga. La matriz puede incluir al menos 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^4 , 1×10^4 o más sensores de carga. Cada sensor de carga independiente puede estar localizado en una posición única de la matriz que está separada de los otros sensores de carga de la matriz. Por ejemplo, cada sensor de carga puede residir en un pocillo o depresión en un soporte sólido. Las posiciones, incluso cuando están separadas unas de las otras, pueden estar, optativamente, en contacto fluido con una solución a granel. En tal configuración, las reacciones multiplexadas se pueden producir en la matriz de los sensores de carga mediante la administración de los reactivos comunes a todos los sensores de carga mediante la administración de fluido a granel. Si se toman las reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos a modo de ejemplo, los nucleótidos se pueden administrar mediante una solución a granel a una matriz de pocillos (u otros elementos), en donde cada pocillo (u otro elemento) alberga una reacción de secuenciación independiente. La administración del nucleótido dará lugar a reacciones de secuenciación en paralelo en los pocillos (u otros elementos).

20 Un sensor de carga, tal como un nanocable de Si, puede tener dimensiones que tienen menos de 10 nm de ancho y más de 100 nm de largo. Un nanocable de Si u otro sensor de carga se puede colocar en un pocillo que tiene 10 nm \times 10 nm, 50 nm \times 100 nm o más grande. Por ejemplo, un pocillo dentro del cual reside un sensor de carga puede tener una apertura en una superficie que es de al menos 100 nm², 1.000 nm², 5.000 nm², 1×10^4 nm² o más grande. La circuitería para leer la señal desde el elemento sensor de carga puede ocupar una superficie del soporte sólido que tiene 1 μ m \times 1 μ m o más grande.

30 En algunas realizaciones, un sensor de carga tendrá una anchura uniforme a lo largo de toda la longitud. Como alternativa, un sensor de carga puede tener una anchura sustancialmente variable a lo largo de su longitud. Por ejemplo, un sensor de carga puede incluir una región con una anchura relativamente estrecha, comparable a una región 'estrechada'. La anchura de la región estrechada puede tener un diámetro que es, por ejemplo, el 75%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% del diámetro de las regiones con una anchura relativamente más grande del sensor de carga. El estrechamiento puede proporcionar la ventaja de incrementar el efecto de un movimiento del resto cargado de la polimerasa sobre el sensor. Otro beneficio es la relajación de la tolerancia para la fabricación del canal y la apertura/alineamiento de la pasivación dieléctrica de la primera capa del sensor de FET. Por ejemplo, un sensor de carga que tiene un diámetro de 20 nm con un área estrechada de 10 nm puede ser particularmente útil. Otras dimensiones para un sensor de carga con una región estrechada incluyen, por ejemplo, diámetros de al menos 25, 30, 35 o 40 nm o más con una región estrechada que tiene, como mucho, 10, 20, 30, 40 o 50 nm de largo. También se pueden utilizar sensores que tienen diámetros más pequeños, por ejemplo, los que tienen diámetros de al menos 5, 10, 15 o 20 nm pueden tener una región estrechada con una longitud en el margen ejemplificado. Se entenderá que, en algunas realizaciones, el diámetro máximo de un sensor de carga será de 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 10 nm o menos.

35 Un anclaje para una polimerasa u otra enzima puede estar conectado a una región estrechada o en un punto que está cerca de la región estrechada. Así pues, el anclaje se puede colocar para localizar una polimerasa u otra enzima muy cerca de la región estrechada.

40 En la figura 8 se muestra una aplicación ejemplar de un sensor de carga que tiene una región estrechada. La región estrechada se puede fabricar mediante el diseño de una máscara litográfica apropiada en donde la forma de la máscara es de tal manera que produce el estrechamiento deseado. Como alternativa, los efectos de cercanía durante el estampado litográfico se pueden utilizar para estrechar localmente el sensor de carga mediante la colocación de electrodos de manera ortogonal al sensor muy cerca de la región a estrechar. Además de para producir el estrechamiento deseado, los electrodos cercanos se pueden utilizar para producir una fuerza electroforética que coloca la enzima en la región del estrechamiento.

45 Otra aplicación ejemplar se muestra en la figura 9. Aquí se introduce un estrechamiento en la sílice mediante la oxidación local. En una primera etapa, un cable de sílice se reviste con una barrera de oxidación, tal como nitruro de

silíce (SiNx). Una región del cable de silíce se puede quedar expuesta mediante el uso de la litografía local para retirar la barrera de oxidación. A continuación, el cable parcialmente revestido se puede oxidar para reducir la anchura del cable de silíce en la región expuesta. Se puede realizar un grabado adicional para exponer el estrechamiento de silíce para la conjugación química.

- 5 Los expertos en la técnica reconocerán que los métodos de más arriba para producir un estrechamiento en un sensor de carga son de ejemplo y no de limitación; se puede producir un estrechamiento con muchos otros métodos habituales para la fabricación de semiconductores, p. ej., mediante el uso de capas de sacrificio, depósito selectivo y grabado, u otras máscaras litográficas, entre otros.

10 La densidad de una matriz puede ser desde tan solo 2 hasta mil millones o más sitios de reacción diferentes por centímetro cuadrado. Las matrices de densidad muy alta son útiles en la invención y quedan incluidas, por ejemplo, las que tienen al menos aproximadamente 10.000.000 sitios de reacción/cm² que incluyen, por ejemplo, al menos aproximadamente 100.000.000 sitios de reacción/cm², 1.000.000.000 sitios de reacción/cm², hasta aproximadamente 2.000.000.000 sitios de reacción/cm² o más. También se pueden utilizar las matrices de alta densidad, e incluyen, por ejemplo, las que están en el margen de aproximadamente 100.000 sitios de reacción/cm² a

15 aproximadamente 10.000.000 sitios de reacción/cm². Las matrices de densidad moderada útiles en la invención pueden oscilar desde aproximadamente 10.000 sitios de reacción/cm² a aproximadamente 100.000 sitios de reacción/cm². Las matrices de densidad baja tienen por lo general menos de aproximadamente 10.000 sitios de reacción/cm².

20 A un sensor de carga se le puede conectar cualquiera de los numerosos componentes de la reacción. Por ejemplo, un receptor, tal como un anticuerpo o lectina; un ligando, tal como un nucleótido, epítipo, glúcido o fármaco candidato; un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico destinatario, ácido nucleico de anclaje u otro ácido nucleico presentado en relación con una reacción presentada en la presente memoria; o una enzima, tal como una polimerasa u otra enzima de fijación a un ácido nucleico, una cinasa, fosfatasa, exonucleasa, proteasa o enzima metabólica. Otros componentes de la reacción útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, los componentes de las

25 reacciones presentados en la presente memoria o conocidos en el campo de la biología molecular o de la bioquímica.

Las realizaciones multiplexadas que incluyen, por ejemplo, las que utilizan una matriz de sensores de carga se pueden configurar de tal manera que un único tipo de componente de la reacción esté conectado a cada sensor de carga. Por ejemplo, sustancialmente todos los sensores de carga en una realización multiplexada pueden estar

30 conectados a una polimerasa. Además, las mismas especies de polimerasa se pueden conectar a cada uno de los sensores de carga. Esta configuración puede proporcionar una salida uniforme esperada desde cada sensor de carga, salvo para las diferencias en los otros componentes de la reacción que entran en contacto con cada sensor de carga respectivo. Tal configuración se puede conseguir al proporcionar un fluido que es homogéneo con respecto a tener un único tipo de polimerasa cuando se conectan las polimerasas a los sensores de carga.

35 En un método o composición presentado en la presente memoria se puede utilizar cualquiera entre muchas polimerasas diferentes, que incluyen, por ejemplo, enzimas de naturaleza proteica aisladas de sistemas biológicos y variantes funcionales de las mismas. La referencia a una polimerasa concreta, tales como las de ejemplo que vienen a continuación, se debe saber que incluyen las variantes funcionales de las mismas, a menos que se indique de otra manera. Una función particularmente útil de una polimerasa es catalizar la polimerización de una hebra de ácido

40 nucleico utilizando un ácido nucleico existente como plantilla. Otras funciones que son útiles se describen en otra parte de la presente memoria. Ejemplos de polimerasas útiles incluyen las ADN polimerasas y las ARN polimerasas. Las ADN polimerasas ejemplares incluyen las que se han clasificado por homología estructural en familias identificadas como A, B, C, D, X, Y y RT. Las ADN polimerasas de la familia A incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa de T7, la ADN polimerasa γ de la mitocondria eucariota, la ADN Pol I de *E. coli*, Pol I de *Thermus aquaticus*, y Pol I de *Bacillus stearothermophilus*. Las ADN polimerasas de la familia B incluyen, por ejemplo, las ADN polimerasas eucariotas α , δ y ϵ ; la ADN polimerasa ξ ; la ADN polimerasa de T4, la ADN polimerasa de Φ 29 y la ADN polimerasa del bacteriófago RB69. La familia C incluye, por ejemplo, la subunidad α de la ADN polimerasa III de *E. coli*. La familia D incluye, por ejemplo, las polimerasas procedentes del subdominio *Euryarchaeota* de *Archaea*. Las ADN polimerasas en la familia X incluyen, por ejemplo, las polimerasas eucariotas Pol β , pol σ , Pol λ y Pol μ , y Pol4 de *S. cerevisiae*. Las ADN polimerasas en la familia Y incluyen, por ejemplo, Pol η , Pol ι , Pol κ , Pol IV de *E. coli* (DINB) y Pol V de *E. coli* (UmuD'2C). La familia RT (transcriptasa inversa) de las ADN polimerasas incluye, por ejemplo, las retrotranscriptasas de retrovirus y las telomerasas eucariotas. Las ARN polimerasas ejemplares incluyen, pero sin limitarse a ellas, ARN polimerasas víricas, tales como la ARN polimerasa de T7; ARN polimerasas eucariotas, tales como ARN polimerasa I, ARN polimerasa II, ARN polimerasa III, ARN polimerasa IV y ARN

55 polimerasa V; y la ARN polimerasa de *Archaea*.

Las clasificaciones de más arriba se dan a conocer con propósitos ilustrativos. Se deberá saber que tienen cabida las variaciones en el sistema de clasificación. Por ejemplo, en al menos un sistema de clasificación, las polimerasas de la familia C se han clasificado como una subcategoría de la familia X. Además, las polimerasas se pueden clasificar según otras características, tanto funcionales como estructurales, que pueden o no solaparse con las características estructurales ejemplificadas más arriba. Algunas características ejemplares se presentan con más detalle a continuación.

60

Una polimerasa que tiene una actividad exonucleasa correctora 3'→5' puede ser útil para algunas realizaciones. Las polimerasas que sustancialmente carecen de la actividad exonucleasa correctora 3'→5' también son útiles en algunas realizaciones, por ejemplo, en la mayoría de las realizaciones de secuenciación. La ausencia de la actividad exonucleasa puede ser un tipo silvestre característico o una característica impartida por una estructura de la polimerasa variante o manipulada genéticamente. Por ejemplo, el fragmento Klenow sin la exo es una versión mutada del fragmento Klenow que carece de la actividad exonucleasa correctora 3'→5'. El fragmento Klenow y su variante sin la exo pueden ser útiles en un método o composición presentado en la presente memoria. Por otra parte, el fragmento grande de las ADN polimerasas de la familia A, tal como la ADN polimerasa I *Bsu* (*Bsu*-LF), carece de forma natural de una función exonucleasa de 3' a 5'.

5
10
15

Las polimerasas que tienen una actividad exonucleasa de 3' a 5' se someten al cambio intramolecular e intermolecular tal y como se describe, por ejemplo, en Lamichhane et al. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 4735-4742 (2013). En algunas realizaciones, es deseable utilizar una polimerasa que carece de actividad exonucleasa de 3' a 5'. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el cambio puede provocar un cambio conformacional que es difícil de distinguir de uno o varios cambios conformacionales que se producen debido a la actividad polimerasa y que se utilizan para la secuenciación u otros análisis. La actividad exonucleasa de 3' a 5' se puede retirar mediante la eliminación de todo o parte del dominio exonucleasa de 3' a 5' o mediante la introducción de mutaciones de pérdida de la función en el dominio de la exonucleasa de 3' a 5'.

20

El gran fragmento de las ADN polimerasas de la familia A, tales como la ADN polimerasa I *Bsu* (*Bsu*-LF), puede además modificarse para ser usado en un método presentado en la presente memoria. La *Bsu*-LF nativa no tiene restos de cisteína (Cys). Uno o varios restos de Cys se pueden manipular genéticamente en una posición accesible de la superficie de *Bsu*-LF para permitir un sitio de conexión cómodo para un anclaje y otro conector que tenga un resto reactivo de tipo sulfhidrilo. Los sitios candidatos para la introducción de una mutación de Cys se pueden determinar a partir de la inspección de las estructuras cristalizadas de *Bsu*-LF u otras polimerasas homólogas de la familia A.

25
30

También puede ser deseable manipular genéticamente la *Bsu*-LF para introducir restos cargados que interactuarán favorablemente con un sensor de carga. Por ejemplo, una modificación beneficiosa es introducir uno o varios restos desde el dominio del dedo de la hélice O del fragmento Klenow en una o varias posiciones comparables de *Bsu*-LF, cuyo resultado neto es la introducción de más aminoácidos cargados en el mutante de *Bsu*-LF. Véase la figura 7 para la localización del dominio de dedo de la hélice-O del fragmento Klenow (Pollxxo en la figura) y la localización a reemplazar en *Bsu*-LF (*Bsuxxx1*) en la figura. Se pueden hacer cambios similares a otras polimerasas de la familia A, tales como la ADN polimerasa *Taq* o la ADN polimerasa *Bst*.

35
40
45

Las polimerasas se pueden caracterizar en función de su procesividad. Una polimerasa puede tener una procesividad media que tiene al menos aproximadamente de 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 100.000 nucleótidos o más. Como alternativa o adicionalmente, la procesividad media de una polimerasa utilizada tal y como se presenta en la presente memoria puede ser, por ejemplo, como mucho de 1 millón de nucleótidos, 100.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos. Las polimerasas también se pueden caracterizar en función de su velocidad de procesividad o de incorporación de nucleótidos. Por ejemplo, muchas polimerasas nativas pueden incorporar nucleótidos a una velocidad de al menos 1.000 nucleótidos por segundo. En algunas realizaciones, se puede desear una velocidad más lenta. Por ejemplo, se pueden utilizar unas condiciones de reacción y una polimerasa adecuadas para conseguir una velocidad media de como mucho 500 nucleótidos por segundo, 100 nucleótidos por segundo, 10 nucleótidos por segundo, 1 nucleótido por segundo, 1 nucleótido cada 10 segundos, 1 nucleótido por minuto o más lenta. Tal y como se presenta con más detalle en otra parte en la presente memoria, se pueden utilizar los análogos de nucleótido que tengan una velocidad de incorporación más lenta o más rápida que los nucleótidos que se producen de forma natural. Se debe saber que las polimerasas de alguna entre una serie de fuentes se pueden modificar para incrementar o disminuir su procesividad media o su velocidad media de la procesividad (p. ej., velocidad media de incorporación de nucleótidos) o ambas. En consecuencia, se puede conseguir una velocidad de reacción deseada mediante el uso de una o varias polimerasas adecuadas, análogos de nucleótidos, plantillas de ácido nucleico y otras condiciones de la reacción.

