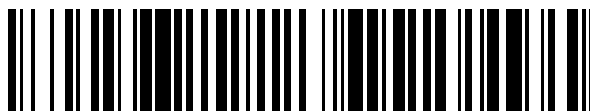


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 750**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2013 PCT/US2013/065289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14062835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2013 E 13846570 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2909343**

54 Título: **Procedimientos para secuenciar un ácido nucleico**

30 Prioridad:

16.10.2012 US 201261741789 P

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

25.02.2019

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 E. Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

HAYDEN, MARK A.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 701 750 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

Procedimientos para secuenciar un ácido nucleico

5 Antecedentes

Los ácidos nucleicos están formados por cadenas de unidades enlazadas llamadas nucleótidos. Los nucleótidos son moléculas que se unen para crear unidades estructurales de los ácidos nucleicos ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN). Un nucleótido incluye un grupo fosfato, un azúcar (ribosa en el caso del ARN y desoxirribosa para el ADN) y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas se utilizan en el apareamiento de bases de cadenas de nucleótidos para formar estructuras de nivel superior, como la conocida doble hélice. Las cuatro bases encontradas en el ADN son adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). En una doble hélice de ADN, cada tipo de base nitrogenada en una cadena normalmente interacciona con un solo tipo de base nitrogenada en la otra cadena, que se conoce como apareamiento de bases complementarias. Específicamente, A solo se une a T y C solo se une a G. Las bases nitrogenadas de ARN incluyen uracilo (U) en lugar de timina. Debido a la importancia del ADN y el ARN, el conocimiento de una secuencia de ADN o ARN es útil para muchos fines, entre los que se incluyen, por ejemplo, identificar, diagnosticar y desarrollar tratamientos para enfermedades patológicas, contagiosas o genéticas.

Las químicas de la secuenciación de ácidos nucleicos incluyen la secuenciación por síntesis (SBS) o la secuenciación por ligación (SBL). Estas estrategias suelen utilizar matrices bidimensionales (2D) aleatorias u ordenadas para rastrear datos de identidad de secuencia. Estas densidades de la matriz son extremadamente altas, de 10^5 o 10^7 características (o superiores para la detección de una sola molécula). A medida que la cadena de nucleótidos crece a partir de la acción de la polimerasa (SBS) o ligasa (SBL), los lectores incorporan y detectan los marcadores. Cuando se identifica una base o un ácido nucleico asociado con un marcador, a la base se le asigna una función en la matriz mediante la captura de una imagen óptica 2D. Sin embargo, la resolución óptica necesaria para separar los datos de los espectros de estas matrices de alta densidad requiere tiempos de exposición muy largos, lo que da como resultado tiempos de ejecución promedio de horas a varios días. Además, las imágenes ópticas adquiridas a partir de sucesivos ciclos de secuenciación pueden alcanzar fácilmente el tamaño de terabytes, lo que genera una gran demanda de tiempo de cálculo de algoritmos y almacenamiento de datos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de un microtranspondedor de ejemplo.
 La figura 2 es un diagrama de bloques de un sistema de ejemplo para secuenciar ácidos nucleicos usando el microtranspondedor de ejemplo de la figura 1.
 La figura 3 es un diagrama de flujo representativo de un procedimiento de ejemplo que se puede usar para implementar sistemas de ejemplo desvelados en el presente documento.
 La figura 4 es un diagrama de flujo representativo de un procedimiento de ejemplo que se puede usar para implementar sistemas de ejemplo desvelados en el presente documento.
 La figura 5 ilustra una plataforma de procesador de ejemplo que puede ejecutar instrucciones para realizar el procedimiento de las figuras 3 y/o 4 y/o, más generalmente, para implementar cualquiera o todos los procedimientos, sistemas y/o aparatos de ejemplo desvelados en el presente documento.

45 Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona un procedimiento para secuenciar un ácido nucleico, que comprende:
 someter una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en un microtranspondedor a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas que son complementarias y unir las a la secuencia de bases nucleotídicas diana, en la que al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador;
 identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación; y
 asociar cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor, en el que el procedimiento comprende el uso de un medidor de flujo que identifica tanto el número de identificación del microtranspondedor como el marcador asociado con una base nucleotídica añadida a la secuencia de nucleótidos, y
 en el que después de cada reacción de secuenciación, el microtranspondedor se pasa a través del medidor de flujo, donde se identifica el microtranspondedor y se detecta el marcador.

Descripción detallada

Esta divulgación se refiere a procedimientos y aparatos para secuenciar un ácido nucleico como se usa, por ejemplo, en equipos de diagnóstico médico. Los ejemplos desvelados en el presente documento se pueden usar para determinar la secuencia de ácido nucleico de un organismo, un gen y/o un objetivo amplificado utilizando una

- combinación de tecnología de microtranspondedor y secuenciación de última generación, incluyendo, entre otros, química de secuenciación por síntesis (SBS.) o secuenciación por ligadura (SBL). Estos ejemplos se pueden usar como sistemas de diagnóstico generales y procedimientos para la detección de organismos patógenos (bacterianos y/o víricos), detección de ARN, detección de ADN, secuenciación *de novo* de la totalidad del genoma, expresión
- 5 génica, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y/o pruebas genéticas donde se utiliza la secuenciación de última generación como sistema de detección complementario. Estos ejemplos se pueden usar en muchas aplicaciones como, por ejemplo, diagnósticos clínicos, diagnóstico de infecciones adquiridas en el hospital, vigilancia epidemiológica, análisis forense, descubrimiento de investigaciones y/u otros usos adecuados.
- 10 La secuenciación puede ser por cualquier procedimiento conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, la secuenciación es secuenciación por síntesis. En otras realizaciones, la secuenciación es la secuenciación de una sola molécula por síntesis. Y, en algunas realizaciones, la secuenciación es mediante secuenciación por ligación (SBL). Otras tecnologías de secuenciación que están abarcadas por la tecnología se tratan de forma exhaustiva. La
- 15 secuenciación por síntesis puede incluir la incorporación de nucleótidos marcados con colorante, la terminación de la cadena, la secuenciación de iones/protones, la secuenciación de pirofosfatos o similares. Las técnicas de una sola molécula pueden incluir una secuenciación escalonada, donde la reacción de secuenciación se detiene para determinar la identidad del nucleótido incorporado.
- 20 En ciertas realizaciones, la secuenciación implica hibridar un cebador con un molde (por ejemplo, un ácido nucleico que se va secuenciar) para formar un dúplex de molde/cebador, que pone en contacto el dúplex con una enzima polimerasa en presencia de nucleótidos marcados de manera detectable en condiciones que permiten que la polimerasa añada nucleótidos al cebador de una manera dependiente del molde, detectando una señal del nucleótido marcado incorporado y repitiendo secuencialmente los pasos de contacto y detección al menos una vez, en los que la detección secuencial de nucleótidos marcados incorporados determina la secuencia del ácido nucleico.
- 25 Los marcadores detectables de ejemplo incluyen marcadores radioactivos, marcadores metálicos, puntos cuánticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores de masas, marcadores enzimáticos, etc. En realizaciones particulares, el marcador detectable puede ser un marcador detectable ópticamente, tal como un marcador fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes (para secuenciación y/u otros fines, tales como el marcaje de un ácido nucleico, cebador, sonda, etc.) incluyen cianina, rodamina, fluoresceína, cumarina, BODIPY, alexa, o múltiples colorantes conjugados.
- 30 En algunas realizaciones, se inmoviliza un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ADN y/o ARN). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ácido nucleico diana se une a otra entidad, tal como una sonda de captura, por ejemplo, un ácido nucleico complementario (por ejemplo, que hibrida con el o los ácidos nucleicos diana), un anticuerpo u otra tecnología de captura (por ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende un marcador u otro resto que es reconocido (por ejemplo, unido) por una entidad de captura, por ejemplo, en el caso de un ácido nucleico biotinilado unido a un resto de avidina inmovilizada).
- 35 Un procedimiento de SBS particular y de ejemplo implica segmentar una muestra de ADN y unir una cola de poli(A) en un extremo, que se lava, por ejemplo, sobre un cubreobjetos de vidrio recubierto con moléculas de poli(T). A hibrida con T y mantiene el segmento de ADN en su lugar. Diferentes bases de ADN, que se unen a marcadores como, por ejemplo, las moléculas de colorante se lavan varias veces sobre los segmentos fijados. Se forman pares de bases para construir la doble hélice. Las marcadores indican qué bases están unidas por parejas. Se toma una imagen y la secuencia se determina leyendo las marcadores.
- 40 Un procedimiento de SBL concreto y de ejemplo incluye una cadena diana de una secuencia de ADN desconocida que está flanqueada en al menos un extremo por una secuencia conocida. Se introduce una cadena de anclaje para unir a la secuencia conocida. Se introduce un grupo mixto de oligonucleótidos marcados (polímeros de ácido nucleico corto, típicamente con cincuenta bases o menos). Los oligonucleótidos hibridan con la diana al lado del ancla. La ADN ligasa une el oligonucleótido al ancla cuando las bases del oligonucleótido coinciden con la secuencia de ADN desconocida (diana). Según el marcador (por ejemplo, marcadores radiactivos, marcadores metálicos, puntos cuánticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores de masas, marcadores enzimáticos), se puede identificar la secuencia de nucleótidos diana desconocida.
- 45 Un procedimiento de SBL concreto y de ejemplo incluye una cadena diana de una secuencia de ADN desconocida que está flanqueada en al menos un extremo por una secuencia conocida. Se introduce una cadena de anclaje para unir a la secuencia conocida. Se introduce un grupo mixto de oligonucleótidos marcados (polímeros de ácido nucleico corto, típicamente con cincuenta bases o menos). Los oligonucleótidos hibridan con la diana al lado del ancla. La ADN ligasa une el oligonucleótido al ancla cuando las bases del oligonucleótido coinciden con la secuencia de ADN desconocida (diana). Según el marcador (por ejemplo, marcadores radiactivos, marcadores metálicos, puntos cuánticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores de masas, marcadores enzimáticos), se puede identificar la secuencia de nucleótidos diana desconocida.
- 50 Los sistemas y procedimientos de ejemplo desvelados en el presente documento usan microtranspondedores para identificar de forma selectiva los nucleótidos añadidos en una reacción de secuenciación. La tecnología comprende el uso de una herramienta de identificación en forma de un lector de flujo, que identifica tanto un marcador de identificación único para cada uno de una pluralidad de microtranspondedores como un marcador asociado con una base nucleotídica añadida a la secuencia de nucleótidos. La herramienta de identificación (por ejemplo, una estación de identificación y/o un medidor de flujo) comprende un detector para detectar el marcador asociada con una base nucleotídica. En algunas realizaciones, el detector es un CCD, un CMOS, un sensor de iones, tal como una capa sensible a los iones que cubre un CMOS, un detector de corriente, o similar. En algunas realizaciones, el detector está asociado con un sistema de excitación para hacer que un marcador, como un colorante fluorescente, emita una señal. En algunas realizaciones, el detector está asociado con una fuente de iluminación, tal como una lámpara de arco, un láser, un diodo emisor de luz (LED), o similar. En realizaciones particulares, el detector está asociado con ópticas para la transmisión de luz desde una fuente de iluminación a la muestra o desde la muestra al sensor de
- 55 60 65

imagen o de detección. Como alternativa, en algunas realizaciones, el detector no está asociado e incluye una fuente de iluminación, tal como, por ejemplo, cuando una señal se produce espontáneamente como resultado de una reacción de secuenciación. Por ejemplo, puede producirse una señal mediante la interacción de un resto liberado, tal como un ion liberado que interacciona con una capa sensible a los iones, o un pirofosfato que reacciona con una enzima u otro catalizador para producir una señal quimioluminiscente. En otro ejemplo, un detector detecta cambios en una corriente eléctrica, voltaje o resistencia sin la necesidad de una fuente de iluminación.

Por consiguiente, el uso de la tecnología de acuerdo con las realizaciones descritas (por ejemplo, que comprende la identificación de un marcador de identificación única para cada uno de una pluralidad de microtranspondedores y un marcador asociado con una base nucleotídica añadida a la secuencia de nucleótidos) cambia el formato de detección de una matriz bidimensional (2D) a una matriz tridimensional (3D), eliminando así el uso de coordenadas cartesianas 2D para la identificación de secuencias.