50
55
60

En función de la realización que se ha de utilizar, una polimerasa puede ser termófila o bien se puede inactivar con calor. Las polimerasas termófilas son típicamente útiles para las condiciones de temperatura elevada o en las condiciones de termociclación, tales como las utilizadas para las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ejemplos de polimerasas termófilas incluyen, pero sin limitarse a ellas, la ADN polimerasa 9°N, la ADN polimerasa *Taq*, la ADN polimerasa Pushion®, la ADN polimerasa Pfu, la DNA polimerasa de RB69, la ADN polimerasa KOD y la ADN polimerasa VentR®. La mayoría de las polimerasas aisladas de organismos no termófilos se pueden inactivar con calor. Los ejemplos son las ADN polimerasas de fago. Se debe saber que las polimerasas de cualquiera de muchas fuentes diferentes se pueden modificar para incrementarles o disminuirles su tolerancia a las condiciones de alta temperatura. Se puede utilizar un pico de calor (a saber, un breve periodo de tiempo de incremento de temperatura) para inactivar una o varias polimerasas inactivables con calor en una matriz, mientras que se dejan las polimerasas termófilas en un estado activo para las posteriores reacciones o los posteriores ciclos de una reacción de secuenciación.

En una realización alternativa, varios tipos diferentes de componentes de la reacción se pueden conectar a través de

la colección multiplexada de sensores de carga. Por ejemplo, un primer subconjunto de sensores de carga en una matriz puede estar conectado a una primera especie de polimerasa y un segundo subconjunto de sensores de carga en la matriz puede estar conectado a una segunda especie de polimerasa. Se pueden utilizar dos, tres o más especies de polimerasa. El uso de diferentes especies de polimerasa puede ser útil cuando las diferentes polimerasas tienen especificidad o sensibilidad diferente por diferentes tipos de nucleótidos o diferentes secuencias de plantilla. Por ejemplo, los diferentes tipos de polimerasas pueden producir señales mutuamente diferenciables que se pueden detectar mediante sensores de carga cuando se incorpora el mismo tipo de nucleótido en una hebra naciente de un ácido nucleico. En otro ejemplo, los diferentes tipos de polimerasas pueden incluir al menos una ADN polimerasa y al menos una ARN polimerasa. Tal configuración se puede conseguir al proporcionar un fluido que es heterogéneo con respecto a tener varios tipos de polimerasas cuando se conectan las polimerasas a los sensores de carga.

En algunas configuraciones, un sensor de carga tendrá capacidad para conectarse a más de un componente de la reacción de un tipo concreto. Por ejemplo, un sensor de carga puede tener una capacidad para conectarse a más de una polimerasa. En función del tamaño del sensor de la carga y del volumen ocupado por la polimerasa, el sensor de carga puede tener una capacidad para conectarse a al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25 o más polimerasas. Esto puede ser el caso de numerosos sensores de carga en una matriz. Tal y como se presentará con más detalle a continuación, se pueden imponer temporalmente las condiciones que hacen disminuir la capacidad de un sensor de carga, incrementar el volumen bruto de una polimerasa (u otro componente de la reacción) o, si no, favorecer la conexión de una única polimerasa (u otro componente de la reacción) a cada uno de los sensores de carga. De nuevo, las condiciones se pueden aplicar a una matriz de sensores de carga.

Un componente de la reacción puede estar conectado a un sensor de carga mediante el uso de alguna de las numerosas químicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar conectores químicos. En muchas realizaciones, la superficie del sensor de carga es una de SiO₂, Al₂O₃, HfO₂, Ta₂O₅. También se pueden utilizar otros óxidos, por ejemplo, del grupo de los lantánidos. También se pueden usar nitruros y oxinitruros. La unión a un conector se puede realizar con comodidad a través del hidroxilo de la superficie. En determinadas realizaciones, la molécula del conector incluye al menos un primer y un segundo grupo funcional. Por lo general, el primer grupo funcional interacciona con el sensor de carga y el segundo grupo funcional interacciona con el componente de la reacción. Los primeros grupos funcionales de ejemplo incluyen un pireno, un benceno, un ciclohexano y 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona. Un segundo grupo funcional de ejemplo es maleimida. Se pueden utilizar otras químicas conocidas para unir covalentemente las proteínas a las superficies u otros restos, tales como las vendidas por Thermo Fisher (Waltham, MA) o Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El grupo químico sobre la polimerasa conectada a los anclajes puede ser un grupo tiol, amina o carboxílico. En determinadas realizaciones, en las que el canal conductivo es un SWNT, la superficie de un SWNT es una capa de grafito con un grosor de aproximadamente un átomo. La molécula del conector se puede unir covalentemente a uno o a unos pocos átomos de carbono, o puede interaccionar con una pared lateral del SWNT a través del apilamiento π-π.

Un componente de la reacción puede estar conectado a un sensor de carga mediante un enlace no covalente, tal como uno formado entre un receptor y un ligando. Los enlaces particularmente útiles son los que hay entre la estreptavidina (o variantes o análogos de la misma) y la biotina (o sus análogos), los que hay entre los ácidos nucleicos complementarios, los que hay entre los anticuerpos y los epítomos, y similares. Los miembros de las parejas anteriores se pueden unir a un componente de la reacción y a un sensor de carga, respectivamente, de tal manera que se pone en contacto un fluido que contiene los componentes de la reacción con un soporte sólido que tiene el sensor de carga dará lugar a la formación del enlace no covalente que ancla el componente de la reacción al sensor de carga.

En algunas realizaciones, los componentes de la reacción desde el fluido se conectan a los sensores de carga para formar un anclaje conductivo. Los anclajes conductivos ejemplares incluyen los que tienen una estructura que incluye, dopados, politiofeno, poli(3,4-etilendiioxitiofeno), poliacetilenos, polipirroles, polianilinas, polifluorenos, polifenilenos, polipirenos, poliazulenos, polinaftalenos, policarbazoles, poliindoles o poliazepinas. El dopaje de la carga de estas estructuras de anclaje se puede conseguir mediante la oxidación del polímero. Los anclajes conductivos de ejemplo y los métodos para su creación se presentan en Vernitskaya et al. *Russ. Chem. Rev.* 66: 443ff (1997); MacDiarmid, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 2581-2590 (2001); o McNeil et al., *Aust. J. Chem.* 16: 1056-75 (1963).

En determinadas realizaciones, un soporte sólido puede estar dentro o ser parte de un recipiente, tal como un pocillo, tubo, canal, cubeta, placa de Petri, frasco o similar. Un recipiente particularmente útil es una celda de flujo, por ejemplo, tal y como se describe en la patente de los EE. UU. 2010/0111768 A1 o en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008). Las celdas de flujo ejemplares son las que están disponibles en el mercado de Illumina, Inc (San Diego, CA). Las celdas de flujo son cómodas para administrar reactantes a granel a una matriz de sensores de carga durante la conexión de los componentes de la reacción a los sensores de carga o durante las posteriores reacciones llevadas a cabo con los componentes de la reacción sobre los sensores de carga. Los procesos cíclicos, tales como las reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos, están particularmente bien adaptadas para los dispositivos con celdas de flujo. Otro recipiente particularmente útil es un pocillo en una placa multipocillo o en una placa de microtitulación.

Un método presentado en la presente memoria puede incluir las etapas de poner en contacto numerosos sensores de carga con un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto en las condiciones en las que los componentes de la reacción están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga y los componentes de la reacción se conectan a los sensores de carga. El resultado puede ser que cada uno de los sensores de carga se queda conectado a un solo componente de la reacción incluso cuando la cantidad de componentes de la reacción en el fluido es mayor que la cantidad de sensores de carga que están en contacto con el fluido. La fracción de los sensores de carga que se conecta a uno y solo uno de los componentes de la reacción del tipo concreto se esperaría que se ajustara a una distribución de Poisson. La distribución de Poisson establece un máximo del 37% de ocupación para la fracción de los sensores de carga que solo se conectarían a un único componente de la reacción de un tipo concreto cuando los componentes de la reacción se administraban a los sensores de carga en un fluido a granel. Sin embargo, de acuerdo con los métodos presentados en la presente memoria, la administración de fluido a granel de los componentes de la reacción de un tipo concreto (p. ej., polimerasa u otra enzima para ácido nucleico) puede dar lugar a que más del 35%, 40%, 50%, 75%, 90%, 95% o 99% de los sensores de carga en los numerosos estén ocupados por un único componente de la reacción del tipo concreto.

En algunas realizaciones de los métodos, los componentes de la reacción se pueden transportar de una solución a granel hasta los sensores de carga, por ejemplo, mediante difusión u otro proceso pasivo. Por lo tanto, se puede producir la conexión de los componentes de la reacción a los sensores de carga, por ejemplo, según las químicas presentadas en la presente memoria o conocidas en la técnica. Como alternativa, los componentes de la reacción se pueden transportar activamente a los sensores de carga, por ejemplo, mediante el transporte asistido por campo eléctrico. De nuevo, la conexión de los componentes de la reacción al sensor de carga puede tener lugar mediante las químicas presentadas en la presente memoria o conocidas en la técnica.

Un método presentado en la presente memoria se puede modificar para utilizar el transporte ayudado por el campo eléctrico de los componentes de la reacción hacia los sitios que contienen sensores de carga. Por ejemplo, cada sensor de carga en un soporte sólido puede estar presente en un sitio que está acoplado eléctricamente a una fuente de energía para producir una carga eléctrica que atrae las polimerasas u otros componentes de la reacción al sitio que está muy cercano al sensor de carga en ese sitio. Los métodos y el equipo de ejemplo para utilizar la ayuda del campo eléctrico para atraer los analitos a los sitios de una matriz se describen en la patente de los EE. UU. 2009/0032401 A1. La ayuda del campo eléctrico se puede utilizar en un método de la presente descripción, por ejemplo, en las condiciones en las que numerosas polimerasas diferentes (u otros componentes de la reacción) están en solución, de tal manera que las polimerasas están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga. La carga en el sitio de cada sensor de carga se puede ajustar para conseguir la deseada velocidad o cantidad de transporte para la polimerasa (o cualquier otro tipo concreto de componente de la reacción).

En determinadas realizaciones que utilizan el transporte ayudado por el campo eléctrico, el campo eléctrico se puede aplicar continuamente durante el transcurso de la reacción que se utiliza para conectar una polimerasa (o cualquier otro tipo concreto de componente de la reacción) a un sensor de carga. Como alternativa, el campo eléctrico se puede cambiar (p. ej., incrementar o disminuir) a medida que la reacción de conexión progresa y los sensores de carga se llenan con la polimerasa (o cualquier otro tipo concreto de componente de la reacción). Por ejemplo, el incremento del campo eléctrico puede dar a conocer el beneficio de incrementar el número de sensores de carga que se conectan a una polimerasa. La velocidad a la cual se incrementa el campo eléctrico, y el margen de amplitud para el incremento, se pueden seleccionar para que el incremento de la velocidad del transporte del componente de la reacción hacia los sensores de carga con el tiempo se equilibre con el número creciente de sensores de carga que se han conectado a la polimerasa durante el mismo periodo de tiempo. La velocidad de cambio para el campo eléctrico se puede basar en una velocidad predicha o esperada de la conexión al polímero. Como alternativa, el campo eléctrico se puede cambiar en respuesta a la detección empírica de la conexión de la polimerasa a los sensores de carga, tal y como se presenta con más detalle en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, se puede aplicar un campo eléctrico de manera sustancialmente uniforme a todos los sitios de una matriz que tengan sensores de carga. Así pues, las polimerasas (u otros componentes de la reacción) que están en solución tendrán una probabilidad igual de ser transportadas a cualquier sensor de carga dado. En una realización alternativa, un campo eléctrico puede aplicarse a solo un subconjunto de sitios de sensores de carga que están presentes en una matriz. De este modo, el transporte ayudado por el campo eléctrico se puede utilizar para conectar selectivamente la polimerasa (u otro componente de la reacción) a algunos sensores de carga mejor que a otros. Además, si se desea, se puede aplicar una carga atractiva a un primer subconjunto de sitios de sensores de carga para transportar la polimerasa al primer subconjunto de sitios y, mientras tanto, se puede aplicar una carga repelente a un segundo subconjunto de sitios de sensores de carga para inhibir el transporte de las polimerasas a esos sitios o para retirar (p. ej., mediante la desorción o la degradación) la polimerasa del segundo subconjunto de sitios. De igual forma, se puede aplicar una carga repelente en las regiones intersticiales de una matriz que no contiene sensores de carga para inhibir el transporte de las polimerasas hacia las regiones intersticiales o para retirar (p. ej., mediante la desorción o la degradación) las polimerasas de las regiones intersticiales.

En muchas configuraciones, un amplificador que se utiliza para un sensor de carga ocupará sustancialmente más espacio que el propio sensor. Por ejemplo, el circuito de lectura puede ocupar un área de un dispositivo de detección

que está en cualquier valor de $2 \times 2 \mu\text{m}$ a $20 \times 20 \mu\text{m}$, mientras un transistor con un único nanocable puede ocupar tan solo $100 \times 500 \text{ nm}$. El tamaño y las dimensiones de una matriz de sensores de carga pueden, en algunas realizaciones, estar limitados por el espacio ocupado por varios amplificadores, por ejemplo, si un amplificador está presente para cada sensor de carga. La limitación puede superarse en determinadas realizaciones de los presentes equipo y métodos mediante la configuración de una matriz de sensores de carga de tal manera que cada amplificador está conectado operativamente a varios sensores de carga. Por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o más sensores de carga pueden estar conectados al mismo amplificador. Así pues, los sensores de carga pueden estar presente en una matriz a una densidad más alta que en una configuración donde hay una conectividad de uno a uno entre los amplificadores y los sensores de carga. Cuando está en funcionamiento, un amplificador puede estar asignado a la amplificación de la señal de solo uno de los muchos sensores de carga a los cuales está conectado (o lo estuvo alguna vez). Por ejemplo, la matriz de sensores de carga se puede cargar al ponerla en contacto con un fluido que contiene numerosos componentes de la reacción de un tipo concreto. Esta técnica de carga puede dar lugar a que un número sustancial de los sensores de carga estén conectados a más de un componente de la reacción de un tipo concreto y a que otros no estén cargados con ninguno de ese tipo de componente de la reacción. Entre los diferentes sensores de carga que están conectados a un amplificador común, un sensor único que está conectado a sólo un único componente de la reacción se puede diferenciar de los otros que están sobrecargados o sin cargar, y el amplificador puede estar asignado para que adquiera la señal únicamente de los sensores de carga cargados, mientras que no adquiere la señal de los otros sensores de carga a los cuales está (o estuvo) conectado.