Los microtranspondedores de ejemplo se leen con un dispositivo de identificación (por ejemplo, que comprende una herramienta de identificación) tal como, por ejemplo, un medidor de flujo (por ejemplo, un lector de flujo que comprende un detector, por ejemplo, como se describe en el presente documento) y, por lo tanto, no es necesario detectar ópticamente matrices de alta densidad aleatorias u ordenadas. Después de cada ronda de síntesis o ligadura, los microtranspondedores pasan a través del lector de flujo donde se identifica cada transpondedor y se detecta el marcador, por ejemplo, fluorescencia. Una fluorescencia positiva indica una base añadida; una fluorescencia negativa indica que no se añadió ninguna base. Después de cada detección, los microtranspondedores se pueden volver a suspender en un reactivo para rondas posteriores de adición y detección de bases. No es necesario que el hardware complejo de imágenes ópticas resuelva las características de la matriz 2D de alta densidad. Por lo tanto, los tiempos de ejecución se reducen significativamente. Además, una señal de detección digital "sí" o "no" de los microtranspondedores ahorra espacio de almacenamiento significativo en comparación con los sistemas tradicionales en los que se almacenan grandes archivos de imágenes de datos durante cada ejecución. Además, es posible un alto rendimiento con el lector de flujo. Un ejemplo de lector de flujo puede manejar una tasa de transferencia de, por ejemplo, aproximadamente 1.000 microtranspondedores por segundo, lo que se traduce en aproximadamente 3,5 millones de eventos detectados por hora. Un ejemplo de memoria o almacenamiento comprende una ROM de 64 bits, que se traduce en más de 10^{17} identificaciones diferentes, que es información más que suficiente para secuenciar el genoma humano.

Un ejemplo de sistema desvelado en el presente documento incluye un microtranspondedor que tiene una superficie en la que se debe capturar un ácido nucleico diana a través de una sonda de captura. En algunas realizaciones, los sistemas incluyen una estación de amplificación para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana en la superficie para formar dianas clonales unidas a la superficie. Además, el sistema de ejemplo incluye una estación de reacción para someter las dianas unidas a la superficie (por ejemplo, en algunas realizaciones, las dianas clonales amplificadas) a una reacción de secuenciación (por ejemplo, una primera reacción de secuenciación) (por ejemplo, una reacción de polimerización (por ejemplo, una primera reacción de polimerización), una reacción de ligadura (por ejemplo, una primera reacción de ligación, etc.) para añadir una primera base nitrogenada (por ejemplo, una base nitrogenada marcada) o una base nucleotídica que es complementaria a una base nucleotídica (por ejemplo, una primera base nucleotídica) en una secuencia del ácido nucleico diana. El sistema de ejemplo también incluye una estación de lavado para eliminar un reactivo de reacción de secuenciación extraño y/o un subproducto (por ejemplo, un reactivo de polimerización que es resultado de una reacción de polimerización (por ejemplo, la primera reacción de polimerización) o un reactivo de ligación extraño que es resultado de una reacción de ligación (por ejemplo, la primera reacción de ligación)). Además, el sistema de ejemplo incluye una estación de identificación para determinar una identidad de una (por ejemplo, cada una) base nucleotídica (por ejemplo, la primera base nucleotídica) en la secuencia del ácido nucleico diana y/o una identidad de una base nucleotídica (por ejemplo, la primera base nucleotídica; por ejemplo, una base nucleotídica marcada) que usa un número de identificación de microtranspondedor y, en algunas realizaciones, un marcador (por ejemplo, un primer marcador) de una base nucleotídica marcada (por ejemplo, la primera base nucleotídica marcada), respectivamente.

La estación de amplificación consiste en someter las dianas clonales unidas a la superficie a un segundo a enésimo número de reacciones de polimerización o ligación posteriores para añadir secuencialmente una segunda a enésima base nucleotídica marcada que son, respectivamente, complementarias a una segunda a enésima base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana, en el que el enésimo número se basa en el número de bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana. Además, la estación de lavado debe eliminar el reactivo de polimerización o ligadura extraño que resulta de la segunda a la enésima polimerización realizada o los reactivos de ligadura después de la adición de cada una de la segunda a la enésima bases nucleotídicas marcadas. Además, la estación de identificación es para determinar, después de la adición de cada una de la segunda a la enésima bases nucleotídicas marcadas, una identidad de cada una de la segunda a la enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana y una identidad de cada una de la segunda a la enésima bases nucleotídicas marcadas utilizando el número de identificación del microtranspondedor y un segundo a enésimo marcador de la segunda a la enésima bases nucleotídicas marcadas, respectivamente.

En algunos ejemplos, la sonda de captura puede comprender ADN o ARN y el ácido nucleico diana puede comprender ADN o ARN. Además, en algunos ejemplos, la estación de amplificación es para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión.

- 5 La tecnología no está limitada en la tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos. Varias realizaciones de plataformas de secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, un secuenciador de ácidos nucleicos) incluyen componentes como se describe a continuación. Según diversas realizaciones, un instrumento de secuenciación incluye una unidad de control y liberación de fluidos, una unidad de procesamiento de muestras, una unidad de detección de señales y una unidad de adquisición, análisis y control de datos. Varias realizaciones del instrumento
10 proporcionan una secuenciación automatizada que se usa para recopilar información de secuencia de una pluralidad de secuencias en paralelo y/o sustancialmente de forma de simultánea.

La unidad de control y liberación de fluidos puede incluir un sistema de liberación de reactivos. El sistema de liberación de reactivos incluye un reservorio de reactivos para el almacenamiento de diversos reactivos. Los reactivos pueden incluir cebadores basados en ARN, cebadores de ADN directos/inversos, mezclas de nucleótidos para la secuenciación por síntesis, tampones, reactivos de lavado, reactivos de bloqueo, reactivos de extracción y similares. Además, el sistema de liberación de reactivos puede incluir un sistema de pipeteado o un sistema de flujo continuo que conecta la unidad de procesamiento de muestras con el depósito de reactivos.

20 Una unidad de análisis y control de adquisición de datos puede monitorizar varios parámetros del sistema. Los parámetros del sistema pueden incluir la temperatura de varias partes del instrumento, tal como una unidad de procesamiento de muestras o depósitos de reactivos, volúmenes de varios reactivos, el estado de varios subcomponentes del sistema, como un manipulador, un motor paso a paso, una bomba o similar o cualquier combinación de los mismos.

25 Un experto en la técnica apreciará que diversas realizaciones de los instrumentos y sistemas desvelados en el presente documento se usan para practicar procedimientos de secuenciación tales como secuenciación por síntesis, procedimientos de molécula única y otras técnicas de secuenciación. La secuenciación por síntesis puede incluir la incorporación de nucleótidos marcados con colorante, la terminación de la cadena, la secuenciación de iones/protones, la secuenciación de pirofosfatos o similares. Las técnicas de una sola molécula pueden incluir una secuenciación escalonada, en la que las reacciones de secuenciación se detienen para determinar la identidad del nucleótido incorporado.

30 El instrumento de secuenciación puede determinar la secuencia de un ácido nucleico, tal como un polinucleótido o un oligonucleótido. El ácido nucleico puede incluir ADN o ARN, y puede ser monocatenario, tal como ADNss y ARN, o bicatenario, como ADNds o un par de ARNA/ADNc. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede incluir o derivar de una biblioteca de fragmentos, una biblioteca de pares de parejas, un fragmento de ChIP, o similar. El instrumento de secuenciación puede obtener la información de secuencia de una única molécula de ácido nucleico o de un grupo de moléculas de ácido nucleico sustancialmente idénticas.

40 El instrumento de secuenciación puede generar datos de lectura de secuenciación de ácidos nucleicos en diversos tipos/formatos diferentes de archivos de datos de salida, que incluyen, entre otros: *.txt, *.fasta, *.csfasta, *seq.txt, *qseq.txt, *.fastq, *.sff, *.prb.txt, *.sms, *srs, y/o *.qv.

45 En algunas realizaciones, la tecnología comprende una tecnología de secuenciación de última generación. Las tecnologías de secuenciación particulares contempladas por la tecnología son los procedimientos de secuenciación de última generación (NGS) que comparten la característica común de las estrategias masivas paralelas y de alto rendimiento, con el objetivo de reducir los costes en comparación con los procedimientos de secuenciación más antiguos (véase Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296). Los procedimientos de NGS se pueden dividir en términos generales en los que normalmente utilizan la amplificación del molde y los que no. Los procedimientos que requieren amplificación incluyen pirosecuenciación comercializada por Roche como las plataformas tecnológicas 454 (por ejemplo, GS 20 y GS FLX), la plataforma Solexa comercializada por Illumina y la plataforma de Detección y ligación de oligonucleótidos compatibles (SOLiD) comercializada por Applied Biosystems. Los enfoques sin amplificación, también conocidos como secuenciación de una sola molécula, están ilustrados como ejemplo por la plataforma HeliScope comercializada por Helicos BioSciences, y las plataformas emergentes comercializadas por VisiGen, Oxford Nanopore Technologies Ltd., Life Technologies/Ion Torrent y Pacific Biosciences, respectivamente.

60 En pirosecuenciación (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; patentes de Estados Unidos N.º 6.210.891, patente de Estados Unidos N.º 6.258.568), la biblioteca de fragmentos NGS se amplifica clonalmente *in situ* mediante la captura de moléculas de un solo molde con perlas portadoras de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. Cada perla portadora de un tipo de molde único se compartimenta en una microvesícula de agua en aceite y el molde se amplifica por clonación utilizando una técnica denominada PCR en emulsión. La emulsión se rompe después de la amplificación y las perlas se depositan
65 en los pocillos individuales de una placa de picotitulación que funciona como una celda de flujo durante las reacciones de secuenciación. La introducción iterativa ordenada de cada uno de los cuatro reactivos dNTP se

produce en la celda de flujo en presencia de enzimas secuenciadoras e indicadores luminiscentes, tal como luciferasa. En el caso de que se añada un dNTP apropiado al extremo 3' del cebador de secuenciación, la producción resultante de ATP causa una explosión de luminiscencia dentro del pocillo, que se registra con una cámara CCD. Es posible lograr longitudes de lectura mayores o iguales a 400 bases y se pueden lograr 106 lecturas de secuencia, lo que da como resultado hasta 500 millones de pares de bases (Mb) de secuencia.

En la plataforma Solexa/Illumina (Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patentes de Estados Unidos N.º 6.833.246, patente de Estados Unidos N.º 7.115.400, patente de Estados Unidos n.º 6.969.488), los datos de secuenciación se producen en forma de lecturas de longitud más corta. En este procedimiento, los fragmentos de la biblioteca de fragmentos de NGS se capturan en la superficie de una celda de flujo que está tachonada con anclajes de oligonucleótidos. El anclaje se usa como un cebador de PCR, pero debido a la longitud del molde y su proximidad a otros oligonucleótidos de anclaje cercanos, la extensión por PCR da como resultado el "arqueado" de la molécula para hibridar con un oligonucleótido de anclaje adyacente para formar una estructura de puente en la superficie de la celda de flujo. Estos bucles de ADN están desnaturalizados y escindidos. A continuación, las cadenas directas se secuencian con terminadores de colorante reversibles. La secuencia nucleotídica incorporada se determina mediante la detección de fluorescencia posterior a la incorporación, con cada flúor y bloque eliminado antes del siguiente ciclo de adición de dNTP. La longitud de lectura de la secuencia varía de 36 nucleótidos a más de 100 nucleótidos, con un rendimiento general que excede los mil millones de pares de nucleótidos por ronda de análisis.

La secuenciación de moléculas de ácido nucleico utilizando la tecnología SOLiD (Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patentes de Estados Unidos N.º 5.912.148, patente de Estados Unidos No. 6,130,073) también implica la amplificación clonal de la biblioteca de fragmentos NGS por PCR en emulsión. A continuación, las perlas portadoras del molde se inmovilizan sobre una superficie derivatizada de una celda de flujo de vidrio, y se hibrida un cebador complementario al oligonucleótido adaptador. Sin embargo, en lugar de utilizar este cebador para la extensión en 3', en su lugar se utiliza para proporcionar un grupo fosfato en 5' para la ligación de las sondas problema que contienen dos bases específicas de la sonda seguidas de 6 bases degeneradas y uno de cuatro marcadores fluorescentes. En el sistema SOLiD, las sondas problema tienen 16 combinaciones posibles de las dos bases en el extremo 3' de cada sonda y una de los cuatro flúor en el extremo 5'. El color flúor, y por lo tanto la identidad de cada sonda, corresponde a esquemas de codificación de espacio de color especificados. A múltiples rondas (habitualmente 7) de hibridación de sondas, ligación y detección de fluorescencia les sigue desnaturalización y, después, una segunda ronda de secuenciación utilizando un cebador que está desplazado por una base con respecto al cebador inicial. De esta manera, la secuencia del molde se puede reconstruir computacionalmente y las bases del molde se interrogan dos veces, lo que da como resultado una mayor precisión. La longitud de lectura de la secuencia promedia 35 nucleótidos y la producción general supera los 4 mil millones de bases por ciclo de secuenciación.