En algunas realizaciones, cada uno de los sensores de carga tendrá capacidad para más de un componente de la reacción de un tipo concreto. Si se toma la polimerasa como ejemplo, cada sensor de carga puede tener capacidad para conectarse a varias moléculas de polimerasa al mismo tiempo. En tales casos, la polimerasa puede estar conectada a un resto repelente que ocupa un volumen de espacio que obstaculiza estéricamente que más de una de las polimerasas que están fijadas a otro resto repelente se conecten a cada uno de los sensores de carga. De igual forma, el resto repelente puede tener una polaridad de carga que impide electrostáticamente que más de una de las polimerasas que están fijadas a otro resto repelente se conecten al mismo sensor de carga.

Un resto repelente particularmente útil es un ácido nucleico. Un ácido nucleico repelente puede proporcionar una obstaculización estérica y electroestática para limitar la ocupación. Un ácido nucleico repelente es bastante idóneo para las polimerasas, enzimas para ácido nucleico, y otros componentes de la reacción que tienen una afinidad de fijación por los ácidos nucleicos. Sin embargo, se debe saber que este tipo de afinidad no es necesaria ya que se pueden utilizar métodos sintéticos para conectar los ácidos nucleicos repelentes a los componentes de la reacción, por ejemplo, mediante el uso de los conectores, los anclajes y las químicas de conexión presentados en la presente memoria o conocidos en la técnica. Para conseguir la ocupación deseada, se puede modular la longitud, la composición de la secuencia o la estructura secundaria del ácido nucleico repelente. Por ejemplo, se pueden utilizar ácidos nucleicos más largos cuando los sensores de carga tienen una capacidad relativamente elevada por el componente de la reacción al cual se conectará el sensor de carga. Los ácidos nucleicos más pequeños pueden ser suficientes para limitar la carga de los sensores de carga más pequeños (o cuando se utilizan componentes de la reacción relativamente grandes o componentes de la reacción muy cargados, lo que requiere así pues solo un pequeño incremento en las propiedades repelentes). Los ácidos nucleicos también son útiles como restos repelentes, ya que la secuencia del ácido nucleico se puede seleccionar para conseguir las propiedades deseadas de fijación a una polimerasa u otra enzima para ácido nucleico.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico repelente se puede compactar en una estructura de nanoesfera. Los métodos para compactar los ácidos nucleicos se conocen en la técnica (por ejemplo, tal y como se describe Bloomfield en *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6(3): 334-41 (1996) y en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2007/0099208 A1). Por ejemplo, se pueden utilizar un alcohol o una poliamina, tal como espermina o espermidina. Un ácido nucleico compactado tendrá una estructura que está empaquetada con más densidad que la estructura del ácido nucleico en ausencia de un agente compactante o condición compactante, y la estructura se parecerá típicamente a una esfera, bola o glóbulo. La generación de tales esferas de ácido nucleico compactado es útil para crear restos repelentes. Se pueden utilizar diferentes métodos para generar esferas del tamaño deseado, por ejemplo, mediante diferentes técnicas de compactación y/o modificando el número de copias en un amplicón. Por lo general, los amplicones compactados tienen un diámetro medio o anchura que oscila de aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$ a aproximadamente $5 \mu\text{m}$, por ejemplo, aproximadamente $0,1 \mu\text{m}$, aproximadamente $0,2 \mu\text{m}$, aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$, aproximadamente $1 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$, aproximadamente $3 \mu\text{m}$, aproximadamente $4 \mu\text{m}$ y aproximadamente $5 \mu\text{m}$.

Otras moléculas poliméricas son también útiles como restos repelentes, e incluyen, sin limitación, polietilenglicol, politenos, polipropileno, cloruro de polivinilo, Teflon, nilón, poliamidas, polietales, poliésteres, gomas de Buna, poliacrilatos, poliestireno y policlorotrifluoroeteno. Las perlas o partículas hechas de materiales de soporte sólido o geles también pueden funcionar como restos repelentes.

Un resto repelente puede permanecer conectado a un componente de la reacción mientras que el componente de la reacción participa en una reacción concreta que se ha de detectar mediante un sensor de carga al cual está conectado el componente de la reacción. Por ejemplo, un resto repelente que se fija a una polimerasa mientras la polimerasa está cargada y conectada a un sensor de carga puede permanecer conectado a la polimerasa en una posterior reacción de adición de nucleótidos que se detecta mediante el sensor de carga. Como alternativa, el resto

repelente se puede retirar del componente de la reacción después de que el componente de la reacción se haya conectado a un sensor de carga. Tomando de nuevo el ejemplo de una polimerasa, un resto repelente, tal como un ácido nucleico repelente, se puede retirar de la polimerasa antes de que la polimerasa participe en una reacción detectada con un ácido nucleico destinatario. Los restos repelentes que están fijados a una polimerasa u otro componente de la reacción se pueden retirar mediante las técnicas conocidas por los expertos en la materia para dar lugar a su eliminación. Por ejemplo, los restos fijados no covalentemente se pueden retirar mediante lavado o con el desplazamiento competitivo mediante el uso de otros restos que se fijan al componente de la reacción. Los restos fijados covalentemente se pueden retirar por medios químicos o físicos, tales como los presentados en la presente memoria con respecto a la escisión desde los anclajes. Los restos repelentes, una vez retirados de un componente de reacción, se pueden eliminar con lavados del sensor de carga al cual el componente de la reacción permanece conectado.

También se describen en la presente memoria los métodos en los que se pueden sobrecargar un sensor de carga que tiene una capacidad de más de un componente de la reacción de un tipo concreto, de tal manera que cada uno de los sensores de carga está conectado a varios de los componentes de la reacción y a continuación los componentes de la reacción se pueden retirar (o inactivar o degradarse) desde el sensor de carga, con lo que deja solo un único componente de la reacción activo conectado a cada uno de los sensores de carga. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un método para conectar componentes de la reacción a sensores de carga para crear anclajes escindibles entre cada componente de la reacción y el sensor de carga al cual está conectado. En algunos casos, los componentes de la reacción que se administran en un fluido pueden incluir precursores de anclajes escindibles, los sensores de carga pueden incluir precursores de anclajes escindibles, o tanto el componente de la reacción como el sensor de carga pueden tener precursores que reaccionan juntos para formar un anclaje escindible.

Los anclajes escindibles se pueden escindir mediante la rotura de enlace debido a procesos físicos o químicos. Por ejemplo, un método presentado en la presente memoria puede incluir una etapa de escisión de un anclaje escindible por escisión fotoquímica, escisión electroquímica, campo eléctrico, agitación mecánica, escisión química o calor. Los anclajes escindibles útiles y sus precursores incluyen los utilizados para la modificación de proteínas y están disponibles en el comercio, por ejemplo, por Thermo Fisher (Waltham, MA) o Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Se pueden utilizar otros métodos para retirar uno o varios componentes de la reacción desde un sensor de carga. Por ejemplo, la retirada se puede conseguir mediante la degradación de uno o varios componentes de la reacción desde cada sensor de carga. La degradación se puede conseguir mediante métodos físicos, tales como calor, fotooxidación, ultrasonidos o similares. También se puede realizar la degradación química, por ejemplo, mediante cambios de pH, desnaturalizantes químicos, proteasas o similares. En algunos casos, la extensión de la degradación se puede modular al poner en contacto los componentes de la reacción conectados al sensor con un resto protector. La cantidad del resto protector suministrada a una matriz de sensores de carga se puede titular para dar lugar a la fijación de un único componente de la reacción, de media, por sensor de carga. Cuando la degradación se lleva a cabo posteriormente, se degradará todo salvo el componente de la reacción protegido conectado a cada sensor de carga. Esto dejará un único componente de la reacción conectado a cada sensor de carga. El resto protector puede permanecer fijado al componente de la reacción a medida que participa en una reacción que es detectada por el sensor de carga, o se puede retirar el resto protector. En algunos casos, la degradación puede ocurrir mediante la fijación del sitio activo de la polimerasa a un análogo oligonucleotídico que es activo desde el punto de vista químico o fotoquímico. Se puede aplicar un tratamiento químico o fotoquímico para entrecruzar el análogo oligonucleotídico a la polimerasa. Como resultado, esta polimerasa puede volverse incapaz de aceptar un ácido nucleico destinatario, o cebador, o la polimerasa puede volverse incapaz de cambiar la conformación (p. ej., cambios de conformación abierto-cerrado) que hubiera sido detectada por el sensor de carga.

Un ejemplo de un resto protector útil es un ácido nucleico, tal como una nanoesfera de ADN. Por ejemplo, se puede utilizar un ácido nucleico para que se fije a una polimerasa o a otra enzima para ácido nucleico para proporcionar estabilidad contra la desnaturalización o la modificación química. Un ácido nucleico también puede proporcionar un bloqueo estérico que impide que las proteasas tengan acceso a una polimerasa que está fijada a un sensor de carga. Otro ejemplo es un ADN monocatenario hibridado a un cebador; en este caso, el extremo 3' del cebador se fijará al centro catalítico de la polimerasa, lo que impide la fijación de los restos reactivos de desactivación de la polimerasa. Un ejemplo más de un resto protector es una proteína, tal como un anticuerpo, que actúa de manera selectiva sobre una polimerasa específica. La proteína o anticuerpo puede proteger contra la modificación química o proporcionar un bloqueo estérico que impide que las proteasas tengan acceso a la polimerasa. Si es deseable retirar el anticuerpo, el anticuerpo se podría retirar mediante el uso de, por ejemplo, calor. Una temperatura adecuada sería una en la que el anticuerpo ya no está fijado de manera estable a la polimerasa, pero en la que la polimerasa es estable. Otros materiales que se han ejemplificado en la presente memoria para ser usados como restos repelentes pueden servir como restos protectores.

La degradación, inactivación o retirada de los componentes de la reacción en exceso desde los sensores de carga se puede realizar con o sin el seguimiento de los sensores de carga para determinar el alcance de la degradación o de la retirada. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un procedimiento para retirar uno o varios componentes de la reacción de un tipo concreto de los sensores de carga modificados puede incluir las etapas de (i) retirar uno o varios de los componentes de la reacción de cada uno de los sensores de carga modificados, (ii) seguir los sensores de carga para que la presencia de numerosos componentes de la reacción se distinga de la presencia de un único

componente de la reacción, y (iii) interrumpir la retirada para dejar tan solo uno de los componentes de la reacción fijados a cada uno de los sensores de carga modificados. El estado del sensor de carga se puede seguir mediante la detección de cambios en la señal del sensor de carga. Como alternativa o adicionalmente, se puede utilizar un sensor diferente para detectar la presencia o la ausencia de los componentes de la reacción en la superficie del sensor de carga. Se puede utilizar cualquiera de las muchas modalidades de detección, que incluyen, por ejemplo, la fluorometría para detectar marcadores fluorescentes en los componentes de la reacción, métodos de dispersión óptica, métodos de absorbancia para detectar cromóforos y otros métodos de detección analítica conocidos en la técnica que pertenecen al campo de la detección de proteínas y de otros componentes de la reacción.

Un método de la presente descripción puede incluir una etapa de proporcionar uno o varios ácidos nucleicos destinatarios a un soporte sólido que comprende al menos un sensor de carga. En determinadas realizaciones, el sensor de carga se habrá conectado previamente a otro componente de la reacción que reaccionará con el uno o varios ácidos nucleicos en una reacción deseada, ejemplos de los cuales incluyen enzimas para ácidos nucleicos, tales como polimerasas. En otras realizaciones, el ácido o ácidos nucleicos destinatarios se pueden administrar a un sensor de carga antes o al mismo tiempo que los otros componentes de la reacción (p. ej., enzimas para ácidos nucleicos o polimerasas) se administran al sensor o sensores de carga.

Los ácidos nucleicos destinatarios que se utilizan en un método o equipo de la presente descripción pueden estar compuestos de ADN, ARN o análogos de los mismos. La fuente de los ácidos nucleicos destinatarios pueden ser ADN genómico, ARN mensajero u otros ácidos nucleicos de fuentes nativas. En algunos casos, los ácidos nucleicos destinatarios que proceden de tales fuentes se pueden amplificar antes de ser utilizados en un método o composición en la presente memoria. Se puede utilizar cualquiera de las muchas técnicas de amplificación conocidas, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (ACR), amplificación por desplazamiento múltiple (ADM) o amplificación por cebado aleatorio (ACA). Se debe saber que es optativa la amplificación de los ácidos nucleicos destinatarios antes de su uso en un método o equipo presentado en la presente memoria. De tal manera, los ácidos nucleicos destinatarios no se amplificarán antes de ser usados en algunas realizaciones de los métodos y las composiciones presentadas en la presente memoria. Los ácidos nucleicos destinatarios pueden proceder optativamente de genotecas sintéticas. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden tener composiciones de ADN o ARN nativas o pueden ser análogos de los mismos.