En ciertas realizaciones, se emplea HeliScope de Helicos BioSciences (Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patentes de Estados Unidos N.º 7.169.560, patente de Estados Unidos N.º 7.282.337, patente de Estados Unidos N.º 7.482.120, patente de Estados Unidos N.º 7.501.245, patente de Estados Unidos N.º 6.818.395, patente de Estados Unidos N.º 6.911.345, patente de Estados Unidos n.º 7.501.245). La secuenciación se logra mediante la adición de polimerasa y la adición en serie de reactivos de dNTP marcados con fluorescencia. Los eventos de incorporación dan como resultado una señal fluorescente correspondiente al dNTP y la señal es capturada por una cámara CCD antes de cada ronda de adición de dNTP. La longitud de lectura de la secuencia varía de 25 a 50 nucleótidos, con una producción general superior a mil millones de pares de nucleótidos por ronda de análisis.

En algunas realizaciones, se usa la secuenciación 454 de Roche (Margulies et al. (2005) *Nature* 437: 376-380). La secuenciación 454 implica dos etapas. En la primera etapa, el ADN se corta en fragmentos de aproximadamente 300-800 pares de bases y los fragmentos tienen extremos romos. Los adaptadores de oligonucleótidos se ligan a continuación a los extremos de los fragmentos. Los adaptadores sirven como cebadores para la amplificación y secuenciación de los fragmentos. Los fragmentos se pueden unir a las perlas de captura de ADN, por ejemplo, perlas recubiertas con estreptavidina usando, por ejemplo, un adaptador que contiene un marcador de 5'-biotina. Los fragmentos unidos a las perlas se amplifican por PCR dentro de gotitas de una emulsión de aceite-agua. El resultado son múltiples copias de fragmentos de ADN amplificados clonalmente en cada perla. En la segunda etapa, las perlas se capturan en pocillo (tamaño pico-litro). La pirosecuenciación se realiza en cada fragmento de ADN en paralelo. La adición de uno o más nucleótidos genera una señal de luz que es grabada por una cámara CCD en un instrumento de secuenciación. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La pirosecuenciación hace uso del pirofosfato (PPi) que se libera tras la adición de nucleótidos. El PPi se convierte en ATP por la ATP sulfurilasa en presencia de adenosina 5' fosfosulfato. La luciferasa usa ATP para convertir la luciferina en oxiluciferina, y esta reacción genera luz que se detecta y analiza.

La tecnología Ion Torrent es un procedimiento de secuenciación de ADN basado en la detección de iones de hidrógeno que se liberan durante la polimerización del ADN (véase, por ejemplo, *Science* 327 (5970): 1190 (2010); publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090026082, 20090127589, 20100301398, 20100197507, 20100188073y 20100137143). Un micropocillo contiene un fragmento de la biblioteca de fragmentos

NGS que se va a secuenciar. Debajo de la capa de micropocillos hay un sensor de iones ISFET hipersensible. Todas las capas están contenidas dentro de un chip semiconductor CMOS, similar al utilizado en la industria electrónica. Cuando se incorpora un dNTP a la cadena complementaria en crecimiento, se libera un ion de hidrógeno, que activa un sensor de iones hipersensible. Si las repeticiones de homopolímeros están presentes en la secuencia del molde, se incorporarán múltiples moléculas de dNTP en un solo ciclo. Esto conduce a un número correspondiente de hidrógenos liberados y una señal electrónica proporcionalmente más alta. Esta tecnología difiere de otras tecnologías de secuenciación en que no se utilizan nucleótidos u ópticas modificados. La precisión por base del secuenciador Ion Torrent es de -99,6 % para 50 lecturas de bases, con -100 Mb generados por ciclo. La longitud de lectura es de 100 pares de bases. La precisión para las repeticiones de homopolímeros de 5 repeticiones de longitud es de ~ 98 %. Los beneficios de la secuenciación de semiconductores iónicos son la velocidad de secuenciación rápida y los bajos costes iniciales y operativos. Sin embargo, el coste de adquirir un secuenciador mediado por pH es de aproximadamente 50.000 dólares americanos, excluyendo el equipo de preparación de muestras y un servidor para el análisis de datos.

Los documentos US2001/044109 y WO2010/097775 son ejemplos de procedimientos de secuenciación utilizando microtranspondedores.

Otro enfoque de ejemplo de secuenciación de ácidos nucleicos que puede adaptarse para su uso con la presente divulgación fue desarrollado por Stratos Genomics, Inc. e implica el uso de Xpandómeros. Este proceso de secuenciación típicamente incluye proporcionar una cadena hija producida por una síntesis dirigida por el molde. La cadena hija generalmente incluye una pluralidad de subunidades acopladas en una secuencia correspondiente a una secuencia de nucleótidos contigua de todo o una parte de un ácido nucleico diana en el que las subunidades individuales comprenden un enlace, al menos una sonda o un residuo de base nitrogenada, y al menos un enlace que se puede escindir de forma selectiva. El o los enlaces que se pueden escindir de forma selectiva se escinden para producir un Xpandómero de una longitud más larga que la pluralidad de subunidades de la cadena hija. El Xpandómero incluye típicamente los enlaces y los elementos indicadores para analizar la información genética en una secuencia correspondiente a la secuencia de nucleótidos contigua de todo o una parte del ácido nucleico diana. A continuación se detectan los elementos indicadores del Xpandómero. Los detalles adicionales relacionados con los enfoques basados en Xpandómero se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 20090035777, titulada "SECUENCIACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS DE ALTO RENDIMIENTO POR EXPANSIÓN", presentada el 19 de junio de 2008.

Otros procedimientos de secuenciación de una sola molécula incluyen la secuenciación en tiempo real por síntesis utilizando una plataforma VisiGen (Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-58, 2009; patente de Estados Unidos N.º 7.329.492, solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/671956; solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/781166) en la que los fragmentos de la biblioteca de fragmentos NGS se inmovilizan, ceban y luego se someten a una extensión de la cadena utilizando una polimerasa modificada con fluorescencia y moléculas aceptoras fluorescentes, lo que da como resultado una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia detectable (FRET) tras la adición de nucleótidos.

Otro sistema de secuenciación de una sola molécula en tiempo real desarrollado por Pacific Biosciences (Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patentes de Estados Unidos N.º 7.170.050, patente de Estados Unidos N.º 7.302.146, patente de Estados Unidos N.º 7.313.308, patente de Estados Unidos No. 7,476,503) utiliza pocillos de reacción de 50-100 nm de diámetro y que abarcan un volumen de reacción de aproximadamente 20 zeptolitros (10⁻²¹ l). Las reacciones de secuenciación se realizan utilizando un molde inmovilizado, ADN polimerasa de phi29 modificada y altas concentraciones locales de dNTP marcados con fluorescencia. Las altas concentraciones locales y las condiciones de reacción continua permiten que los eventos de incorporación se capturen en tiempo real mediante la detección de señales fluorescentes mediante excitación con láser, una guía de onda óptica y una cámara CCD.

En ciertas realizaciones, se emplean los procedimientos de secuenciación del ADN en tiempo real de una sola molécula (SMRT) usando guías de onda de modo cero (ZMW) desarrolladas por Pacific Biosciences, o procedimientos similares. Con esta tecnología, la secuenciación de ADN se realiza en chips de SMRT, cada uno de los cuales contiene miles de guías de onda de modo cero (ZMW). Un ZMW es un agujero, de decenas de nanómetros de diámetro, fabricado en una película metálica de 100 nm depositada sobre un sustrato de dióxido de silicio. Cada ZMW se convierte en una cámara de visualización nanofotónica que proporciona un volumen de detección de solo 20 zeptolitros (10⁻²¹ l). En este volumen, la actividad de una sola molécula puede detectarse entre un fondo de miles de nucleótidos marcados. La ZMW proporciona una ventana para observar la ADN polimerasa a medida que realiza la secuenciación por síntesis. Dentro de cada cámara, una única molécula de ADN polimerasa está unida a la superficie inferior de manera que reside permanentemente dentro del volumen de detección. Los nucleótidos unidos por fósforo, cada tipo marcado con un fluoróforo de diferente color, se introducen en la solución de reacción en altas concentraciones que promueven la velocidad, precisión y procesividad de la enzima. Debido al pequeño tamaño de la ZMW, incluso a estas altas concentraciones biológicamente relevantes, el volumen de detección está ocupado por los nucleótidos solo una pequeña fracción del tiempo. Además, las visitas al volumen de detección son rápidas y duran solo unos pocos microsegundos, debido a la pequeña distancia que la difusión tiene para transportar los nucleótidos. El resultado es un fondo muy bajo.

- En algunas realizaciones, se utiliza la secuenciación de nanoporos (Soni G V y Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996-2001). Un nanoporo es un agujero pequeño, del orden de 1 nanómetro de diámetro. La inmersión de un nanoporo en un fluido conductor y la aplicación de un potencial a través de él da como resultado una ligera corriente eléctrica debido a la conducción de iones a través del nanoporo. La cantidad de corriente que fluye es sensible al tamaño del nanoporo. Cuando una molécula de ADN pasa a través de un nanoporo, cada nucleótido en la molécula de ADN obstruye el nanoporo en un grado diferente. Por lo tanto, el cambio en la corriente que pasa a través del nanoporo a medida que la molécula de ADN pasa a través del nanoporo representa una lectura de la secuencia de ADN.
- En algunas realizaciones, una técnica de secuenciación utiliza una matriz de transistores de efecto de campo (chemFET) sensibles a químicos para secuenciar ADN (por ejemplo, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20090026082). En un ejemplo de la técnica, las moléculas de ADN se colocan en cámaras de reacción y las moléculas molde se hibridan con un cebador de secuenciación unido a una polimerasa. La incorporación de uno o más trifosfatos en una nueva cadena de ácido nucleico en el extremo 3' del cebador de secuenciación puede detectarse por un cambio en la corriente por parte de un chemFET. Una matriz puede tener múltiples sensores chemFET. En otro ejemplo, se pueden unir ácidos nucleicos individuales a las perlas y los ácidos nucleicos se pueden amplificar en la perla, y las perlas individuales se pueden transferir a cámaras de reacción individuales en una matriz chemFET, teniendo cada cámara un sensor chemFET y se pueden secuenciar los ácidos nucleicos.
- En algunas realizaciones, la técnica de secuenciación utiliza un microscopio electrónico (Moudrianakis E. N. y Beer M. Proc Natl Acad Sci USA. Marzo de 1965; 53: 564-71). En un ejemplo de la técnica, las moléculas de ADN individuales se marcan con marcadores metálicos que se pueden distinguir con un microscopio electrónico. Estas moléculas se estiran después sobre una superficie plana y se toman imágenes con un microscopio electrónico para medir las secuencias.
- En algunas realizaciones, "secuenciación de cuatro colores por síntesis usando terminadores reversibles de nucleótidos fluorescentes escindibles" como se describe en Turro, et al. PNAS 103: 19635-40 (2006) se utiliza, por ejemplo, como se comercializa por Intelligent Bio-Systems. La tecnología descrita en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2010/0323350, 2010/0063743, 2010/0159531, 20100035253, 20100152050.
- Los procesos, composiciones y sistemas para la secuenciación que pueden adaptarse para su uso con la divulgación se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.405.281, tituladas "Análogos nucleotídicos fluorescentes y usos de los mismos", expedida el 29 de julio de 2008 a Xu et al.; 7.315.019, titulada "Matrices de confinamientos ópticos y usos de los mismos", expedida el 1 de enero de 2008 a Turner et al.; 7.313.308, titulada "Análisis óptico de moléculas", expedida el 25 de diciembre de 2007 a Turner et al.; 7.302.146, titulada "Aparato y procedimiento para análisis de moléculas", expedida el 27 de noviembre de 2007 a Turner et al.; y 7.170.050, titulada "Aparato y procedimiento para análisis óptico de moléculas", expedida el 30 de enero de 2007 a Turner et al.; y las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20080212960, titulada "Procedimientos y sistemas para la monitorización simultánea en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentada el 26 de octubre de 2007 por Lundquist et al.; 20080206764, titulada "Sistema de celda de flujo para la detección de una sola molécula", presentada el 26 de octubre de 2007 por Williams et al.; 2008a199932, titulada "Polimerasas acopladas a superficie activa", presentada el 26 de octubre de 2007 por Hanzel et al.; 20080199874, titulada "ESCISIÓN POR CADENAS CONTROLABLE DE ADN DE CÍRCULO PEQUEÑO", presentada el 11 de febrero de 2008 por Otto et al.; 20080176769, titulada "Artículos que tienen moléculas localizadas dispuestas en ellos y procedimientos para producirlos", presentada el 26 de octubre de 2007 por Rank et al.; 20080176316, titulada "Mitigación del fotodaño en reacciones analíticas", presentada el 31 de octubre de 2007 por Eid et al.; 20080176241, titulada "Mitigación del fotodaño en reacciones analíticas", presentada el 31 de octubre de 2007 por Eid et al.; 20080165346, titulado "Procedimientos y sistemas para el monitoreo simultáneo en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentado el 26 de octubre de 2007 por Lundquist et al.; 20080160531, titulado "Superficies uniformes para sustratos de materiales híbridos y procedimientos para hacer y usar los mismos", presentada el 31 de octubre de 2007 por Korlach; 20080157005, titulado "Procedimientos y sistemas para el monitoreo simultáneo en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentado el 26 de octubre de 2007 por Lundquist et al.; 20080153100, titulado "Artículos que tienen moléculas localizadas dispuestas en ellos y procedimientos para producirlos", presentada el 31 de octubre de 2007 por Rank et al.; 20080153095, titulada "CHARGE SWITCH NUCLEOTIDES", presentada el 26 de octubre de 2007 por Williams et al.; 20080152281, titulado "Sustratos, sistemas y procedimientos para analizar materiales", presentado el 31 de octubre de 2007 por Lundquist et al.; 20080152280, titulado "Sustratos, sistemas y procedimientos para analizar materiales", presentado el 31 de octubre de 2007 por Lundquist et al.; 20080145278, titulado "Superficies uniformes para sustratos de materiales híbridos y procedimientos para hacer y usar los mismos", presentada el 31 de octubre de 2007 por Korlach; 20080128627, titulada "SISTRATOS, SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA ANALIZAR MATERIALES", presentada el 31 de agosto de 2007 por Lundquist et al.; 20080108082, titulado "Enzimas y reactivos de la polimerasa para mejorar la secuenciación de ácidos nucleicos", presentada el 22 de octubre de 2007 por Rank et al.; 20080095488, titulada "SISTRATOS PARA REALIZAR REACCIONES ANALÍTICAS", presentada el 11 de junio de 2007 por Foquet et al.; 20080080059, titulado "COMPONENTES Y SISTEMAS ÓPTICOS MODULARES QUE INCORPORAN AL MISMO", presentado el 27 de septiembre de 2007 por Dixon et al.; 20080050747, titulado "Artículos que tienen moléculas

localizadas dispuestas en ellos y procedimientos para producirlos y utilizarlos", presentada el 14 de agosto de 2007 por Korlach et al.; 20080032301, titulado "Artículos con moléculas localizadas dispuestas en el mismo y procedimientos para producir las mismas", presentada el 29 de marzo de 2007 por Rank et al.; 20080030628, titulado "Procedimientos y sistemas para el monitoreo simultáneo en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentado el 9 de febrero de 2007 por Lundquist et al.; 20080009007, titulado "INICIACIÓN CONTROLADA DE LA AMPLIACIÓN PRIMER", presentada el 15 de junio de 2007 por Lyle y otros; 20070238679, titulado "Artículos que tienen moléculas localizadas dispuestas en ellos y procedimientos para producirlos", presentada el 30 de marzo de 2006 por Rank et al.; 20070231804, titulado "Procedimientos, sistemas y composiciones para controlar la actividad enzimática y sus aplicaciones", presentada el 31 de marzo de 2006 por Korlach et al.; 20070206187, titulado "Procedimientos y sistemas para el monitoreo simultáneo en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentado el 9 de febrero de 2007 por Lundquist et al.; 20070196846, titulada "Polimerasas para la incorporación de análogos de nucleótidos", presentada el 21 de diciembre de 2006 por Hanzel et al.; 20070188750, titulado "Procedimientos y sistemas para el monitoreo simultáneo en tiempo real de señales ópticas de múltiples fuentes", presentado el 7 de julio de 2006 por Lundquist et al.; 20070161017, titulado "MITIGACIÓN DE LA FOTODAMAGA EN REACCIONES ANALÍTICAS", presentada el 1 de diciembre de 2006 por Eid et al.; 20070141598, titulada "Composiciones de nucleótidos y sus usos", presentada el 3 de noviembre de 2006 por Turner et al.; 20070134128, titulado "Superficies uniformes para sustrato de material híbrido y procedimientos para fabricar y usar el mismo", presentada el 27 de noviembre de 2006 por Korlach; 20070128133, titulada "Mitigación del fotodaño en reacciones analíticas", presentada el 2 de diciembre de 2005 por Eid et al.; 20070077564, titulada "Superficies reactivas, sustratos y procedimientos para producirlos", presentada el 30 de septiembre de 2005 por Roitman et al.; 20070072196, titulado "Análogos de nucleótidos fluorescentes y usos por lo tanto", presentada el 29 de septiembre de 2005 por Xu et al.; y 20070036511, titulado "Procedimientos y sistemas para monitorear múltiples señales ópticas de una sola fuente", presentada el 11 de agosto de 2005 por Lundquist et al.; y Korlach et al. (2008) "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures" PNAS 105(4): 1176-81.

En algunos ejemplos, al menos una de las bases nucleotídicas marcadas comprende un conjunto de bases nucleotídicas marcadas. El término "marcador" o "marca" se usa de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a cualquier resto químico unido a un nucleótido o ácido nucleico, en el que la unión puede ser covalente o no covalente. Preferentemente, el marcador es detectable y hace que el nucleótido o el ácido nucleico sea detectable para el profesional de la tecnología. Los marcadores detectables de ejemplo que encuentran uso con la tecnología proporcionada en el presente documento incluyen, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un inactivador, un marcador radioactivo, biotina y oro, o combinaciones de las mismas. Los marcadores detectables incluyen moléculas luminiscentes, fluorocromos, agentes de inactivación fluorescentes, moléculas coloreadas (por ejemplo, cromógenos utilizados para la hibridación in situ (ISH, FISH) y aplicaciones de imágenes de campo brillante), radioisótopos o agentes de centelleo. Los marcadores detectables también incluyen cualquier molécula enlazadora útil (tal como biotina, avidina, digoxigenina, estreptavidina, HRP, proteína A, proteína G, anticuerpos o fragmentos de los mismos, Grb2, polihistidina, Ni²⁺, marcadores FLAG, marcadores myc), metales pesados, enzimas (los ejemplos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa y luciferasa), donantes/aceptores de electrones, ésteres de acridinio, colorantes y sustratos calorimétricos. También se prevé que un cambio en la masa se pueda considerar un marcador detectable, por ejemplo, como se encuentra en la detección por resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, el marcador comprende un resto detectable por fluorescencia que se basa en un colorante, en el que el colorante es un xanteno, fluoresceína, rodamina, BODIPY, cianina, cumarina, pireno, ftalocianina, fitobiliproteína, FLAOR® 350, ALEXA FLUOR® 405, ALEXA FLUOR® 430, ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 514, ALEXA FLUOR® 532, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 555, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 594, ANEXO, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 647, ALEXA FLUOR® 660, ALEXA FLUOR® 680, ALEXA FLUOR® 700, ALEXA FLUOR® 750, un cristal semiconductor fluorescente, o un colorante de esquarteraína. En algunas realizaciones, el marcador o marca comprende un radioisótopo, un marcador de espín, un punto cuántico o un resto bioluminiscente. En algunas realizaciones, el marcador es un resto detectable por fluorescencia como se describe en, por ejemplo, Haugland (September 2005) MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (10ª ed.).

En algunas realizaciones, el marcador (por ejemplo, un marcador detectable por fluorescencia) es uno disponible de ATTO-TEC GmbH (Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Alemania), por ejemplo, como se describe en las publicaciones de patente de Patente de Estados Unidos n.º 20110223677, 20110190486, 20110172420, 20060179585y 20030003486; y en la patente de Estados Unidos n.º 7.935.822.

En algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas marcadas comprende una o más de un marcador radioactivo, marcador metálico, punto cuántico, marcador fluorescente, marcador luminiscente, marcadores de masa, marcador enzimático, etc. En realizaciones particulares, el marcador detectable puede ser un marcador detectable ópticamente, tal como un marcador fluorescente. Los ejemplos de marcadores fluorescentes (para secuenciación y/u otros fines, tales como el marcaje de un ácido nucleico, cebador, sonda, etc.) incluyen cianina, rodamina, fluoresceína, cumarina, BODIPY, alexa, o múltiples colorantes conjugados. En algunos ejemplos, al

menos una de las bases nucleotídicas marcadas puede comprender un marcador óptico y/o al menos una de las bases nucleotídicas marcadas puede comprender un marcador electroquímico.

5 En algunos sistemas de ejemplo, la estación de identificación comprende un medidor de flujo. En algunos ejemplos, la estación de reacción es usar un solo marcador para una pluralidad de bases nucleotídicas. En algunos ejemplos, la estación de reacción es utilizar un marcador diferente para cada base nucleotídica para diferenciar diferentes bases nucleotídicas. En algunos ejemplos, la estación de reacción es añadir al menos una de la primera, segunda o enésima base nucleotídica marcada como una sola base. En algunos ejemplos, la estación de reacción es añadir al menos una de la primera, segunda o enésima bases nucleotídicas marcadas como oligonucleótido. En algunos ejemplos, el oligonucleótido comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos.

10 Algunos sistemas de ejemplo desvelados en el presente documento incluyen una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana. Además, algunos sistemas de ejemplo desvelados en el presente documento incluyen un dispositivo de chip microfluídico que comprende uno o más de la estación de amplificación, la estación de reacción, la estación de lavado o la estación de identificación.

En algunos ejemplos, el número enésimo representa un final de sustancialmente una secuencia completa.

20 Un ejemplo de procedimiento desvelado en el presente documento incluye someter una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en un microtranspondedor a una pluralidad de reacciones de secuenciación para construir una secuencia de bases nucleotídicas marcadas que son complementarias y se unen a la secuencia de bases nucleotídicas diana. El procedimiento de ejemplo también incluye identificar cada base nucleotídica marcada de la secuencia de bases nucleotídicas marcadas y cada base nucleotídica diana complementaria respectiva de la secuencia de bases nucleotídicas diana a las que se une la base nucleotídica marcada después de cada reacción de secuenciación y antes de una reacción de secuenciación posterior. Además, el procedimiento de ejemplo incluye asociar cada una de las bases nucleotídicas marcadas de la secuencia de bases nucleotídicas marcadas y cada respectiva base nucleotídica diana complementaria de la secuencia de bases nucleotídicas diana a las que la base nucleotídica marcada está unida con un número de identificación del microtranspondedor.

30 Algunos ejemplos también incluyen amplificar clonalmente las bases nucleotídicas diana mediante una reacción en cadena de la polimerasa en emulsión antes de la reacción de secuenciación. En algunos ejemplos, la identificación de la base nucleotídica marcada comprende detectar la base nucleotídica marcada con un medidor de flujo.

35 Además, algunos procedimientos de ejemplo desvelados en el presente documento incluyen el uso de un solo marcador para una pluralidad de bases nucleotídicas. Algunos procedimientos de ejemplo incluyen el uso de un marcador diferente para cada base nucleotídica para diferenciar bases nucleotídicas diferentes. Además, algunos procedimientos de ejemplo incluyen añadir la base nucleotídica marcada como una sola base. Además, algunos procedimientos de ejemplo desvelados en el presente documento incluyen añadir la enésima base nucleotídica marcada como un oligonucleótido. Algunos procedimientos de ejemplo incluyen el uso de una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana. Asimismo, algunos procedimientos de ejemplo incluyen realizar al menos una parte del procedimiento en un dispositivo de chip microfluídico. Además, en algunos ejemplos, las reacciones de secuenciación se repiten hasta que se identifica sustancialmente una totalidad de la secuencia de bases nucleotídicas diana.

45 Otro procedimiento de ejemplo desvelado en el presente documento incluye capturar un ácido nucleico diana en una superficie de un microtranspondedor a través de una sonda de captura, amplificar clonalmente el ácido nucleico diana en la superficie para formar dianas clonales unidas a la superficie y someter las dianas clonales unidas a la superficie a una primera reacción de polimerización o una primera reacción de ligación para añadir una primera base nucleotídica marcada que es complementaria a una primera base nucleotídica en una secuencia del ácido nucleico diana. El procedimiento de ejemplo también incluye la eliminación de un reactivo de polimerización extraño resultante de la primera reacción de polimerización o un reactivo de ligación extraño resultante de la primera reacción de ligación y la determinación de una identidad de la primera base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana y una identidad de la primera base nucleotídica marcada utilizando un número de identificación de microtranspondedor y un primer marcador de la primera base nucleotídica marcada, respectivamente. Además, el procedimiento de ejemplo incluye someter las dianas clonales unidas a la superficie a una segunda a una enésima cantidad de reacciones de polimerización o ligación posteriores para añadir secuencialmente una segunda a enésima base nucleotídica marcada que son, respectivamente, complementarias a segunda a enésima base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana. El número enésimo se basa en el número de bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana. Además, el procedimiento de ejemplo incluye la eliminación del reactivo de polimerización o ligación extraño resultante del segundo a enésimo reactivos de polimerización o ligación después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas y determinar, después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas, una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana y una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas utilizando el número de identificación del

microtranspondedor y un segundo a enésimo marcador de la segunda a enésima base nucleotídica marcada, respectivamente.