Las muestras biológicas de ejemplo de las cuales pueden proceder los ácidos nucleicos destinatarios incluyen, por ejemplo, las de un mamífero, tal como un roedor, ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate, primate humano o no humano; una planta, tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, colza o soja; un alga, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nemátodo, tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto, tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de la fruta, abeja o araña; un pez, tal como el pez cebra; un reptil; un anfibio, tal como un sapo o *Xenopus laevis*; un *Dictyostelium discoideum*; un hongo, tal como *Pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*; o un *Plasmodium falciparum*. Los ácidos nucleicos destinatarios también pueden proceder de un procariota, tal como una bacteria, *Escherichia coli*, estafilococos o *Mycoplasma pneumoniae*; una arquea; un virus tal como el virus de la hepatitis C, virus de Ébola o el virus de la inmunodeficiencia humana; o un viroide. Los ácidos nucleicos destinatarios pueden proceder de un cultivo o una población homogéneos de los organismos de más arriba o, como alternativa, de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Los ácidos nucleicos destinatarios no necesitan proceder de fuentes naturales y pueden, en cambio, sintetizarse con las técnicas conocidas. Por ejemplo, las sondas de expresión génica o las sondas de genotipado se pueden sintetizar y utilizar en los métodos y equipo presentados en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos destinatarios se pueden obtener como fragmentos de uno o varios ácidos nucleicos más grandes. Se puede llevar a cabo la fragmentación mediante el uso de cualquiera de una serie de técnicas conocidas en el campo, entre ellas, por ejemplo, nebulización, ultrasonidos, escisión química, escisión enzimática o cizalladura física. La fragmentación también puede ser resultado del uso de una técnica de amplificación concreta que produce amplicones al copiar solo una parte de un ácido nucleico más grande. Por ejemplo, la amplificación por PCR produce fragmentos que tienen un tamaño definido por la longitud de la secuencia de nucleótidos sobre la plantilla original que está entre las localizaciones en las que los cebadores flanqueantes se hibridan durante la amplificación.

Una población de ácidos nucleicos destinatarios o amplicones de los mismos puede tener una longitud media de hebra que se desea o que es idónea para una aplicación concreta de los métodos o del equipo presentado en la presente memoria. Por ejemplo, la longitud media de la hebra puede ser de menos de aproximadamente 100.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos. Como alternativa o adicionalmente, la longitud media de la hebra puede ser mayor de aproximadamente 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos o 100.000 nucleótidos. La longitud media de la hebra de una población de ácidos nucleicos destinatarios, o amplicones de los mismos, puede estar en un margen entre un valor máximo y mínimo presentado más arriba.

En algunos casos, una población de ácidos nucleicos destinatarios se puede producir en las condiciones, o si no se puede configurar, para que tengan una longitud máxima para sus miembros. Por ejemplo, la longitud máxima para los miembros que se utilizan en una o varias etapas de un método presentado en la presente memoria o que están presentes en una composición concreta puede ser de menos de aproximadamente 100.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 500 nucleótidos, 100 nucleótidos o 50 nucleótidos. Como alternativa o adicionalmente, una población de ácidos nucleicos destinatarios, o amplicones de los mismos, se puede producir en las condiciones, o si no se puede configurar, para que tenga una longitud mínima para sus miembros. Por ejemplo, la longitud mínima para los miembros que se utilizan en una o varias etapas de un método presentado en la presente memoria o que están presentes en una composición concreta puede ser de más de aproximadamente 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1.000 nucleótidos, 5.000 nucleótidos, 10.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos o 100.000 nucleótidos. La longitud de la hebra máxima y mínima para los ácidos nucleicos destinatarios en una población puede estar en un margen entre un valor máximo y mínimo presentado más arriba.

También se describe en la presente memoria un método para detectar un nucleótido. El método puede incluir las etapas de (a) aportar una proteína de fijación a nucleótidos (p. ej., una polimerasa) anclada a un sensor de carga en el soporte sólido; (b) aportar uno o varios nucleótidos marcados, por medio de lo cual la presencia del marcador puede ser detectada por el sensor de carga cuando el marcador está cercano al sensor de carga; y (c) detectar la fijación del nucleótido marcado a la proteína mediante el uso del sensor de carga.

La fijación de un nucleótido a una enzima de fijación a ácido nucleico, tal como una polimerasa, se puede detectar basándose en la atracción de un marcador con carga a la enzima, lo que a su vez provoca una perturbación detectable del campo que rodea al sensor de carga al cual está conectada la enzima. Los marcadores de carga de ejemplo se han presentado anteriormente en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el marcador con carga está conectado en la posición del fosfato β o γ del nucleótido. Una ventaja que tiene conectar el marcador a la posición del fosfato β o γ del nucleótido es que el marcador puede retirarse mediante la actividad catalítica de la polimerasa cuando se incorpora el nucleótido en una hebra naciente. Sin embargo, el marcador no necesita ser retirado mediante la actividad de la polimerasa. Así pues, el marcador puede estar conectado a cualquiera de una serie de posiciones en un nucleótido, que incluye, por ejemplo, mediante un conector al resto de la base de un nucleótido (véase, por ejemplo, las posiciones de los nucleótidos y los conectores presentados en las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.427.673; 7.414.116 y 7.057.026 y las publicaciones de patente internacional en el marco PCT WO 91/06678 y WO 07/123744). Un marcador también puede estar conectado a la posición del fosfato α del nucleótido o en el resto ribosa del nucleótido. Un marcador conectado a cualquiera de los muchos restos de un nucleótido puede ser escindido optativamente desde el nucleótido después de ser detectado, por ejemplo, mediante la escisión de un conector con carga.

Un marcador utilizado en un método o equipo presentado en la presente memoria puede además incluir un resto oligonucleotídico. Los restos oligonucleotídicos de ejemplo incluyen ADN, ARN y PNA, tal y como se ha presentado más arriba en la presente memoria. Tal y como se ejemplifica anteriormente en la presente memoria, un resto oligonucleotídico puede ser útil para hibridarse a un anclaje de ácido nucleico u otro ácido nucleico para localizar la perturbación del campo eléctrico que se produce con una distancia deseada de un sensor de carga. El resto oligonucleotídico se puede producir como una estructura intermedia entre el nucleótido y un resto cargado. Sin embargo, el resto con carga es optativo y no necesita estar localizado en un extremo del resto oligonucleotídico que está distal al punto de conexión al nucleótido. Aunque en la presente memoria se ejemplifican varias realizaciones con respecto a los análogos de nucleótidos que tienen restos oligonucleotídicos que interaccionan con los anclajes de ácido nucleico, se entenderá que los análogos de nucleótidos pueden tener otros componentes conectores en lugar de restos oligonucleotídicos. Los componentes conectores pueden comprender un miembro de una pareja de fijación que interacciona con otro miembro que es parte de un anclaje.

En algunas realizaciones, diferentes tipos de nucleótidos pueden estar conectados a diferentes marcadores. Así pues, las diferencias de señal que surgen de los marcadores se pueden utilizar para distinguir los diferentes tipos de nucleótidos. Esto puede ser particularmente útil para los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos en donde varios tipos diferentes de nucleótidos se administran a una polimerasa de un modo tal que varios tipos diferentes de nucleótidos están presentes en paralelo durante un acontecimiento de detección. Por ejemplo, cuatro nucleótidos diferentes que tienen cuatro restos de carga diferentes se pueden utilizar tal y como se ejemplificó previamente en la presente memoria con respecto a la figura 2 y a la figura 3. Como alternativa o adicionalmente, los restos de marcadores pueden contener restos oligonucleotídicos que se hibridan a diferentes secuencias de anclaje para producir señales mutuamente distintas en un sensor de carga. En algunas realizaciones, varios nucleótidos marcados que se utilizan en un método presentado en la presente memoria tendrán diferentes marcadores de carga, respectivamente, pero cada uno de dichos nucleótidos marcadores tendrá un resto oligonucleotídico que es capaz de hibridarse a la misma secuencia de anclaje inmovilizada. Tal y como se presenta anteriormente en la presente memoria, diferentes análogos de nucleótido pueden tener restos oligonucleotídicos de diferente longitud o, como alternativa, dos o más de los análogos de nucleótido pueden tener restos oligonucleotídicos que tienen la misma longitud.

Los diferentes nucleótidos no necesitan tener marcadores diferentes. Los diferentes nucleótidos se pueden administrar a una reacción por separado, de tal manera que los nucleótidos se distingan basándose en el

conocimiento de cuándo y dónde se han administrado. Por ejemplo, una reacción de secuenciación puede incluir adiciones secuenciales de cuatro nucleótidos independientes por ciclo, con lavados entre la adición de cada nucleótido. Esta administración por separado de los nucleótidos se puede realizar si los diferentes nucleótidos están marcados únicamente o están marcados de manera uniforme.

- 5 Un método de secuenciación de ácidos nucleicos se puede realizar mediante (a) el aporte de una polimerasa anclada a un sensor de carga en soporte sólido; (b) el aporte de uno o varios nucleótidos marcados, gracias a lo cual se puede detectar la presencia del marcador mediante el sensor de carga cuando el marcador está cercano al sensor de carga; y (c) la detección de la incorporación del nucleótido marcado en una hebra naciente complementaria a un ácido nucleico de plantilla mediante el uso del sensor de carga. Se pueden detectar numerosos
10 acontecimientos de incorporación en sucesión para determinar la secuencia. Como alternativa, solo se detecta un único acontecimiento de incorporación en cada hebra naciente, y esta información se combina con el conocimiento de la secuencia para la hebra naciente (o la plantilla a la cual se hibrida) para llegar a la secuencia.

15 En las realizaciones multiplexadas, el soporte sólido puede incluir numerosos sensores de carga que están anclados a las polimerasas, y el método incluye una etapa de detección de la incorporación de un nucleótido marcado en una hebra naciente complementaria a un ácido nucleico de plantilla en cada polimerasa de las numerosas polimerasas. Las numerosas polimerasas utilizadas en una realización multiplexada pueden incluir optativamente al menos dos tipos diferentes de polimerasa. Los diferentes tipos de polimerasa se pueden seleccionar para producir señales mutuamente distinguibles por los sensores de carga cuando se incorpora el mismo tipo de nucleótido en una hebra naciente del ácido nucleico. De este modo, una matriz de sensores de carga que tiene diferentes polimerasas
20 conectadas (p. ej., una por sensor de carga) puede distinguir una mayor variedad de secuencias de ácido nucleico u ofrecer una mayor sensibilidad de lo que estaría disponible cuando se usa una matriz que tiene solo un tipo de polimerasa conectada a los sensores de carga. Por ejemplo, cuando se secuencia la misma plantilla mediante la acción de dos polimerasas diferentes, se generarán dos series diferentes de señales. Las dos series de señales se pueden comparar o, si no, se pueden utilizar en combinación para dar a conocer una secuencia de nucleótidos más exacta de lo que se podría obtener con solo una serie de señales desde solo un tipo de polimerasa.

Una matriz tal y como se describe en la presente memoria, por ejemplo, que se ha producido mediante un método presentado en la presente memoria, se puede utilizar para cualquiera de una serie de aplicaciones. Una aplicación particularmente útil es la secuenciación de ácidos nucleicos. Un ejemplo es la secuenciación basada en la síntesis (SBS). En la SBS, se sigue la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de una plantilla de ácido nucleico
30 (p. ej., un ácido nucleico destinatario o amplicón del mismo) para determinar la secuencia de nucleótidos de la plantilla. El proceso químico subyacente puede ser la polimerización (p. ej., que está catalizada por una enzima polimerasa). En una determinada realización de SBS basada en polimerasas, los nucleótidos se añaden a un cebador (con lo que se extiende el cebador) de una forma dependiente de la plantilla, de tal manera que la detección del orden y del tipo de nucleótidos añadidos al cebador se puede utilizar para determinar la secuencia de la plantilla.
35 Numerosas plantillas diferentes en diferentes sensores de carga de una matriz presentada en la presente memoria se pueden someter a una técnica de SBS en las condiciones en las que los acontecimientos que se producen para las diferentes plantillas se pueden diferenciar debido a su posición en un sensor de carga específico de la matriz.

Las celdas de flujo aportan un formato cómodo para albergar una matriz que se produce mediante los métodos de la presente descripción y que está sujeta a una SBS u otra técnica de detección que implica que los reactivos se
40 administren repetidamente en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o varios nucleótidos (que tienen optativamente marcadores con carga) se pueden hacer fluir en/a través de una celda de flujo que alberga una matriz de sensores de carga, en donde cada uno tiene una polimerasa conectada a él a la cual está fijada una plantilla de ácido nucleico. Se pueden detectar los sitios de una matriz en los que la extensión del cebador provoca la incorporación de un nucleótido. Optativamente, los nucleótidos pueden además incluir una propiedad de terminación reversible que termina la extensión del cebador posterior una vez que se ha añadido un nucleótido a un
45 cebador. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene un resto terminador reversible se puede añadir a un cebador de tal manera que la posterior extensión no se puede producir hasta que se administra un agente de desbloqueo para retirar el resto. Así pues, para las realizaciones que utilizan la terminación reversible, se puede administrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Se
50 pueden llevar a cabo los lavados entre las diferentes etapas de administración. A continuación, el ciclo se puede repetir n veces para que n nucleótidos extiendan el cebador, mediante lo cual se detecta una secuencia de longitud n. Los procedimientos de ejemplo de la SBS y los sistemas fluidicos que se pueden adaptar con facilidad para ser usados con una matriz producida por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley et al., *Nature*, 456: 53-59 (2008), la solicitud de patente internacional WO 04/018497; la patente de los EE. UU. US 7.057.026; la solicitud de patente internacional WO 91/06678; la solicitud de patente internacional WO 07/123744; y las patentes de los EE. UU. n.^{os} US 7.329.492; US 7.211.414; US 7.315.019; US 7.405.281 y US 2008/0108082.

Las reacciones de secuenciación basadas en la ligación también son útiles e incluyen, por ejemplo, las descritas en Shendure et al. *Science* 309: 1728-1732 (2005), y las patentes de los EE. UU. n.^{os} US 5.599.675 y US 5.570.341. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación basada en la hibridación, tal y como se describe, por ejemplo, en Bains et al., *Journal of Theoretical Biology* 135 (3), 303-7 (1988); Drmanac et al., *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor et al., *Science* 251 (4995), 767-773 (1995) y en la solicitud de patente internacional WO 1989/10977. En ambos procedimientos de secuenciación basada en la ligación y de secuenciación
60

basada en la hibridación, los ácidos nucleicos destinatarios (o amplicones de los mismos) se someten a ciclos repetidos de administración y detección de oligonucleótidos. Tales métodos se pueden modificar con facilidad para detectar cambios conformacionales de la ligasa o para detectar oligonucleótidos marcados con carga en lugar de la detección fluorescente de los marcadores ópticos descrita en los métodos publicados.