5 En el presente documento se desvela un procedimiento (por ejemplo, un procedimiento para secuenciar un ácido nucleico), comprendiendo el procedimiento someter una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en un microtranspondedor a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas que son complementarias y se unen a la secuencia de bases nucleotídicas diana; identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación; y asociar cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor. Las bases nucleotídicas diana pueden capturar a través de una sonda de captura. Las bases nucleotídicas diana pueden comprender ADN o ARN. Los procedimientos pueden comprender además amplificar clonalmente las bases nucleotídicas diana (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa en emulsión, por ejemplo, antes de la reacción de secuenciación). Al menos una de las bases nucleotídicas añadidas puede comprender un marcador. La tecnología no está limitada en los tipos de marcadores utilizados, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador óptico y en algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador electroquímico.

20 La identificación de la base nucleotídica añadida comprende detectar la base nucleotídica añadida empleando un medidor de flujo. En algunas realizaciones, la identificación comprende mover dicha base añadida desde una estación de reacción de un aparato a una estación de identificación de dicho aparato usando dicho medidor de flujo. En algunas realizaciones, la estación de identificación comprende un detector para detectar dicha base añadida, en el que dicho detector detecta una o más de una señal óptica, una señal eléctrica y una señal química. La tecnología no está limitada en el tipo de detector y/o modo de detección, por ejemplo, utilizado para detectar un marcador o un nucleótido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una base añadida se detecta mediante un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato o radioactividad. Además, en algunas realizaciones se usa un único marcador para una pluralidad de bases nucleotídicas añadidas y, en algunas realizaciones, se usa una pluralidad de marcadores diferentes para cada base nucleotídica añadida para diferenciar diferentes bases nucleotídicas añadidas. Y, en algunas realizaciones, la base añadida se añade como una base única y, en algunas realizaciones, la base añadida se añade como un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35 nucleótidos).

35 En realizaciones adicionales, los procedimientos comprenden el uso de una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana. Y, algunas realizaciones proporcionan un procedimiento que comprende realizar al menos una parte del procedimiento en un dispositivo de chip microfluídico. El procedimiento encuentra uso en la secuenciación de un ácido nucleico; así, en algunas realizaciones, las reacciones de secuenciación se repiten hasta que se identifica sustancialmente una totalidad de la secuencia de bases nucleotídicas diana.

40 En el presente documento también se desvela un aparato que comprende un microtranspondedor que tiene una superficie en la que se va a capturar un ácido nucleico diana mediante una sonda de captura; una estación de reacción para someter el ácido nucleico diana unido a la superficie a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas que son complementarias y se unen a la secuencia de bases nucleotídicas diana; una estación de lavado para eliminar un reactivo de secuenciación extraño resultante de la pluralidad de reacciones de secuenciación; y una estación de identificación para identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación. El aparato puede comprender además una estación de amplificación para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana en la superficie para formar dianas clonales unidas a la superficie (por ejemplo, la estación de amplificación está sujeta al ácido nucleico diana unida a la superficie de un segundo a enésimo número de reacciones de secuenciación sucesivas). El segundo a enésimo número de reacciones de secuenciación sucesivas puede añadir una segunda a enésima base nucleotídica que son complementarias de una segunda a enésima base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana, en la que n es igual o menor que el número de bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana.

55 Cuando hay una estación de lavado, la estación de lavado puede eliminar el reactivo de secuenciación extraño resultante de la segunda a enésima reacciones de secuenciación después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la estación de identificación es para determinar una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana. Y, además, se proporcionan realizaciones en las que la estación de identificación asocia cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor.

60 En algunas realizaciones, una base nucleotídica comprende un marcador. El aparato no está limitado en el tipo de marcador utilizado para la detección, por ejemplo, en algunas realizaciones, de una base nucleotídica comprende un marcador óptico y, en algunas realizaciones, una base nucleotídica comprende un marcador electroquímico. En algunas realizaciones, la estación de reacción es para usar un solo marcador para una pluralidad de bases

nucleotídicas. En algunas realizaciones, la estación de reacción es para usar un marcador diferente para cada nucleótido para diferenciar bases nucleotídicas diferentes.

5 En algunas realizaciones, la sonda de captura comprende ADN o ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende ADN o ARN.

10 En algunas realizaciones, la estación de amplificación es para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana usando la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión. En algunas realizaciones, la estación de identificación comprende un medidor de flujo. En algunas realizaciones, la estación de identificación comprende un detector para detectar cada base nucleotídica añadida.

15 El aparato no está limitado en el tipo de señal detectada. Por ejemplo, un detector puede detectar una o más de una señal óptica, una señal eléctrica y una señal química. El detector puede detectar dicha base añadida por un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato o radioactividad.

En algunas realizaciones, la estación de identificación mueve dicha base añadida desde la estación de reacción del aparato a la estación de identificación de dicho aparato usando dicho medidor de flujo.

20 En algunas realizaciones, la base nucleotídica añadida se añade como una base única y, en algunas realizaciones, cada base añadida se añade como un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos).

25 En el presente documento también se desvela un aparato que comprende una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana. En el presente documento también se desvela un aparato que comprende un dispositivo de chip microfluídico, por ejemplo, un dispositivo de chip microfluídico que comprende uno o más de la estación de reacción, la estación de lavado o la estación de identificación, y/o la estación de amplificación.

30 El aparato encuentra uso en proporcionar una secuencia de nucleótidos; por lo tanto, el número n puede representar un final de sustancialmente una secuencia completa.

35 En el presente documento también se desvela un procedimiento que comprende someter una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en un microtranspondedor a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas que son complementarias y se unen a la secuencia de bases nucleotídicas diana; mover cada base nucleotídica añadida desde una estación de reacción de un aparato a una estación de identificación de dicho aparato usando un medidor de flujo; e identificando cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación. Los procedimientos pueden comprender además capturar un ácido nucleico diana en la superficie del microtranspondedor, por ejemplo, el ácido nucleico diana puede capturarse mediante una sonda de captura. En el presente documento también se desvela un procedimiento que comprende amplificar el ácido nucleico diana para formar dianas clonales unidas a la superficie. Los procedimientos pueden comprender además amplificar clonalmente las bases nucleotídicas diana, por ejemplo, en los que la amplificación clonal comprende una reacción en cadena de la polimerasa en emulsión (por ejemplo, antes de la reacción de secuenciación).

50 Los procedimientos pueden comprender eliminar un reactivo de secuenciación extraño. Y, los procedimientos pueden comprender repetir las reacciones de secuenciación hasta que se identifique sustancialmente una totalidad de la secuencia de bases nucleotídicas diana.

En algunas realizaciones, las bases nucleotídicas diana comprenden ADN o ARN.

55 La tecnología comprende el uso de un nucleótido que comprende un marcador. Al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador. La tecnología no está limitada en los marcadores particulares que se usan, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador óptico y, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador electroquímico. En algunas realizaciones se usa un único marcador para una pluralidad de bases nucleotídicas añadidas y, en algunas realizaciones, se usa una pluralidad de marcadores diferentes para cada base nucleotídica añadida para diferenciar diferentes bases nucleotídicas añadidas. En algunas realizaciones, la base añadida se añade como una base única y, en algunas realizaciones, la base añadida se añade como un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35 nucleótidos).

65 La identificación de la base nucleotídica añadida comprende detectar la base nucleotídica añadida empleando un medidor de flujo. En algunas realizaciones, la estación de identificación comprende un detector para detectar dicha

base añadida, en el que dicho detector detecta una o más de una señal óptica, una señal eléctrica y una señal química. En algunas realizaciones, la base añadida se detecta mediante un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato o radioactividad.

5 En algunas realizaciones de los procedimientos, los procedimientos comprenden el uso de una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana. Algunas realizaciones comprenden realizar al menos una parte del procedimiento en un dispositivo de chip microfluídico, por ejemplo, un dispositivo de chip microfluídico que comprende uno o más de la estación de reacción, la estación de amplificación, la estación de lavado y/o la estación de identificación.

10 En el presente documento se desvela un procedimiento (por ejemplo, un procedimiento para secuenciar un ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento (por ejemplo, que comprende realizar una o más de las etapas siguientes en cualquier orden en un dispositivo de chip microfluídico) someter una secuencia de bases nucleotídicas diana (por ejemplo, ADN y/o ARN) capturado (por ejemplo, mediante una sonda de captura) en un microtranspondedor (por ejemplo, una pluralidad de microtranspondedores, por ejemplo, utilizado para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana) a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas (por ejemplo, que comprende un marcador (por ejemplo, un marcador óptico, un marcador electroquímico, un marcador de masa, etc.), por ejemplo, un marcador único utilizado para una pluralidad de bases nucleotídicas añadidas y/o una pluralidad de marcadores diferentes se utiliza para cada base nucleotídica añadida para diferenciar diferentes bases nucleotídicas añadidas) que son complementarias y se unen a la secuencia de las bases nucleotídicas diana (por ejemplo, añadiendo las bases como una sola base y/o como un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos)); identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación (por ejemplo, detectar la base nucleotídica añadida empleando un medidor de flujo, por ejemplo, mover dicha base añadida desde una estación de reacción de un aparato a una estación de identificación (por ejemplo, que comprende un detector para detectar dicha base añadida, en el que dicho detector detecta una o más señales ópticas, eléctricas y químicas, por ejemplo, detección de la base añadida por un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato o radioactividad) de dicho aparato usando dicho medidor de flujo); asociar cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor; amplificar clonalmente las bases nucleotídicas diana (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa en emulsión, por ejemplo, antes de la reacción de secuenciación); y/o repetir una o más etapas hasta que se identifique sustancialmente una totalidad de la secuencia de bases nucleotídicas diana.

35 En el presente documento también se desvela un aparato (por ejemplo, que comprende un dispositivo de chip microfluídico, por ejemplo, un dispositivo de chip microfluídico que comprende uno o más de las siguientes estación de reacción, estación de lavado, estación de identificación y/o estación de amplificación descritas a continuación) que comprende un microtranspondedor (por ejemplo, una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana que tiene una superficie en la que se debe capturar un ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN y/o ARN) a través de una sonda de captura (por ejemplo, que comprende ADN y/o ARN); una estación de reacción para someter al ácido nucleico diana unido a la superficie a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas (por ejemplo, que comprende un marcador (por ejemplo, un marcador óptico, un marcador electroquímico, un marcador de masa); por ejemplo, un marcador único utilizado para una pluralidad de bases nucleotídicas y/o un marcador diferente utilizado para cada nucleótido para diferenciar diferentes bases nucleotídicas) que son complementarias y están unidas a la secuencia de bases nucleotídicas diana (por ejemplo, añadidas como una sola base y/o como un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido que comprende hasta aproximadamente treinta nucleótidos, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21), 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos)); una estación de lavado para eliminar un reactivo de secuenciación extraño resultante de la pluralidad de reacciones de secuenciación (por ejemplo, para eliminar el reactivo de secuenciación extraño resultante de la segunda a la enésima reacciones de secuenciación después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas); y una estación de identificación (por ejemplo, que comprende un medidor de flujo y/o un detector para detectar cada base nucleotídica añadida (por ejemplo, mediante una señal óptica, una señal eléctrica y/o una señal química; y/o por un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato o radioactividad) para identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación (por ejemplo, para determinar una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana; por ejemplo, para asociar cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor y/o para mover dicha base añadida desde la estación de reacción del aparato a la estación de identificación de dicho aparato usando el medidor de flujo; una estación de amplificación para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana en la superficie para formar dianas clonales unidas a la superficie (por ejemplo, para amplificar clonalmente el ácido nucleico diana usando la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión; por ejemplo, para someter el ácido nucleico diana unido a la superficie a un segundo a enésimo número de reacciones de secuenciación sucesivas, por ejemplo, para añadir una segunda a enésima bases nucleotídicas que son complementarias a una segunda a enésima base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana, en el n es igual o menor que el número de bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana y el número n representa un final de sustancialmente una secuencia completa).

En el presente documento se desvelan ejemplos de medios de almacenamiento tangibles legibles por una máquina que tiene instrucciones, que cuando se ejecutan hacen que una máquina realice, por ejemplo, los procedimientos de ejemplo desvelados. Las instrucciones de ejemplo hacen que una máquina capture un ácido nucleico diana en una superficie de un microtranspondedor a través de una sonda de captura, amplifique clonalmente el ácido nucleico diana en la superficie para formar dianas clonales unidas a la superficie y someta las dianas clonales unidas a la superficie a una primera reacción de polimerización o a una primera reacción de ligación para añadir una primera base nucleotídica marcada que es complementaria a una primera base nucleotídica en una secuencia del ácido nucleico diana. Las instrucciones de ejemplo también hacen que la máquina retire un reactivo de polimerización extraño resultante de la primera reacción de polimerización o un reactivo de ligación extraño resultante de la primera reacción de ligación y determine una identidad de la primera base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana y una identidad de la primera base nucleotídica marcada utilizando un número de identificación de microtranspondedor y un primer marcador de la primera base nucleotídica marcada, respectivamente. Adicionalmente, las instrucciones de ejemplo hacen que la máquina someta las dianas clonales unidas a la superficie de un segundo a enésimo número de reacciones de polimerización o ligación posteriores para añadir secuencialmente una segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas que son, respectivamente, complementarias de una segunda a enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana. El número enésimo se basa en el número de bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana. Además, las instrucciones de ejemplo hacen que una máquina elimine el reactivo extraño de polimerización o ligación resultante del segundo a enésimo reactivos de polimerización o ligación después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas y la determinación, después de la adición de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas, una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas en la secuencia del ácido nucleico diana y una identidad de cada una de la segunda a enésima bases nucleotídicas marcadas utilizando el número de identificación del microtranspondedor y un segundo a enésimo marcador de la segunda a la enésima base nucleotídica marcada, respectivamente.

Volviendo ahora a las figuras, la figura 1 muestra un ejemplo de microtranspondedor 100 para su uso con los sistemas y procedimientos desvelados en el presente documento. El ejemplo de microtranspondedor 100 es un pequeño dispositivo basado en chip que comprende, por ejemplo, silicio. En algunos ejemplos, el microtranspondedor 100 tiene las dimensiones $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. El ejemplo de microtranspondedor 100 incluye un número de identificación numérico único o marca 102, que puede ser, en algunos ejemplos, una marca de identificación por radiofrecuencia (RFID). El ejemplo de microtranspondedor 100 incluye una antena 104 tal como, por ejemplo, una antena de bucle. La antena 104 permite que el microtranspondedor 100 transmita la identificación del microtranspondedor almacenado en o asociado con el marcador de identificación 102 a un dispositivo de identificación (o lector) para identificar el microtranspondedor 100. En algunos ejemplos, la identificación del microtranspondedor es un código alfanumérico o número único. El microtranspondedor 100 también incluye una fotocélula 106 que detecta la fluorescencia residente de cualquier base nucleotídica marcada unida al microtranspondedor 100, que se convierte y transmite como una señal digital de "sí" o "no" como se desvela con más detalle a continuación.

El ejemplo de microtranspondedor 100 tiene una superficie que se derivatiza con química de superficie para llevar sondas de captura. Las sondas de captura son capaces de hibridar con secuencias específicas de ácido nucleico y se utilizan para capturar ácidos nucleicos diana que deben identificarse. En algunos ejemplos, la sonda de captura comprende ADN o ARN.

Una muestra tal como, por ejemplo, una muestra de sangre u otro fluido corporal que contiene ácido nucleico desconocido y/o potencialmente uno o más ácidos nucleicos diana se lava o se introduce de otro modo en la superficie del microtranspondedor 100. En algunos ejemplos, el ácido nucleico diana comprende ADN o ARN. En algunos ejemplos, como se muestra en el sistema de ejemplo 200 de la figura 2, se añade una pluralidad de microtranspondedores 100 a una muestra 202. En el sistema de ejemplo 200, la pluralidad de microtranspondedores 100 se puede usar, por ejemplo, para un ensayo multiplex que contiene múltiples ácidos nucleicos diana. Asimismo, la muestra 202 y los microtranspondedores 100 pueden añadirse (por ejemplo, a través de una pipeta u otro mecanismo de administración) a un microchip, que se procesa en un componente o dispositivo de diagnóstico 204.

El componente de diagnóstico de ejemplo 204 incluye varias estaciones, que están ilustradas en la figura. 2 como estaciones discretas, pero pueden ser componentes integrales. El componente de diagnóstico 204 incluye una estación de amplificación 206. El ácido nucleico diana se amplifica clonalmente en la superficie del microtranspondedor 100 en la estación de amplificación 206. En algunos ejemplos, la amplificación se logra mediante la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión. Las dianas amplificadas forman dianas clonales unidas a la superficie.

El sistema de ejemplo 200 también incluye una estación de reacción 208. El microtranspondedor 100 es transportado desde la estación de amplificación 206 a la estación de reacción 208, donde las estaciones se colocan en diferentes ubicaciones físicas, a través de un mecanismo de transporte 210 que incluye, por ejemplo, un brazo robótico, un capilar microfluídico o cualquier otro mecanismo de transporte. En la estación de reacción 208, las dianas clonales unidas a la superficie se someten a una reacción de polimerización (SBS) o a una reacción de

ligación (SBL) para añadir una primera base nucleotídica marcada. Si la base nucleotídica a la que se expone la diana durante la reacción de SBS o SBL es complementaria a una primera base nucleotídica en una secuencia del ácido nucleico diana, la base nucleotídica marcada se une a la diana. Por lo tanto, si la primera base nucleotídica de la diana capturada es A, una T marcada (por ejemplo, teñida con fluorescencia) se apareará con la A. Cada microtranspondedor 100 en la muestra que tiene A como la primera base nucleotídica de la diana capturada tiene una T unida a la A. Si la primera base nucleotídica de la diana no es complementaria de la base nucleotídica presentada durante la reacción de SBS o SBL, el microtranspondedor 100 y la diana capturada continúan sin una base añadida. En algunos ejemplos, la base nucleotídica marcada añadida es un conjunto de bases nucleotídicas marcadas. Asimismo, el marcador puede ser un marcador óptico, un colorante fluorescente, un marcador radiactivo y/o un marcador electroquímico. En algunos ejemplos, se usa un solo tipo de marcador para una pluralidad de bases nucleotídicas. Sin embargo, en otros ejemplos, se utilizan diferentes tipos de marcadores (por ejemplo, diferentes colores) para diferenciar bases nucleotídicas diferentes. En algunos ejemplos, las bases nucleotídicas marcadas se agregan como bases individuales. Sin embargo, en otros ejemplos, las bases nucleotídicas marcadas se añaden como un oligonucleótido. Los oligonucleótidos pueden incluir varias bases nucleotídicas, tales como, por ejemplo, aproximadamente treinta bases nucleotídicas.

El sistema de ejemplo 200 incluye una estación de lavado 212 que se usa para eliminar cualquier reactivo de polimerización extraño resultante de la reacción de polimerización o un reactivo de ligación extraño que resulta de la reacción de ligación. Cada microtranspondedor 100 se queda con la diana de captura y una primera base nucleotídica marcada complementaria de la secuencia, si la base nucleotídica marcada añadida era complementaria de la primera base nucleotídica de la diana. Como se ha señalado anteriormente, si la base nucleotídica marcada no era complementaria de la primera base nucleotídica de la diana, los microtranspondedores 100 con tales dianas proceden sin una base nucleotídica añadida.

El sistema de ejemplo 200 también incluye una estación de identificación 214 para determinar una identidad de la primera base nucleotídica en la secuencia del ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, la estación de identificación 214 es un lector o medidor de flujo que lee las señales transmitidas por la antena 104 para detectar, por ejemplo, un 1 o 0 digital, que representa un sí/no indicativo de la presencia/ausencia del marcador. En algunos ejemplos, el lector de flujo detecta una presencia o ausencia de la fluorescencia u otro color para determinar si la base nucleotídica introducida en la estación de reacción 208 está unida a la primera base nucleotídica de la diana capturada. Asimismo, en algunos ejemplos, el lector de flujo puede determinar la intensidad del color. Si, por ejemplo, las dos primeras bases nucleotídicas de la diana capturada son las mismas y la base nucleotídica marcada introducida en la estación de reacción 208 es complementaria, dos de las bases nucleotídicas marcadas introducidas se unen en secuencia a la diana. La intensidad del color detectable se duplica porque dos bases nucleotídicas con marcadores están unidas. Por ejemplo, si la diana contiene dos T secuenciales, y la estación de reacción 208 introduce A en la muestra, dos A se unen con las dos primeras T. La estación de identificación 214 detecta un pico de fluorescencia que es el doble de la fluorescencia para una base A unida.

En algunos ejemplos, se usan nucleótidos terminadores de cadena. En dichos ejemplos, se añade una base nucleotídica como un par de bases complementarias a la secuencia diana y la reacción se detiene. El nucleótido añadido se identifica y el proceso se puede repetir para añadir una base nucleotídica posterior. En estos ejemplos, se pueden usar cuatro marcadores para los cuatro tipos de bases nucleotídicas, y la muestra puede exponerse a las cuatro bases nucleotídicas (o alguna combinación de las cuatro) al mismo tiempo. Los diferentes marcadores pueden discernirse mediante la estación de identificación 214 para determinar qué base nucleotídica se añadió a qué microtranspondedor 100.

La estación de identificación 214 también detecta la identificación o el número de transpondedor asociado con el marcador de identificación 102 del microtranspondedor 100, que se transmite desde la antena 104. La señal digital que representa la presencia o ausencia del nucleótido se corresponde con el número del microtranspondedor. El número de microtranspondedor se mantiene en una base de datos 216 con la primera base nucleotídica de la secuencia diana, que se determina en función del par complementario de la base nucleotídica marcada que se añadió en la estación de reacción 208. Si no se añadió una base nucleotídica durante la reacción en la estación 208, la estación de identificación 214 lee el número del microtranspondedor, pero no añade una base nucleotídica a la secuencia almacenada en la base de datos.

El sistema de ejemplo 200 también incluye una interfaz de salida 218 que puede ser, por ejemplo, una pantalla, otro tipo de pantalla y/o cualquier dispositivo de comunicación adecuado. La interfaz de salida 218 se puede usar para mostrar las bases nucleotídicas de la secuencia diana a medida que se detectan las bases nucleotídicas. Por lo tanto, un operador del sistema 200 puede ver la detección e identificación de la secuencia diana en tiempo real.

Después de que los microtranspondedores 100 se envían a través de la estación de identificación 214, los microtranspondedores 100 vuelven a la estación de reacción 208 para mezclarse con una segunda base nucleotídica introducida. El mecanismo de transporte 210 se puede usar para transportar los microtranspondedores 100 de vuelta a la estación de reacción 208. Se introduce una base nucleotídica adicional en la muestra. La segunda base nucleotídica de la diana, cuando es complementaria, se une al nucleótido marcado adicional cuando la primera base nucleotídica se une a la base nucleotídica marcada de la primera reacción. Si la primera base nucleotídica de

la diana no se unió a la primera base nucleotídica marcada durante la primera reacción, la segunda base nucleotídica marcada de la segunda reacción se puede unir a la primera base nucleotídica de la diana, si es complementaria. Si dos de las primeras bases nucleotídicas marcadas en la primera reacción se unen a las dos primeras bases nucleotídicas de la diana durante la primera reacción (donde no se usaron nucleótidos terminadores de cadena), la segunda base nucleotídica marcada de la segunda reacción se puede unir a la tercera base nucleotídica de la diana, cuando es complementaria. En otras palabras, durante las segundas reacciones de SBS o SBL en la estación de reacción 208, se introduce un segundo tipo de base nucleotídica marcada y se une a la secuencia diana en la siguiente base nucleotídica en la cadena (si esa base nucleotídica es la primera, la segunda, la tercera, etc.) si es complementaria a la base nucleotídica marcada añadida. Por lo tanto, una cadena de la secuencia diana y los pares de bases complementarias comienzan a formarse.

Las operaciones en la estación de lavado 212 y la estación de identificación 214 se repiten, y se identifica la siguiente secuencia en las cadenas de la diana, se almacena en la base de datos 216 y se presenta al operador a través de la interfaz de salida 218. Los microtranspondedores 100 se reintroducen nuevamente en la estación de reacción 208 para la introducción de otra base nucleotídica marcada adicional. El proceso continúa a través de la serie de estaciones 208, 212, 214 varias veces (por ejemplo, n veces) hasta que se identifica la secuencia diana. El número n de ciclos puede basarse en el número de nucleótidos en la secuencia del ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, el número n de veces que se repiten las operaciones puede corresponder a un final de sustancialmente una secuencia completa.