5 Otra aplicación útil para una matriz que se describe en la presente memoria, por ejemplo, que se ha producido mediante un método presentado en la presente memoria, es el análisis de la expresión génica. La expresión de los genes se puede detectar o cuantificar mediante el uso de técnicas de secuenciación de ARN, tales como las denominadas secuenciación digital de ARN. Las técnicas de secuenciación de ARN se pueden llevar a cabo mediante el uso de metodologías de secuenciación conocidas en la técnica, tales como las presentadas más arriba, salvo que la detección de fluorescencia de los nucleótidos marcados ópticamente se puede remplazar por los métodos de detección basados en la carga presentados en la presente memoria. La expresión génica también se puede detectar o cuantificar mediante el uso de las técnicas de hibridación llevadas a cabo mediante la hibridación directa a una matriz o mediante el uso de un ensayo multiplexado, cuyos productos se detectan en una matriz. Los ensayos de biología molecular de ejemplo que se pueden utilizar para los análisis de expresión y de genotipado basados en una matriz se describen en las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.582.420; 6.890.741; 6.913.884 o 6.355.431, o en las publicaciones de patente de los EE. UU. n.ºs 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o US 2005/0181440 A1. Estos métodos pueden adaptarse con facilidad mediante el remplazo de los marcadores ópticos y la detección de fluorescencia con las técnicas de detección basadas en la carga, y optativamente en los marcadores con carga presentados en la presente memoria.

20 Un método de secuenciación de ácidos nucleicos tal y como se describe en la presente descripción puede incluir las etapas de (a) aporte de una polimerasa anclada a un sensor de carga en soporte sólido; (b) aporte de uno o varios nucleótidos marcados, mediante los cuales la presencia del marcador puede ser detectada por el sensor de carga cuando el marcador está cerca del sensor de carga, en donde uno o varios nucleótidos marcados tienen restos terminadores reversibles; (c) detección de la incorporación de uno o varios nucleótidos marcados en una hebra naciente complementaria a un ácido nucleico de plantilla mediante el uso de un sensor de carga, con lo que se forma una hebra naciente terminada reversiblemente; (d) modificación de la hebra naciente terminada con un nucleótido reversible para hacer que la hebra naciente sea capaz de incorporar otro nucleótido; y (e) repetición de (b) hasta (d) para obtener una secuencia del ácido nucleico de la plantilla.

30 El uso de nucleótidos de terminación reversible en una reacción de secuenciación ofrece ventajas relacionadas con el control de la etapa para el procedimiento de extensión de la polimerasa que, si no, sería continua. Este control de la etapa puede ser útil para incrementar la cantidad de tiempo que una hebra de ácido nucleico recién extendida se pasa en un estado detectable. Por ejemplo, un marcador con carga que está en un nucleótido de terminación reversible se puede mantener en una hebra naciente después de haber sido añadido por una polimerasa y hasta que una cantidad deseada de la señal se acumula por el sensor de carga. Esto puede permitir que se incremente la señal recogida. A continuación, el procedimiento de secuenciación puede proseguir con la adición del desbloqueante seguido de ciclos posteriores de adición de nucleótidos.

40 Otra ventaja del control de etapa conferido por el uso de nucleótidos de terminación reversible es la capacidad para sincronizar un conjunto de componentes de la reacción que se someten a la misma reacción. Así pues, un método de secuenciación presentado en la presente memoria se puede llevar a cabo para numerosas copias del mismo ácido nucleico fijadas a numerosas polimerasas en el sitio en donde está localizado un sensor de carga (p. ej., las muchas polimerasas pueden estar conectadas a un único sensor de carga). La etapa de detección utilizada para identificar el nucleótido añadido durante cada ciclo de actividad de la polimerasa se puede sincronizar con eficacia mediante el uso de nucleótidos de terminación reversible. Aunque los nucleótidos de terminación reversible proporcionan ventajas para la detección en conjunto, se debe saber que los métodos de secuenciación que utilizan nucleótidos de terminación reversible se pueden utilizar cuando está conectada una única polimerasa a cada uno de los sensores de carga.

50 Se puede preparar un conjunto de reacciones de secuenciación para que incluya numerosas polimerasas conectadas a un sensor de carga común, en donde las polimerasas están fijadas a ácidos nucleicos destinatarios que tienen la misma secuencia de plantilla y un cebador (o hebra naciente) con la misma secuencia. Las polimerasas pueden estar conectadas al sensor de carga tal y como se presenta anteriormente en la presente memoria. A continuación, se pueden poner en contacto con las polimerasas uno o varios ácidos nucleicos destinatarios que comprenden numerosas repeticiones de la misma secuencia de plantilla. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico destinatario que tiene repeticiones concatenadas de la secuencia de plantilla se puede administrar a las polimerasas en el sitio concreto. En este caso, la subunidad de la secuencia que forma cada repetición puede funcionar como una secuencia de la plantilla independiente. Optativamente, se puede escindir el ácido nucleico que codifica la repetición concatenada para que se formen moléculas diferentes en las que cada una tiene una única secuencia de plantilla. Cada una de estas moléculas diferentes se puede secuenciar entonces con las polimerasas en el sitio. El ácido nucleico que codifica la repetición concatenada se puede crear mediante la amplificación por círculo rodante (ACR), por ejemplo, tal y como se describe en Lizardi et al., *Nat. Genet.* 19: 225-232 (1998) y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2007/0099208 A1.

60 También se describe un método de secuenciación de ácidos nucleicos que incluye las etapas de (a) aportar una

polimerasa anclada a un sensor de carga en soporte sólido; (b) poner en contacto la polimerasa con un ácido nucleico plantilla y uno o varios tipos diferentes de nucleótidos en las condiciones en las que la polimerasa cataliza la adición de uno o varios tipos de nucleótidos para formar un complemento de ácido nucleico de la plantilla de ácido nucleico, y en donde la adición de uno o varios tipos diferentes de nucleótidos produce un cambio de señal conformacional desde la polimerasa que se detecta mediante el sensor de carga; (c) detectar un cambio en la señal de la polimerasa mediante el uso del sensor de carga; y (d) determinar la velocidad, polaridad, amplitud o duración del tiempo del cambio en la señal por la adición de uno o varios tipos diferentes de nucleótidos, mediante lo cual se determina una secuencia de nucleótidos para el ácido nucleico de plantilla.

En realizaciones concretas, se puede determinar una secuencia de nucleótidos de una plantilla de ácido nucleico basándose en los cambios conformacionales que se producen en una enzima para ácido nucleico, tal como una polimerasa. La capacidad de distinguir los cambios conformacionales que se producen para cada tipo de nucleótido con el que interacciona la enzima y de determinar la secuencia de los cambios se puede utilizar para determinar la secuencia del ácido nucleico. Por ejemplo, una polimerasa que añade nucleótidos secuencialmente a una hebra de ácido nucleico naciente sufre cambios conformacionales con cada nucleótido añadido. Tal y como se presenta con más detalle en la presente memoria, los cambios conformacionales que se producen para cada tipo de nucleótido que se añade se pueden distinguir mediante un sensor de carga (o basándose en el conocimiento de que el nucleótido o nucleótidos se administran fluidicamente al sustrato en donde se tiene que vigilar la secuenciación) y la secuencia de estos cambios se puede detectar para determinar la secuencia del ácido nucleico.

Una enzima para ácido nucleico puede estar marcada para producir una o varias señales indicativas de un cambio conformacional en la enzima a medida que interacciona con uno o varios reactantes, tales como un ácido nucleico o nucleótido. Una polimerasa puede estar marcada conformacionalmente de tal manera que la actividad de la polimerasa se pueda vigilar mediante la detección del movimiento alostérico de la carga. Por ejemplo, una polimerasa se puede marcar conformacionalmente para permitir la detección de una señal indicativa de la fijación del nucleótido, una señal indicativa de la adición de un nucleótido a una molécula de ácido nucleico en crecimiento, o una señal indicativa de un cambio intermedio de la conformación de la polimerasa entre la fijación y la catálisis. En consecuencia, una polimerasa puede incluir al menos un resto de marcador no natural que se detecta en el sensor de carga. La polimerasa puede estar manipulada genéticamente para que tenga cargas negativas y positivas que aumenten al máximo el cambio de la carga por unidad de volumen a través de los movimientos alostéricos. Si este volumen unitario está cercano al sensor de carga, este movimiento se puede detectar con facilidad. En realizaciones concretas, una señal detectada por un sensor de carga de una polimerasa marcada conformacionalmente puede distinguir entre un acontecimiento de fijación y un acontecimiento catalítico. Sin embargo, tal distinción puede no ser necesaria para algunas realizaciones y la señal puede ser simplemente indicativa de la adición global de un nucleótido. Como alternativa o adicionalmente, la señal puede distinguir entre la fijación de un nucleótido emparejado a la base correcta y la fijación de un nucleótido emparejado a la base incorrecta.

Un resto marcador particularmente útil que se puede conectar a una polimerasa o a otra enzima para ácido nucleico utilizada en un método o equipo presentado en la presente memoria es un marcador con carga negativa, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, un grupo fosfato, grupo carboxilo, aminoácido, DMT y/o FMOC. También son útiles los marcadores con carga positiva que incluyen, por ejemplo, una amina primaria. Los marcadores intrínsecos, tales como las cadenas laterales de aminoácidos o las modificaciones postraduccionales que se producen de forma natural (p. ej., fosforilación, adición de flavina, reducción de disulfuros o similares) también pueden proporcionar restos útiles para la detección en un método o equipo presentado en la presente memoria.

En algunas realizaciones se puede utilizar un análogo de nucleótido que se incorpora a una hebra de polinucleótido gracias a una polimerasa a una velocidad que, cuando se mide, es diferente de la velocidad a la cual se incorpora otro nucleótido en la hebra gracias a la polimerasa. Otro análogo de nucleótido útil es uno que se fija a una polimerasa a una velocidad que, cuando se mide, es diferente de la velocidad a la que otro nucleótido se fija a la polimerasa. También es útil un análogo de nucleótido que provoca un cambio conformacional de una polimerasa a una velocidad que, cuando se mide, es diferente de la de otro nucleótido. La velocidad relativa de fijación, incorporación o cambio conformacional de la polimerasa para un análogo de nucleótido se puede medir con respecto a un nucleótido natural que tiene el mismo compañero de emparejamiento de bases de Watson y Crick, o respecto a otros nucleótidos que se utilizan en la reacción de síntesis de ácidos nucleicos. La velocidad relativa puede ser más rápida o más lenta para el análogo de nucleótido.

De acuerdo con realizaciones concretas, una polimerasa u otra enzima para ácido nucleico se puede marcar conformacionalmente. La marcación conformacional de las enzimas para ácido nucleico proporciona ventajas para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos. Las moléculas marcadas conformacionalmente, y los métodos para fabricarlas y utilizarlas, se ejemplificarán a continuación con respecto a las polimerasas marcadas. Se entenderá que se pueden fabricar y se pueden utilizar otras enzimas para ácido nucleico, tales como las exonucleasas y las transcriptasas inversas, de manera similar.

Las polimerasas sufren cambios conformacionales en el transcurso de la síntesis de un polímero de ácido nucleico. Por ejemplo, las polimerasas sufren un cambio conformacional desde una conformación abierta a una conformación cerrada tras la fijación de un nucleótido. Así pues, una polimerasa que está fijada a una plantilla de ácido nucleico y

a un cebador en crecimiento está en lo que se denomina en la técnica una conformación «abierta». Una polimerasa que está fijada a una plantilla de ácido nucleico, con el cebador, y con un nucleótido correctamente emparejado por cada base, está en lo que se denomina en la técnica una conformación «cerrada». A un nivel estructural más detallado, la transición desde la conformación abierta a la cerrada se caracteriza por el movimiento relativo dentro de la polimerasa que da lugar a que el dominio «pulgar» y el dominio «dedos» estén más cerca el uno del otro. En la conformación abierta, el dominio pulgar está apartado del dominio dedos, muy íntimamente relacionado con la apertura y el cierre de la palma de una mano. En diferentes polimerasas, la distancia entre la punta del dedo y el pulgar puede cambiar hasta 30 Å entre las conformaciones «abierta» y «cerrada». La distancia entre la punta del dedo y el resto de los dominios de la proteína puede también cambiar hasta 10 Å. Se debe saber que se pueden producir también cambios más grandes y que se pueden explotar en un método presentado en la presente memoria, de tal manera que se pueda detectar un cambio que es mayor de 10 Å. Además, se pueden detectar cambios más pequeños, entre ellos los que son de menos de 10, 8, 6, 4 o 2 Å, siempre y cuando el cambio de la distancia sea suficiente para ser detectable con el uso de un sensor de carga.

En realizaciones concretas, un marcador con carga que está conectado a un dominio dedos puede estar conectado a un resto en la posición 376 o los restos dentro de un radio de 5 Å desde la posición 376 de la ADN polimerasa de $\Phi 29$, y un marcador que está conectado al dominio pulgar u otro dominio puede estar conectado a un resto en la posición 535, 203, 510, 564 o los restos dentro de un radio de 5 Å desde estas posiciones de la ADN polimerasa de $\Phi 29$. Los marcadores pueden estar conectados a las posiciones y utilizar los métodos presentados en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2011/0312529 A1; la patente de los EE. UU. n.º US 6.908.763 o la solicitud de patente internacional WO 2010/068884 A2.

Mediante el uso de un marcador conformacional, se puede detectar un cambio de conformación de una polimerasa, por ejemplo, desde una conformación abierta a una conformación cerrada. Se puede utilizar cualquier marcador que produzca una señal de carga que responda a un cambio de la estructura, forma o disposición de los restos aminoacídicos, tales como los cambios que se producen entre las conformaciones abierta y cerrada de una polimerasa.

Un marcador con carga puede estar conectado a una polimerasa, por ejemplo, mediante un enlace covalente. Como alternativa o adicionalmente, una sonda se puede conectar a otra molécula que esté muy cerca de una polimerasa, de tal manera que un cambio conformacional de la polimerasa provoca un cambio en la señal desde la sonda. Por ejemplo, la polimerasa puede estar conectada a un sensor de carga y el sensor de carga puede tener una sonda que es capaz de interactuar con la polimerasa de una manera que las señales desde la sonda cambian en respuesta a los cambios conformacionales de la polimerasa. En una realización concreta, un marcador con carga puede estar conectado a una polimerasa de manera específica de sitio mediante la introducción de un resto de cisteína en una posición deseada de la polimerasa y a continuación se modifica la polimerasa con un marcador que tiene un resto que reacciona específicamente con el grupo de azufre de la cisteína, en donde un resto reactivo ejemplar es un resto reactivo de maleimida. También se pueden introducir marcadores en una polimerasa u otra enzima para ácido nucleico mediante la separación de las inteínas, tal y como está descrito en Yang et al. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 11644-11645 (2009). Los marcadores se pueden introducir también en las enzimas para ácidos nucleicos mediante aminoácidos no naturales incluidos en el código genético. Se describe un ejemplo en Fleissner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 21637-42 (2009).

En algunas realizaciones, uno o varios anclajes pueden estar conectados a una polimerasa en las posiciones de la polimerasa donde los cambios conformacionales se transmiten a un sensor de carga al cual están conectados también los anclajes. Por ejemplo, los cambios conformacionales pueden provocar una perturbación que se transmite por uno o varios anclajes conductivos a un sensor de carga. En algunos casos, una única polimerasa puede estar conectada a un sensor de carga mediante dos o más anclajes. En esta configuración, los cambios en la conformación de la polimerasa pueden alterar las posiciones relativas de dos o más anclajes, lo que a su vez puede producir alteraciones del campo que se pueden detectar mediante el sensor de carga. Uno o varios anclajes pueden estar conectados selectivamente a un sitio de una polimerasa mediante el uso de los métodos conocidos de mutagénesis, modificación química, o ambos. Por ejemplo, se pueden introducir una o varias cisteínas como una o varias mutaciones específicas de sitio en una polimerasa manipulada genéticamente para permitir la conexión de un anclaje reactivo con azufre a las cisteínas. Los puntos de conexión de ejemplo incluyen los presentados en la presente memoria y en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2011/0312529 A1 para la conexión de marcadores conformacionales.

Además de los cambios conformacionales presentados en la presente memoria y si no conocidos en la técnica, las polimerasas sufren varias transiciones en el transcurso de la adición de un nucleótido a una hebra naciente. Las transiciones se pueden distinguir unas de otras, por ejemplo, mediante la caracterización cinética. Las transiciones distinguibles incluyen, por ejemplo, las presentadas en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2011/0312529 A1. Una o varias de las transiciones que una polimerasa sufre cuando añade un nucleótido a un ácido nucleico se pueden detectar mediante un sensor de carga, por ejemplo, mediante el uso de una polimerasa que puede o no estar conformacionalmente marcada. La medición basada en el tiempo o en la cinética de las señales detectadas por un sensor de carga al cual está conectado una polimerasa se puede utilizar para distinguir una transición de otra.

En realizaciones concretas, la medición basada en el tiempo o en la cinética de una polimerasa conectada a un sensor de carga se puede utilizar para distinguir la especie de nucleótido que se añade a un ácido nucleico. Por ejemplo, una medición basada en el tiempo o la medición cinética se puede utilizar para distinguir la especie de nucleótido que se fija a una polimerasa para formar uno o varios complejos presentados en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2011/0312529 A1. Como alternativa o adicionalmente, la medición basada en el tiempo o en la cinética de una polimerasa conectada a un sensor de carga se puede utilizar para distinguir la fijación y/o la incorporación de un nucleótido correctamente emparejado por la base según Watson y Crick de uno que está emparejado incorrectamente por la base al ácido nucleico de plantilla.

Pueden estar facilitados los métodos que utilizan la discriminación basada en el tiempo o en la cinética de los nucleótidos mediante el uso de la mezcla muy rápida de reactantes en los sensores de carga acoplados a la detección en tiempo real. La mezcla se puede producir a escala de tiempo de submilisegundos de acuerdo con la instrumentación disponible de flujo interrumpido. El mezclado rápido de reactantes se puede conseguir con el uso de la fluidica rápida, el mezclado activo o pasivo, y el confinamiento adecuado (p. ej., encamisado de la mezcla) de la reacción para superar las limitaciones por difusión. La administración del flujo interrumpido es particularmente útil. El flujo interrumpido proporciona la administración del fluido a un sitio de detección mediante el uso de flujo rápido del fluido seguido de la parada repentina del flujo. El fluido que se administra desplaza típicamente un volumen igual de fluido desde el sitio de detección. El fluido puede mezclarse con un analito en fase sólida, tal como una polimerasa fijada a un sensor de carga. El tiempo muerto para la administración del fluido de flujo interrumpido puede ser, por ejemplo, de menos de 2 milisegundos (ms). En concordancia, el tiempo muerto no suele superar los 2 ms, 1,5 ms, 1 ms, 0,8 ms, 0,6 ms, 0,5 ms o 0,4 ms. Para los sistemas fluidicos útiles de flujo interrumpido y de mezclado rápido, véase, por ejemplo, Chance, B. *J. Frank. Inst.* 299, 613 (1940) y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º US 2013/0165328 A1.

Una secuencia de mediciones basadas en el tiempo o en la cinética de una polimerasa conectada a un sensor de carga se puede utilizar para determinar la secuencia de un ácido nucleico de plantilla utilizado por la polimerasa para sintetizar una hebra complementaria. Se debe saber que la secuencia de la hebra plantilla puede inferirse de la secuencia de nucleótidos incorporados en la hebra que se está extendiendo. Como tal, la determinación de la secuencia de una hebra se debe saber que incluye la determinación de la secuencia de su hebra complementaria.

Cualquiera de una serie de especies de nucleótidos puede ser útil en un método o composición presentado en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden utilizar los nucleótidos que se producen de forma natural, tales como ATP, UTP, CTP, GTP, ADP, UDP, CDP, GDP, AMP, UMP, CMP, GMP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dADP, dTDP, dCDP, dGDP, dAMP, dTMP, dCMP y dGMP. Típicamente, los nucleótidos dNTP se incorporan en una hebra de ADN mediante las ADN polimerasas y los nucleótidos NTP se incorporan en una hebra de ARN mediante las ARN polimerasas. En realizaciones concretas, los nucleótidos NTP o los análogos de los mismos se pueden incorporar en el ADN mediante una ADN polimerasa, por ejemplo, en los casos en donde el NTP, o el análogo del mismo, es capaz de ser incorporado en el ADN mediante la ADN polimerasa, y donde la velocidad o duración de tiempo para una transición de la ADN polimerasa cuando se utiliza el NTP, o el análogo del mismo, se puede distinguir de la velocidad o duración de tiempo para la transición de la ADN polimerasa cuando se utiliza otro nucleótido. Como alternativa, los nucleótidos dNTP o los análogos de los mismos se pueden incorporar en el ARN mediante una ARN polimerasa, por ejemplo, en los casos en donde el dNTP, o el análogo del mismo, es capaz de ser incorporado en el ARN mediante la ARN polimerasa, y en donde la velocidad o duración de tiempo de una transición de la ARN polimerasa cuando se utiliza el dNTP, o el análogo del mismo, se puede distinguir de la velocidad o duración de tiempo para la transición de la ARN polimerasa cuando se utiliza otro nucleótido. Adicionalmente, los nucleótidos dNTP o los análogos de los mismos se pueden incorporar en el ADN a partir de una plantilla de ARN mediante una transcriptasa inversa, por ejemplo, en los casos donde el dNTP, o el análogo del mismo, es capaz de ser incorporado en el ADN a partir de una plantilla de ARN mediante una transcriptasa inversa, y en donde la velocidad o duración del tiempo de una transición de la transcriptasa inversa cuando se utiliza el dNTP, o el análogo del mismo, se puede distinguir de la velocidad o duración de tiempo de la transcripción de la transcriptasa inversa cuando se utiliza otro nucleótido. La diferencia relativa en la velocidad o duración del tiempo puede ser un incremento relativo de la velocidad, un incremento relativo de la duración, una disminución relativa de la velocidad o una disminución relativa de la duración.

Los análogos no naturales de los nucleótidos también son útiles. Los análogos de nucleótidos no naturales particularmente útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, los que producen de manera detectable y diferente una velocidad o una duración de tiempo de una transición de la polimerasa que se puede distinguir de la velocidad o duración de tiempo de una transición de la polimerasa con otro nucleótido. Por ejemplo, un análogo de nucleótido no natural puede producir de manera útil unas detectablemente diferentes velocidad o duración de tiempo para una transición de la polimerasa que se puede distinguir de la velocidad o duración de tiempo de la misma transición de la polimerasa con otro nucleótido, tal como un nucleótido que se produce de forma natural. Los análogos de nucleótido de ejemplo que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitarse a ellos, dNTPαS; NTPαS; nucleótidos que tienen nucleobases no naturales identificadas en Hwang et al., *Nucl. Acids. Res.* 34: 2037-2045 (2006) como ICS, 3MN, 7AI, BEN, DM5, TM, 2Br, 3Br, 4Br, 2CN, 3CN, 4CN, 2FB, 3FB, MM1, MM2 y MM3; o nucleótidos que tienen otras nucleobases no naturales, tales como las descritas en Patro et al., *Biochem.* 48: 180-189 (2009), que incluyen 2-amino-1-desazapurina, 1-desazapurina, 2-piridina, hipoxantina, purina, 6-Cl-purina, 2-amino-dA, 2-aminopurina o 6-Cl-2-aminopurina, o nucleótidos que tienen nucleobases no naturales, tales como los descritos en Krueger et al.

Chem. Biol. 16: 242-8 (2009) que incluyen iso-G, iso-C- 5SICS, MMO2, Ds, Pa, FI, FB, dZ, DNB, isoésteres de timina, 5-NI, dP, azolcarboxamida, xA, Im-No, Im-ON, J, A*, T*.

Los análogos de nucleótidos no naturales que tienen modificaciones en 5' son particularmente útiles. El análogo de nucleótido no natural tendrá típicamente un trifosfato, pero puede tener más o menos fosfatos. En realizaciones concretas, uno o varios del fosfato α , fosfato β o fosfato γ de un nucleótido no natural lleva unido covalentemente un resto que no es oxígeno. Un resto que está conectado a un fosfato α , si no, está presente en la posición 5', puede aportar una carga negativa, una carga positiva, actividad quelante de metales o impedimento estérico. Los restos ejemplares incluyen, pero sin limitarse a ellos, aminoácidos, en forma de enantiómero L o enantiómero R, tales como histidina, aspartato, glutamato, triptófano, fenilalanina, metionina, tirosina, cisteína, glicina, alanina, o prolina; un grupo amino; un metal quelado, tal como magnesio o manganeso; un grupo metilo; un halógeno tal como bromo, cloro o yodo; un grupo tiol; un grupo que atrae los electrones; un grupo donante de electrones; una amina aromática; o una amina alifática. Estos y otros restos pueden ser ventajosos en las realizaciones en donde proporcionan una interacción con una polimerasa u otra enzima para ácido nucleico, que difiere de la interacción que la enzima tiene con un nucleótido que carece del resto. Como tal, la presencia y ausencia del resto en las correspondientes especies de nucleótidos se puede explotar en un método de secuenciación para distinguir las especies de nucleótidos, por ejemplo, basándose en la velocidad, duración de tiempo y/o intensidad para un cambio de la señal conformacional en una enzima para ácido nucleico que actúa sobre la especie de nucleótido.

Una composición de la reacción o método puede incluir una o varias especies de nucleótidos. Por ejemplo, una composición de la reacción o método utilizado para el análisis de la secuencia puede incluir cuatro especies de nucleótidos diferentes capaces de formar pares de bases según Watson y Crick con las respectivas cuatro especies nucleotídicas en una plantilla de ácido nucleico que se ha de sintetizar. Las realizaciones concretas pueden incluir al menos dos especies diferentes de nucleótidos, al menos tres especies diferentes de nucleótidos, al menos cuatro especies diferentes de nucleótidos, o más. Al menos dos de las especies de nucleótidos pueden ser análogos de nucleótidos no naturales, al menos tres de las especies de nucleótidos pueden ser análogos de nucleótidos no naturales, o al menos cuatro de las especies de nucleótidos pueden ser análogos de nucleótidos no naturales. Así pues, una composición de la reacción o método puede incluir una mezcla de nucleótidos naturales y de análogos de nucleótidos no naturales. Como alternativa, una composición de la reacción puede carecer de nucleótidos naturales y tienen, en cambio, solo análogos de nucleótidos no naturales. La reacción se puede llevar a cabo en las condiciones en las que sólo los análogos de nucleótidos no naturales se incorporan en un ácido nucleico en crecimiento mediante una polimerasa u otra enzima de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, una composición de la reacción o método puede incluir especies de nucleótidos que se aparean según la base con no más de una especie de nucleótido en una plantilla de ácido nucleico. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un método en las condiciones en donde las diferentes especies de nucleótido se ponen en contacto con una polimerasa y un ácido nucleico en reacciones secuenciales pero independientes. Específicamente, una especie de nucleótido que se aparea según la base con A se puede añadir en una primera reacción, una especie de nucleótido que se aparea según la base con C se puede añadir en una segunda reacción, una especie de nucleótido que se aparea según la base con T se puede añadir en una tercera reacción y una especie de nucleótido que se aparea según la base con G se puede añadir en una cuarta reacción. Las reacciones se denominan primera, segunda, tercera y cuarta simplemente para ilustrar que las reacciones son independientes, pero esto no limita necesariamente el orden mediante el cual las especies se pueden añadir en un método presentado en la presente memoria. Más bien, las especies de nucleótidos que se aparean según la base con A, C, T o G se pueden añadir en cualquier orden deseado o apropiado para una realización concreta de estos métodos. Típicamente en un método de secuenciación, las especies de nucleótidos que se aparean según la base con cuatro especies diferentes de nucleótidos en un ácido nucleico de plantilla dado se añaden secuencialmente para completar un ciclo del método de secuenciación. Sin embargo, se debe saber que en algunas realizaciones se pueden utilizar menos de cuatro adiciones de nucleótidos. Además, se deberá saber que se pueden utilizar las mezclas de nucleótidos que se aparean según la base con más de una, pero no más de 2, 3 o 4, especies de nucleótidos. De igual forma, se pueden utilizar las mezclas de nucleótidos que se aparean según la base con más de dos, pero no más de 3 o 4, especies de nucleótidos, o se pueden utilizar mezclas de nucleótidos que se aparean según la base con más de tres, pero no más de 4, especies de nucleótidos.

Los métodos multiplexados también están disponibles. Por ejemplo, un soporte sólido utilizado en un método de la presente descripción puede incluir numerosos sensores de carga que llevan anclados las polimerasas, las polimerasas se pueden poner en contacto con los ácidos nucleicos de plantilla y al menos cuatro tipos diferentes de nucleótidos en las condiciones en las que las polimerasas catalizan la adición secuencial de los tipos de nucleótidos para formar los complementos de ácido nucleico de las plantillas de ácido nucleico; mediante los sensores de carga se pueden detectar una serie de cambios en la señal de las polimerasas; y se puede determinar la secuencia de los nucleótidos para los ácidos nucleicos de plantilla. Las numerosas polimerasas presentes en el soporte sólido pueden incluir al menos dos tipos diferentes de polimerasa. Los diferentes tipos de polimerasa pueden optativamente producir señales mutuamente distinguibles que se pueden detectar en los sensores de carga cuando se incorpora el mismo tipo de nucleótido en una hebra de ácido nucleico naciente. La distinción de estas señales mutuamente distinguibles se puede utilizar como una base para determinar las secuencias de numerosos ácidos nucleicos.