Si bien una manera de ejemplo de implementar un sistema de ejemplo 200 para identificar una secuencia de ácido nucleico se ha ilustrado en la figura 2, uno o más de los elementos, procesos y/o dispositivos ilustrados en la figura 2 se pueden combinar, dividir, reorganizar, omitir, eliminar y/o implementar de cualquier otra manera. Además, una o más porciones de uno o más de los microtranspondedores de ejemplo 100, el componente de diagnóstico de ejemplo 204, la estación de amplificación de ejemplo 206, la estación de reacción de ejemplo 208, la estación de lavado de ejemplo 212, la estación de identificación de ejemplo 214, la base de datos de ejemplo 216, la interfaz de salida de ejemplo 218 y/o, más generalmente, el sistema de ejemplo 200 de las figuras 1 y 2 pueden implementarse mediante hardware, software, firmware y/o cualquier combinación de hardware, software y/o firmware. Así, por ejemplo, cualquiera de una o más partes de uno o más de los microtranspondedores (100) de ejemplo, el componente de diagnóstico 204 de ejemplo, la estación de amplificación 206 de ejemplo, la estación de reacción 208 de ejemplo, la estación de lavado 212 de ejemplo, la estación de identificación 214 de ejemplo, la base de datos 216 de ejemplo, la interfaz de salida 218 de ejemplo y/o, más en general, el sistema de ejemplo 200 de las figuras 1 y 2 podrían implementarse mediante uno o más circuitos, procesadores programables, circuitos integrados específicos (ASIC), dispositivos lógicos programables y/o dispositivos lógicos programables de campo (FPLD), etc. Además, el sistema de ejemplo 200 de la figura 2 puede incluir uno o más elementos, procesos y/o dispositivos además de, o en lugar de, los ilustrados en la figura 2, y/o puede incluir más de uno o cualquiera de los elementos, procesos y dispositivos ilustrados.

Diagramas de flujo representativos de un procedimiento de ejemplo para implementar los aparatos y sistemas de las figuras 1 y 2 se muestran en las figuras 3 y 4. En este ejemplo, el procedimiento puede implementarse utilizando un programa para ejecutar por un procesador, tal como el procesador 512 que se muestra en el ordenador de ejemplo 500 que se trata de continuación en relación con la figura 5. El programa puede incorporarse en un software almacenado en un medio tangible legible por ordenador, tal como un CD-ROM, un disquete, un disco duro, un disco versátil digital (DVD), un disco Blu-ray o una memoria asociada con el procesador 512, pero todo el programa y/o partes del mismo podrían ser ejecutados alternativamente por un dispositivo que no sea el procesador 512 y/o incorporarse en un firmware o hardware exclusivo. Además, aunque el programa de ejemplo se describe con referencia a los diagramas de flujo ilustrados en las figuras 3 y 4, alternativamente se pueden usar muchos otros procedimientos para implementar el sistema de ejemplo 200. Por ejemplo, el orden de ejecución de los bloques se puede cambiar y/o algunos de los bloques descritos se pueden cambiar, eliminar o combinar.

Como se ha mencionado anteriormente, los procesos o procedimientos de ejemplo de las figuras 3 y 4 pueden implementarse utilizando instrucciones codificadas (por ejemplo, instrucciones legibles por ordenador) almacenadas en un medio tangible legible por ordenador, tal como un disco duro, una memoria flash, una memoria de solo lectura (ROM), un disco compacto (CD), un disco versátil digital (DVD), un caché, una memoria de acceso aleatorio (RAM) y/o cualquier otro medio de almacenamiento en el que la información se almacena para cualquier duración (por ejemplo, durante períodos de tiempo prolongados, de forma permanente, brevemente, para almacenar temporalmente en búfer, y/o para el almacenamiento en caché de la información). Tal como se usa en el presente documento, el término medio tangible legible por ordenador se define expresamente para incluir cualquier tipo de almacenamiento legible por ordenador y para excluir señales de propagación. Adicional o alternativamente, los procedimientos de ejemplo de las figuras 3 y 4 pueden implementarse utilizando instrucciones codificadas (por ejemplo, instrucciones legibles por ordenador) almacenadas en un medio legible por ordenador no transitorio, tal como una unidad de disco duro, una memoria flash, una memoria de solo lectura, un disco compacto, un disco versátil digital, un caché, una memoria de acceso aleatorio y/o cualquier otro medio de almacenamiento en el que la información se almacena durante cualquier tiempo (por ejemplo, durante períodos de tiempo prolongados, e forma permanente, brevemente, para el almacenamiento temporal en el búfer y/o para el almacenamiento en caché de la información). Como se usa en el presente documento, cuando la frase "al menos" se usa como término de transición

en un preámbulo de una reivindicación, está abierta de la misma manera que el término "que comprende" está abierto. Por lo tanto, una reclamación que utilice "al menos" como término de transición en su preámbulo puede incluir elementos además de los expresamente mencionados en la reivindicación.

5 La figura 3 ilustra un procedimiento 300 de secuenciación de un ácido nucleico. El procedimiento de ejemplo 300 incluye la captura de una secuencia de ácido nucleico diana (bloque 302) en, por ejemplo, una superficie de un microtranspondedor (por ejemplo, el microtranspondedor 100 de la Figura 1). El procedimiento de ejemplo 300 también incluye amplificar la secuencia de ácido nucleico diana (bloque 304) a través de, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, en la estación de amplificación 206 de la Figura 2).

10 Además, el procedimiento de ejemplo 300 incluye una reacción de la secuencia diana con una base nucleotídica añadida tal como, por ejemplo, una base nucleotídica marcada (bloques 306, 308). Las reacciones podrían ser una reacción de polimerización (bloque 306) tal como, por ejemplo, SBS o una reacción de ligación (bloque 308) tal como, por ejemplo, SBL. Las reacciones pueden producirse, por ejemplo, en la estación de reacción 208 de la figura 2. Las reacciones permiten que una base nucleotídica marcada se una con una base nucleotídica de la secuencia de ácido nucleico diana para formar el siguiente par de bases de la cadena de ácido nucleico diana, como se ha desvelado anteriormente. Cuando la reacción es una reacción de polimerización, el procedimiento de ejemplo 300 incluye la eliminación de reactivos de polimerización extraños (bloque 310), y cuando la reacción es una reacción de ligación, el procedimiento de ejemplo 300 incluye la eliminación de reactivos de ligación extraños (bloque 312). La eliminación de reactivos extraños puede producirse, por ejemplo, en la estación de lavado 212 de la figura 2.

15 El procedimiento de ejemplo 300 también incluye la identificación de una base nucleotídica en la secuencia diana (bloque 314). La identificación determina, según el marcador detectado de una base nucleotídica añadida y el número de identificación/microtranspondedor, qué base nucleotídica se añadió a qué superficie del microtranspondedor. Debido a la naturaleza restrictiva del apareamiento de bases (cada tipo de base nucleotídica solo se une con una o un tipo de base nucleotídica), saber qué base nucleotídica se añadió al microtranspondedor conduce a la identificación de la base nucleotídica en la secuencia de ácido nucleico diana. Se puede mantener un registro (por ejemplo, en la base de datos de ejemplo 216 de la Figura 2), para representar gráficamente qué bases nucleotídicas se añaden a qué cadena de las secuencias diana y los resultados de qué bases nucleotídicas se añaden pueden presentarse a un operador en tiempo real, es decir, a medida que se construyen las cadenas de pares de bases de bases nucleotídicas añadidas y las secuencias de destino.

20 El procedimiento de ejemplo 300 determina si se añadirán bases nucleotídicas adicionales en la diana (bloque 316). Si hay bases nucleotídicas adicionales para secuenciar, el procedimiento de ejemplo 300 regresa a la reacción en el bloque 306 (para la polimerización) o en el bloque 308 (para la ligación). El procedimiento de ejemplo 300 continúa añadiendo e identificando el siguiente nucleótido en la secuencia. El procedimiento 300 se repite tantas veces como sea necesario hasta que se haya identificado la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia diana. A continuación, si no hay más bases nucleotídicas para secuenciar (bloque 316), el proceso de ejemplo termina (bloque 318). Al final del procedimiento 300, se ha identificado todo o sustancialmente todo un ácido nucleico diana.

25 La figura 4 ilustra otro procedimiento de ejemplo 400 de secuenciación de un ácido nucleico. El procedimiento de ejemplo 400 incluye una pluralidad de reacciones de secuenciación a las que se somete una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en uno o más microtranspondedores (bloque 402). En este ejemplo, los microtranspondedores pueden ser, por ejemplo, los microtranspondedores 100 de las figuras 1 y 2. Además, las reacciones de secuenciación pueden ser, por ejemplo, SBS o SBL, como se ha desvelado anteriormente y pueden producirse, por ejemplo, en la estación de reacción 208 de la figura 2. En el procedimiento de ejemplo 400, las reacciones de secuenciación construyen una secuencia de bases nucleotídicas marcadas que son complementarias y se unen a la secuencia de bases nucleotídicas diana.

30 El procedimiento de ejemplo 400 también incluye identificar cada base nucleotídica marcada de la secuencia de bases nucleotídicas marcadas (es decir, bases nucleotídicas marcadas añadidas) y cada respectiva base nucleotídica diana complementaria de secuencia de bases nucleotídicas diana a las que se une la base nucleotídica marcada después de cada secuenciación reacción (bloque 404). La parte de identificación del procedimiento de ejemplo 400 también lee un número de identificación del microtranspondedor (bloque 404). En este ejemplo, la identificación en el bloque 404 puede producirse en la estación de identificación 214 de la figura 2, y el número de identificación del microtranspondedor puede leerse en el marcador de identificación 102 del microtranspondedor 100 de la figura 1. Asimismo, cada una de las bases nucleotídicas marcadas de la secuencia de bases nucleotídicas marcadas y cada respectiva base nucleotídica diana complementaria de la secuencia de bases nucleotídicas diana a las que la base nucleotídica marcada está unida se puede asociar con el número de identificación del microtranspondedor. La o las identificaciones pueden enviarse a un operador como se ha desvelado anteriormente.

35 El procedimiento de ejemplo 400 de la figura 4 también determina si hay bases nucleotídicas diana adicionales para secuenciar (bloque 406). Si hay bases nucleotídicas diana adicionales para secuenciar, el control vuelve al bloque 402 para que las siguientes reacciones de secuenciación añadan bases nucleotídicas marcadas adicionales. El procedimiento 400 continúa luego a través de la identificación posterior (bloque 404). En algunos ejemplos, cada

base nucleotídica marcada añadida se identifica entre cada reacción de secuenciación posterior. Si no hay bases nucleotídicas diana adicionales para secuenciar (bloque 406), finaliza el procedimiento de ejemplo (bloque 408).

5 La figura 5 es un diagrama de bloques de un ordenador de ejemplo 500 capaz de ejecutar los procedimientos de las figuras 3 y 4 para implementar el sistema 200 de la figura 2. El ordenador 500 puede ser, por ejemplo, un servidor, un ordenador personal o cualquier otro tipo de dispositivo informático.

10 El ordenador 500 del presente ejemplo incluye un procesador 512. Por ejemplo, el procesador 512 puede ser implementado por uno o más microprocesadores o controladores de cualquier familia o fabricante deseado.

15 El procesador 512 incluye una memoria local 513 (por ejemplo, un caché) y está en comunicación con una memoria principal que incluye una memoria volátil 514 y una memoria no volátil 516 a través de un bus 518. La memoria volátil 514 puede implementarse mediante memoria de acceso aleatorio dinámica síncrona (SDRAM), memoria de acceso aleatorio dinámica (DRAM), memoria de acceso aleatorio dinámica RAMBUS (RDRAM) y/o cualquier otro tipo de dispositivo de memoria de acceso aleatorio. La memoria no volátil 516 puede implementarse mediante memoria flash y/o cualquier otro tipo deseado de dispositivo de memoria. El acceso a la memoria principal 514, 516 es controlado por un controlador de memoria.

20 El ordenador 500 también incluye un circuito de interfaz 520. El circuito de interfaz 520 puede implementarse mediante cualquier tipo de interfaz estándar, tal como una interfaz Ethernet, un bus de serie universal (USB) y/o una interfaz de PCI Express.

25 Uno o más dispositivos de entrada 522 están conectados al circuito de interfaz 520. El o los dispositivos de entrada 522 permiten que un usuario introduzca datos y órdenes en el procesador 512. El o los dispositivos de entrada pueden implementarse mediante, por ejemplo, un teclado, un ratón, una pantalla táctil, un panel táctil, un trackball, un isopoint y/o un sistema de reconocimiento de voz.

30 Uno o más dispositivos de salida 524 también están conectados al circuito de interfaz 520. Los dispositivos de salida 524 pueden implementarse, por ejemplo, mediante dispositivos de visualización (por ejemplo, una pantalla de cristal líquido, una pantalla de tubo de rayos catódicos (CRT), una impresora y/o altavoces). El circuito de interfaz 520, por lo tanto, típicamente incluye una tarjeta gráfica.

35 El circuito de interfaz 520 también incluye un dispositivo de comunicación, tal como un módem o una tarjeta de interfaz de red para facilitar el intercambio de datos con ordenadores externos a través de una red 526 (por ejemplo, una conexión Ethernet, una línea de abonado digital (DSL), una línea telefónica, un cable coaxial).

40 El ordenador 500 también incluye uno o más dispositivos de almacenamiento masivo 528 para almacenar software y datos. Los ejemplos de tales dispositivos de almacenamiento masivo 528 incluyen unidades de disquete, discos duros, unidades de disco compacto y unidades de disco versátiles digitales (DVD).