El término «que comprende» pretende en la presente memoria ser flexible, al incluir no solo los elementos enumerados, sino que además abarca cualquier elemento adicional.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos dados a conocer más arriba, se debe entender que se pueden realizar diferentes modificaciones sin alejarse de la invención. Por consiguiente, la invención está limitada solo por las reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para conectar componentes de reacción a sensores de carga, que comprende
 - (a) aportar un soporte sólido que comprende numerosos sensores de carga, en donde cada uno de los sensores de carga tiene una capacidad para conectarse a numerosos componentes de reacción;
- 5 (b) aportar un fluido que comprende numerosos componentes de reacción de un tipo concreto, en donde cada uno de los componentes de reacción del tipo concreto está fijado a un resto repelente; y
 - (c) poner en contacto el soporte sólido con el fluido en las condiciones en las que
 - (i) los numerosos componentes de reacción del tipo concreto están en comunicación fluida con los numerosos sensores de carga,
 - 10 (ii) en el fluido hay un mayor número de componentes de reacción del tipo concreto que el número de sensores de carga en el soporte sólido;
 - (iii) los componentes de la reacción del tipo concreto se conectan desde el fluido a los sensores de carga, y
 - (iv) el resto repelente fijado a cada uno de los componentes de la reacción impide que más de uno de los componentes de la reacción en los numerosos componentes de la reacción se conecten a cada uno de los sensores de carga.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tipo de los componentes de reacción es una enzima para ácido nucleico.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el resto repelente comprende un ácido nucleico o una nanoesfera de ácido nucleico.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enzima para ácido nucleico es una polimerasa.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el componente de la reacción comprende al menos dos tipos diferentes de polimerasa, en donde los diferentes tipos de polimerasa están conectados a sensores de carga independientes del soporte sólido.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los diferentes tipos de polimerasa producen señales mutuamente distinguibles que se pueden detectar en los sensores de carga cuando se incorpora el mismo tipo de nucleótido en una hebra nascente de ácido nucleico.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tipo de los componentes de la reacción se selecciona del grupo que consiste en un receptor, ligando, ácido nucleico y enzima.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto repelente: a) ocupa un volumen de espacio que obstaculiza estéricamente que a cada uno de los sensores de carga se conecte más de uno de los componentes de la reacción en los numerosos componentes de la reacción; o
 - b) comprende una polaridad de carga que obstaculiza electrostáticamente que a cada uno de los sensores de carga se conecte más de uno de los componentes de la reacción en los numerosos componentes de la reacción.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada uno de los sensores de carga tiene una capacidad para conectarse a más de dos de los componentes de la reacción del tipo concreto.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la retirada del resto repelente fijado desde los componentes de la reacción después de que los componentes de la reacción se conecten a los sensores de carga.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el fluido se retira del soporte sólido antes de retirar el resto repelente fijado y después de que los componentes de la reacción se conecten a los sensores de carga.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos el 50% de los sensores de carga están conectados a un único componente de la reacción del tipo concreto después de la etapa (c).
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los componentes de la reacción del tipo concreto se transportan activamente a los sensores de carga mediante la aplicación de un campo eléctrico.
- 45 14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los componentes de la reacción del tipo concreto se conectan desde el fluido a los sensores de carga mediante la formación de anclajes conductivos.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde los anclajes conductivos comprenden politiofeno, poli(3,4-etilendioxitiofeno), poliacetileno, polipirrol, polianilina, polifluoreno, polifenileno, polipireno, poliazuleno, polinaftalenos, policarbazol, poliindol o poliazepina dopados.

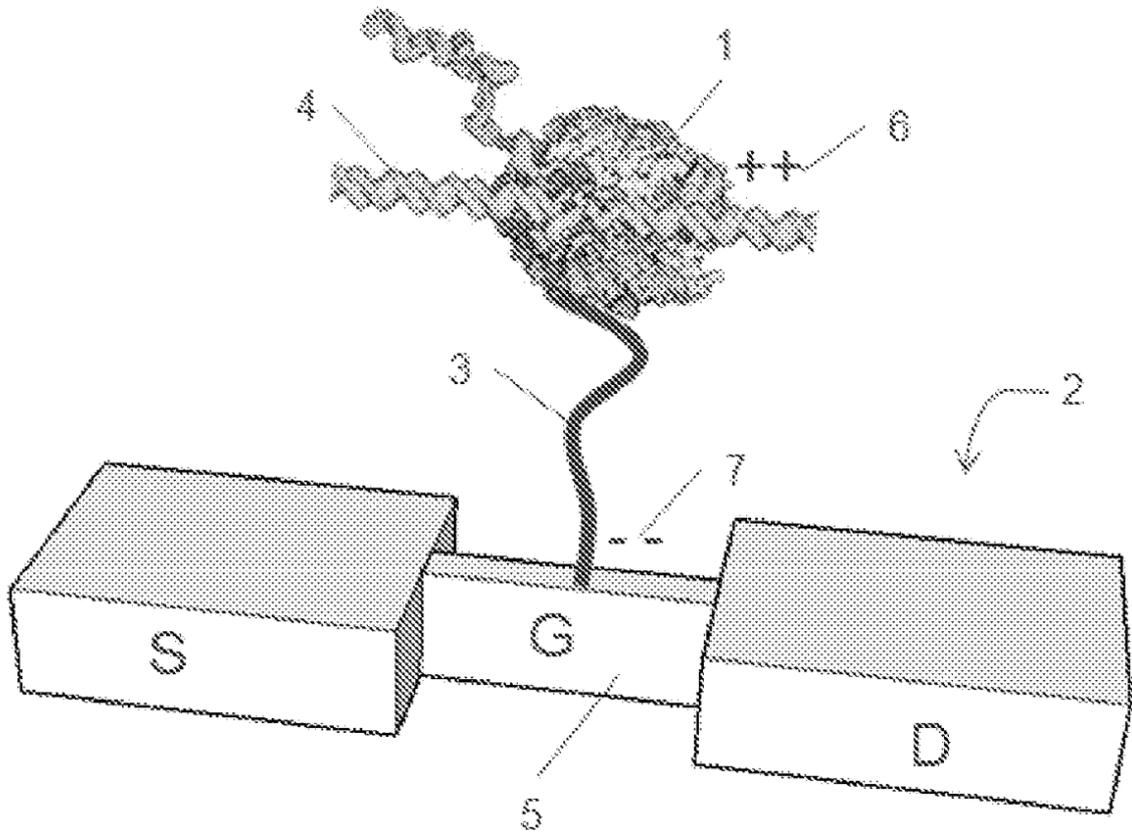


FIG. 1

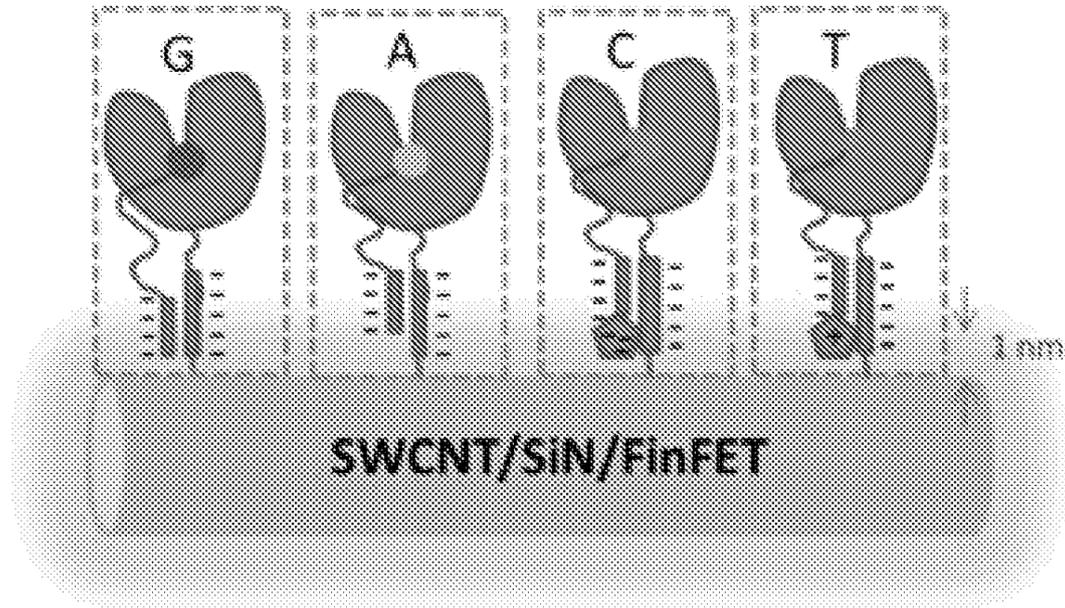


FIG. 2

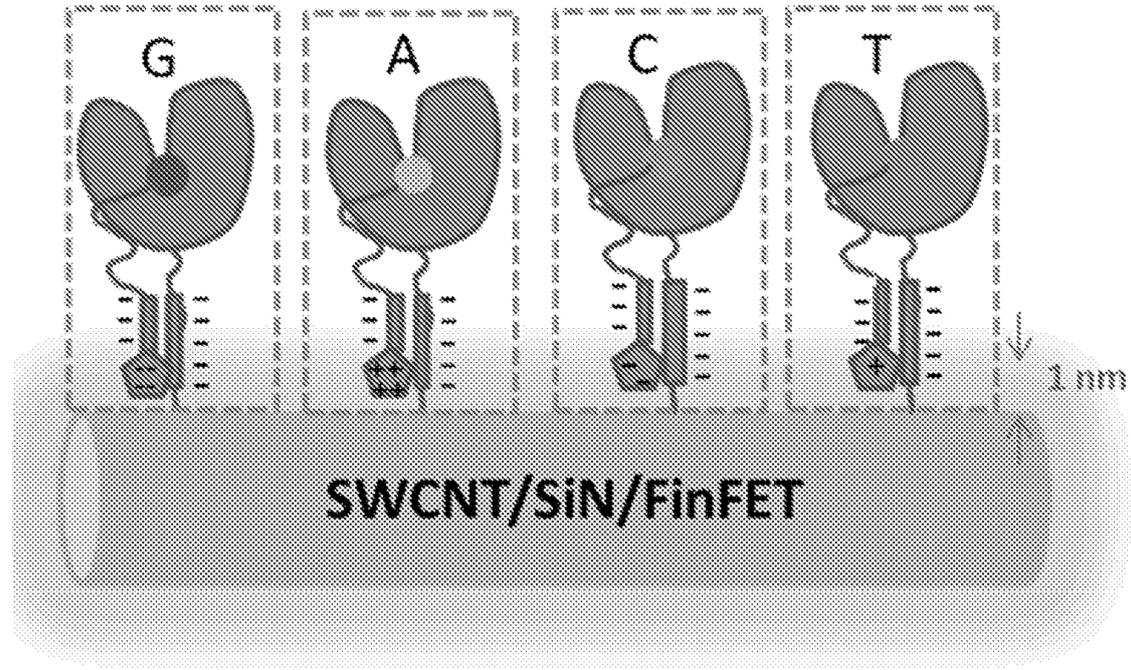


FIG. 3

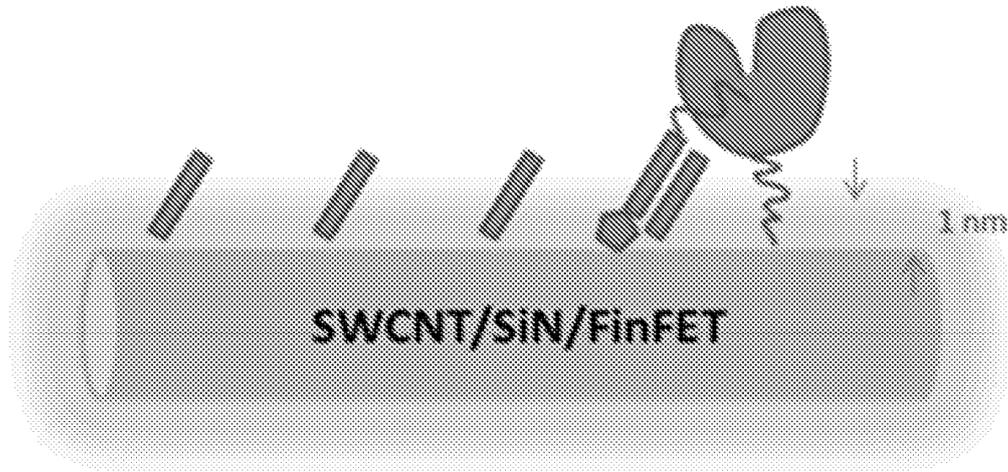


FIG. 4

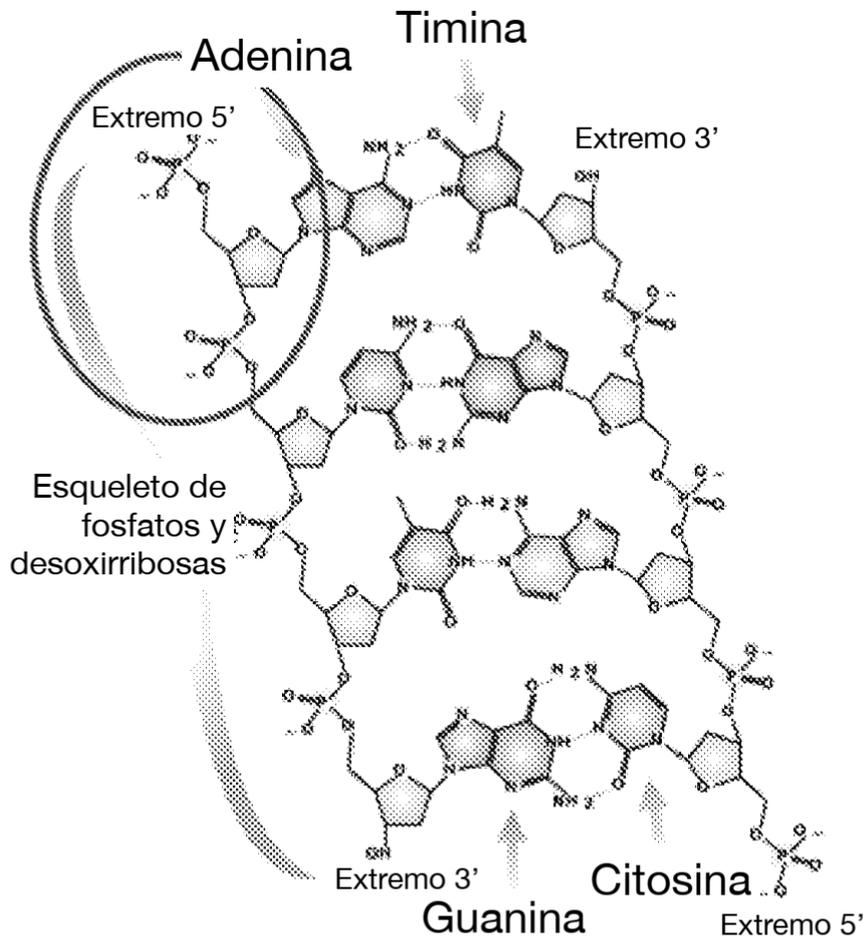


FIG. 5

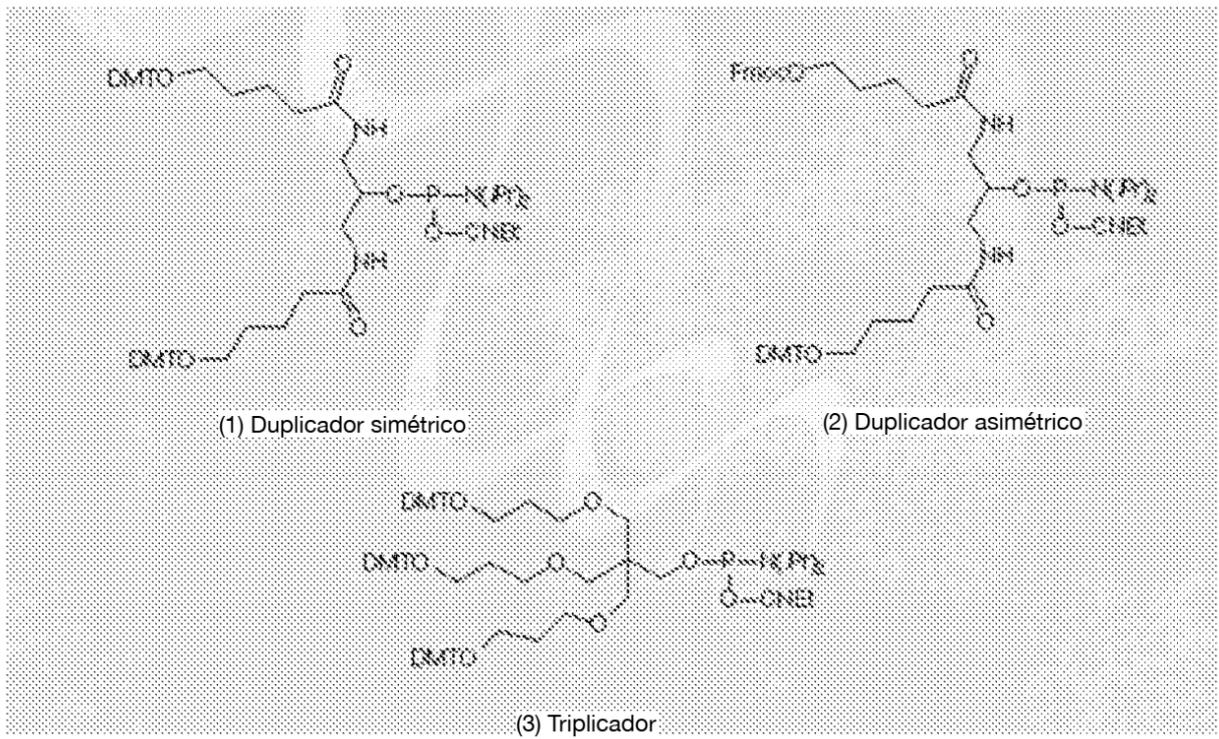


FIG. 6

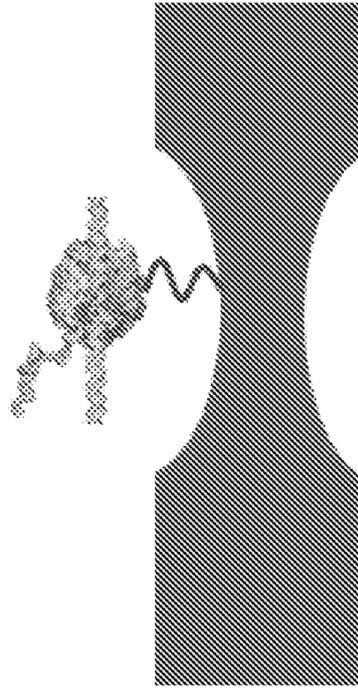


FIG.8

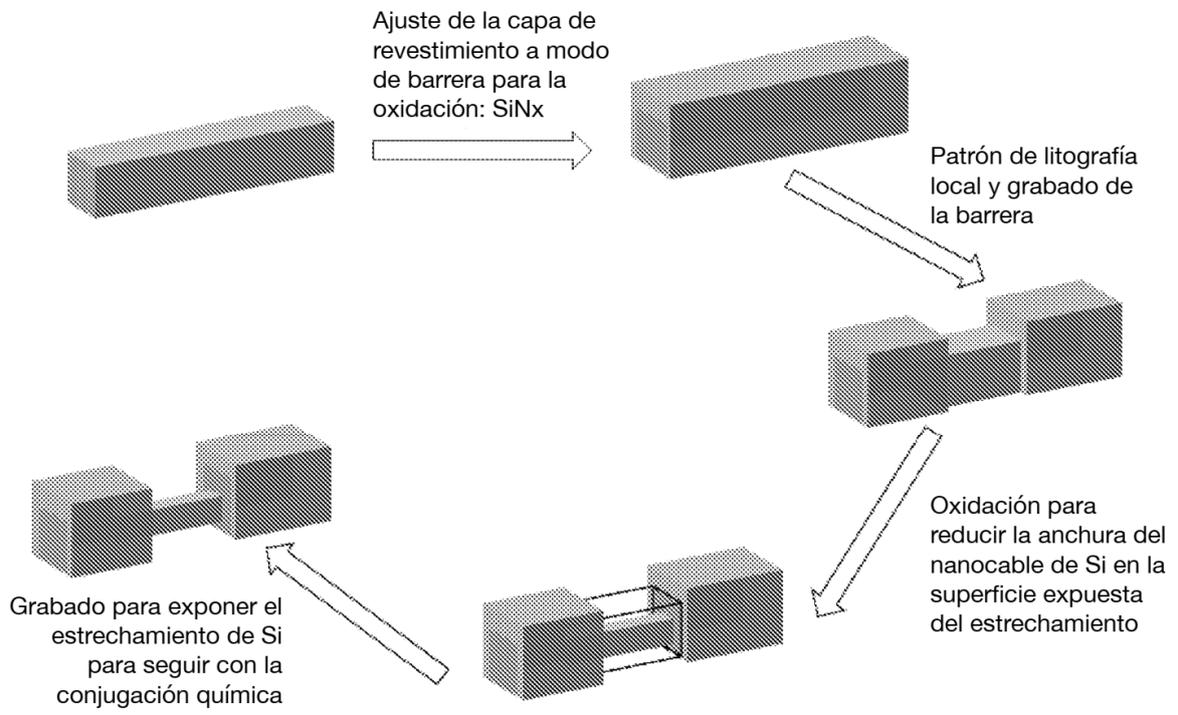


FIG. 9

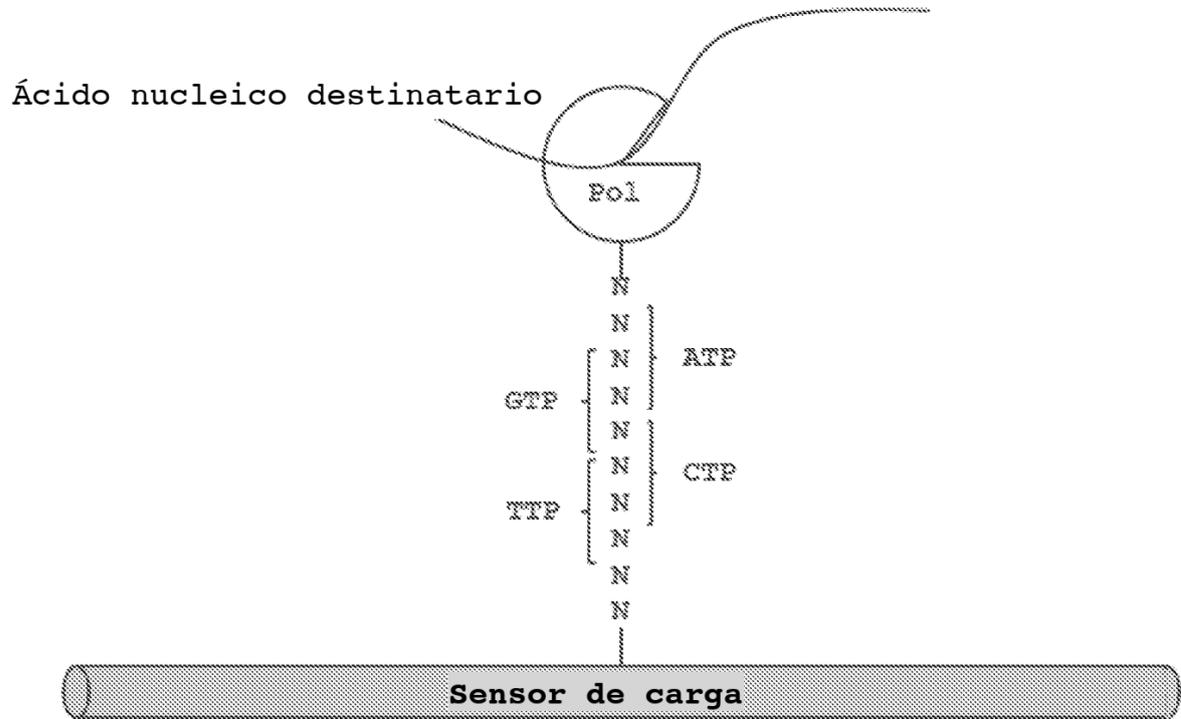


FIG. 10

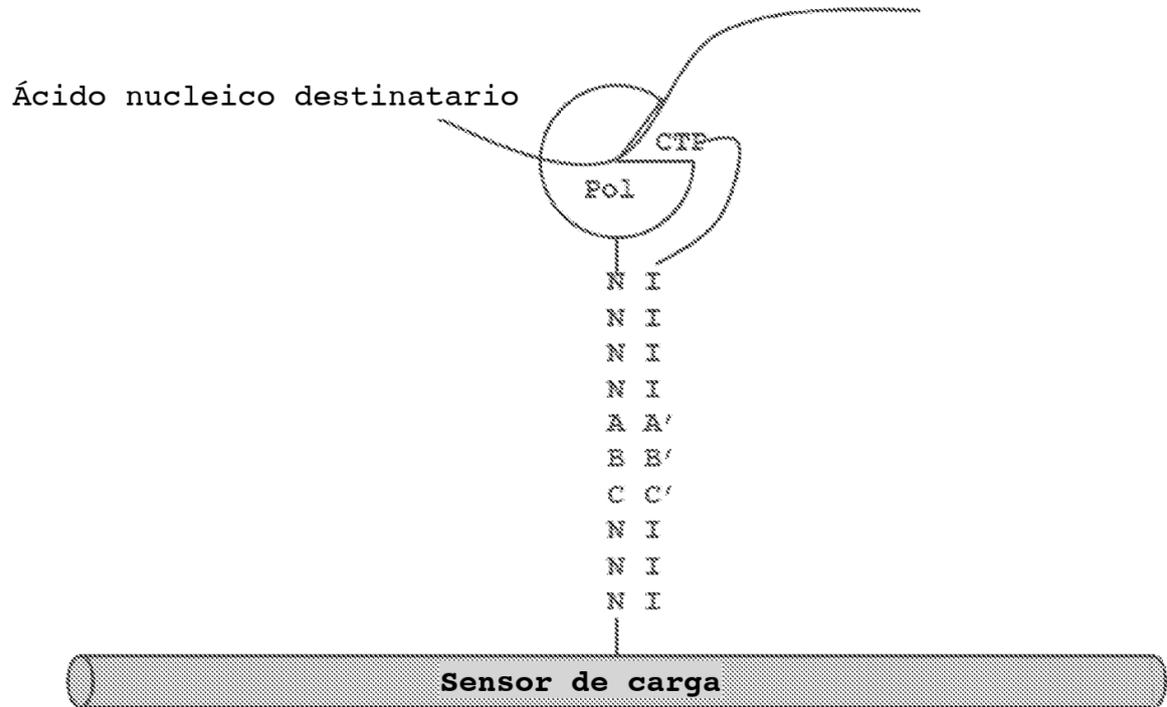


FIG. 11

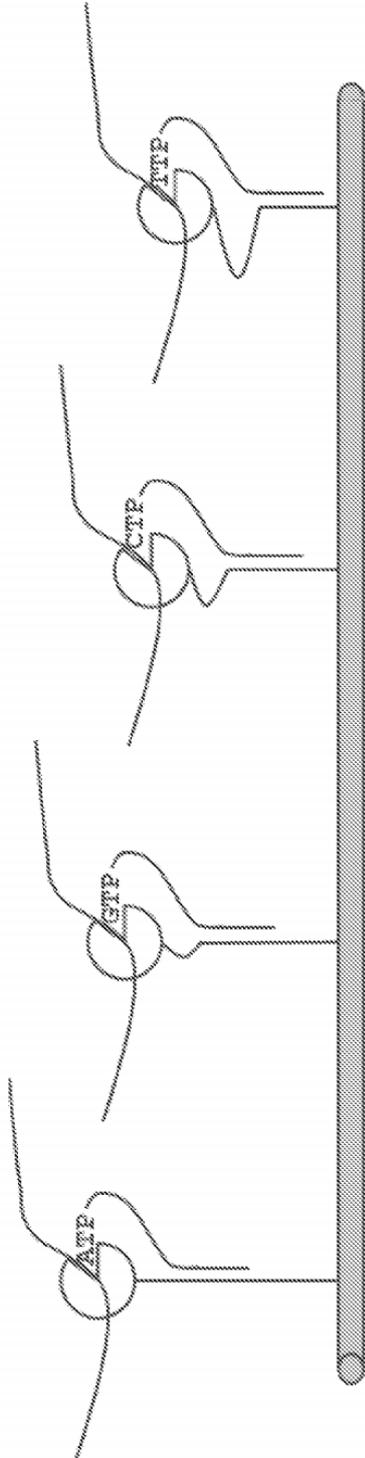


FIG. 12