45 Las instrucciones codificadas 532 de la figura 5 pueden almacenarse en el dispositivo de almacenamiento masivo 528, en la memoria volátil 514, en la memoria no volátil 516 y/o en un medio de almacenamiento extraíble, tal como un CD o DVD.

50 De lo que antecede, se apreciará que los procedimientos, aparatos, sistemas y artículos de fabricación desvelados anteriormente pueden usarse para identificar secuencias de ácido nucleico desconocidas como, por ejemplo, las secuencias asociadas con el ADN de patógenos o trastornos genéticos, que pueden usarse en el diagnóstico de enfermedades. Los ejemplos desvelados en el presente documento se pueden usar para determinar simultáneamente la secuencia de ácido nucleico de una pluralidad de dianas a una alta tasa de rendimiento con bajos requisitos de procesamiento y almacenamiento. Además, los ejemplos desvelados en el presente documento proporcionan una identificación en tiempo real de las dianas desconocidas a un operador a medida que se secuencian el o los ácidos nucleicos.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para secuenciar un ácido nucleico, que comprende:

5 someter una secuencia de bases nucleotídicas diana capturadas en un microtranspondedor a una pluralidad de reacciones de secuenciación para añadir una secuencia de bases nucleotídicas que son complementarias y unir las a la secuencia de bases nucleotídicas diana, en la que al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador;
 10 identificar cada base nucleotídica añadida después de cada reacción de secuenciación; y asociar cada base nucleotídica añadida de la secuencia con un número de identificación del microtranspondedor, en el que el procedimiento comprende el uso de un medidor de flujo que identifica tanto el número de identificación del microtranspondedor como el marcador asociado con una base nucleotídica añadida a la secuencia de nucleótidos, y
 15 en el que después de cada reacción de secuenciación, el microtranspondedor se pasa a través del medidor de flujo, donde se identifica el microtranspondedor y se detecta el marcador.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las bases nucleotídicas diana se capturan a través de una sonda de captura.

20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además amplificar clonalmente las bases nucleotídicas diana.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha amplificación clonal comprende una reacción en cadena de la polimerasa en emulsión antes de la reacción de secuenciación.

25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador óptico.

30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el marcador óptico es un marcador fluorescente.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que al menos una de las bases nucleotídicas añadidas comprende un marcador electroquímico.

35 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha identificación comprende mover dicho microtranspondedor con una base añadida desde una estación de reacción de un aparato a una estación de identificación de dicho aparato usando dicho medidor de flujo.

40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha estación de identificación comprende un detector para detectar dicha base añadida, en el que dicho detector detecta uno o más de una señal óptica, una señal eléctrica y una señal química.

45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha base añadida se detecta mediante un cambio en la fluorescencia, luminiscencia, pH, calor, concentración de iones hidrógeno, concentración de pirofosfato y radioactividad.

50 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se usa un marcador única para una pluralidad de bases nucleotídicas añadidas.

12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se usa una pluralidad de marcadores diferentes para cada base nucleotídica añadida para diferenciar diferentes bases nucleotídicas añadidas.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además usar una pluralidad de microtranspondedores para un ensayo multiplex que contiene más de un ácido nucleico diana.

55 14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las reacciones de secuenciación se repiten hasta que se identifica una totalidad de la secuencia de bases nucleotídicas diana.

60

65

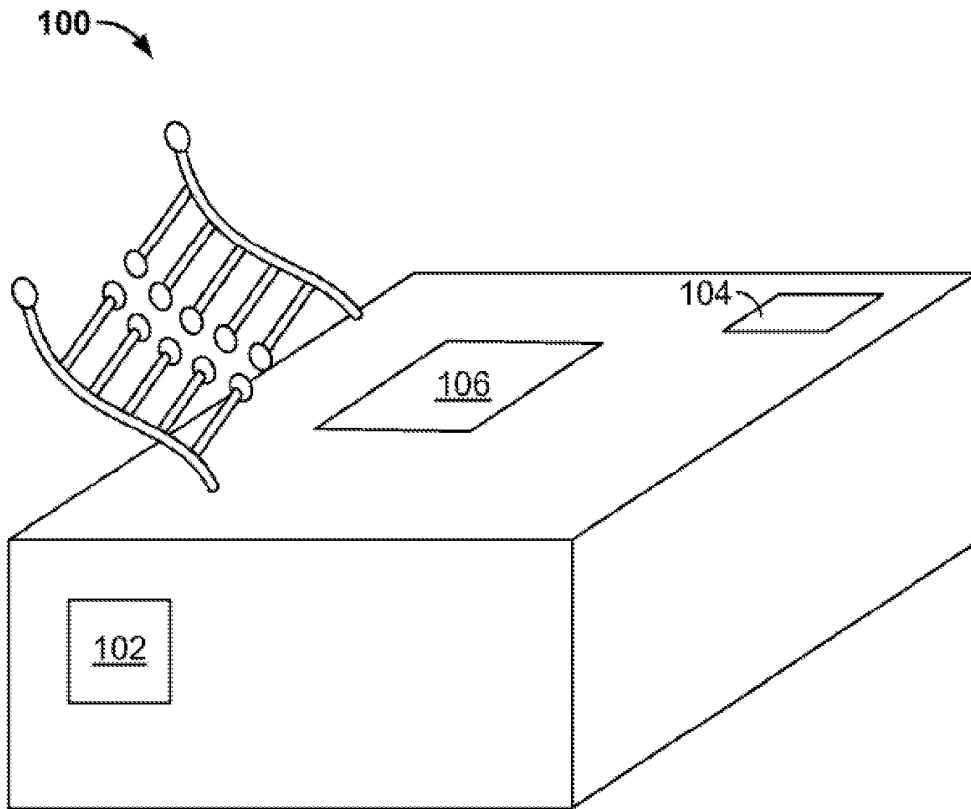


FIG. 1

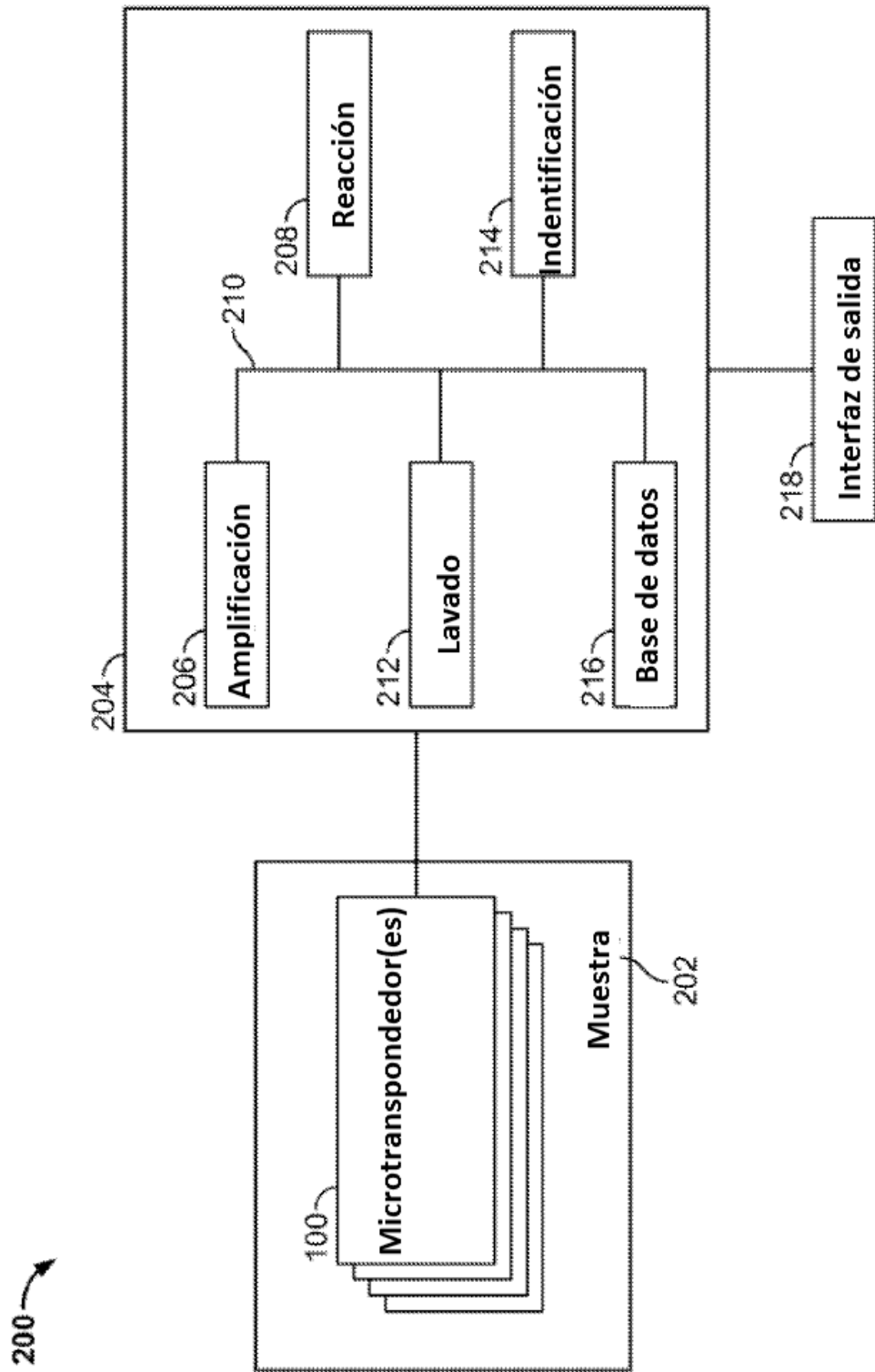


FIG. 2

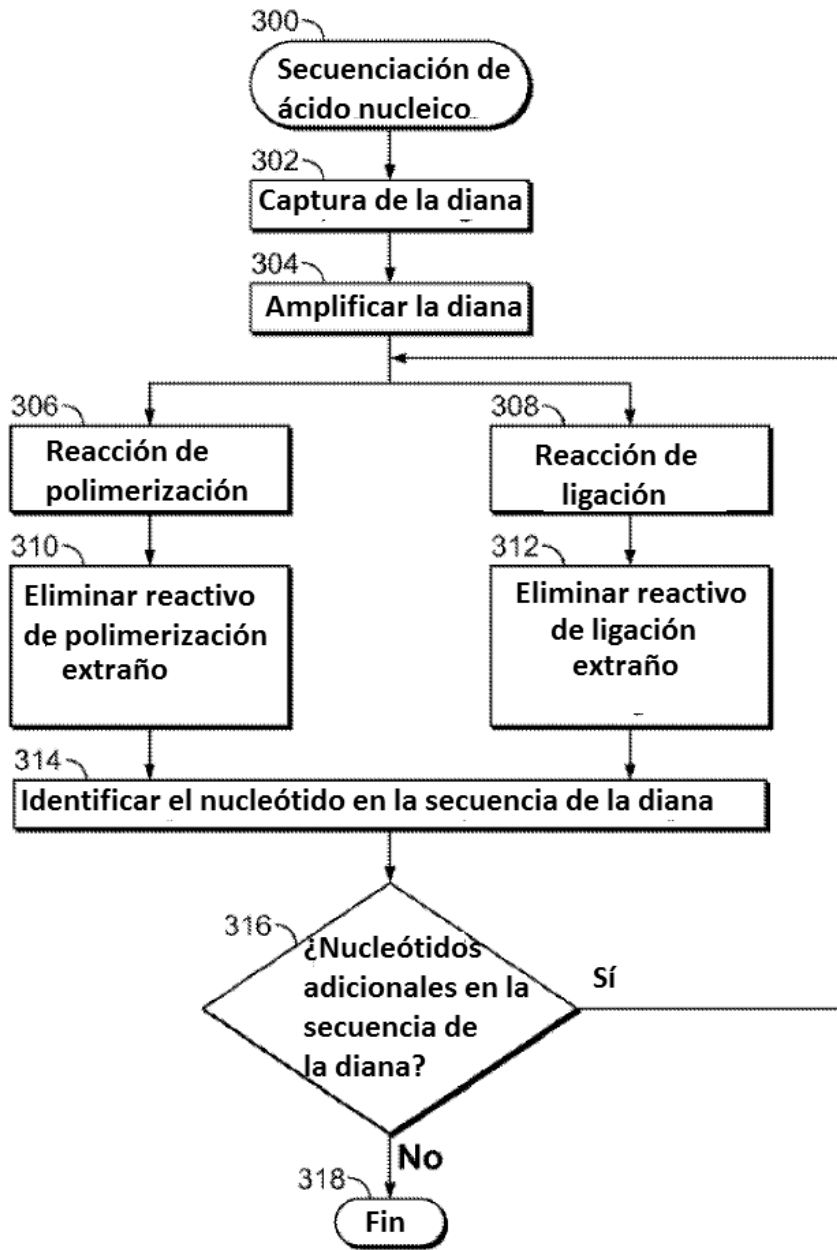


FIG. 3

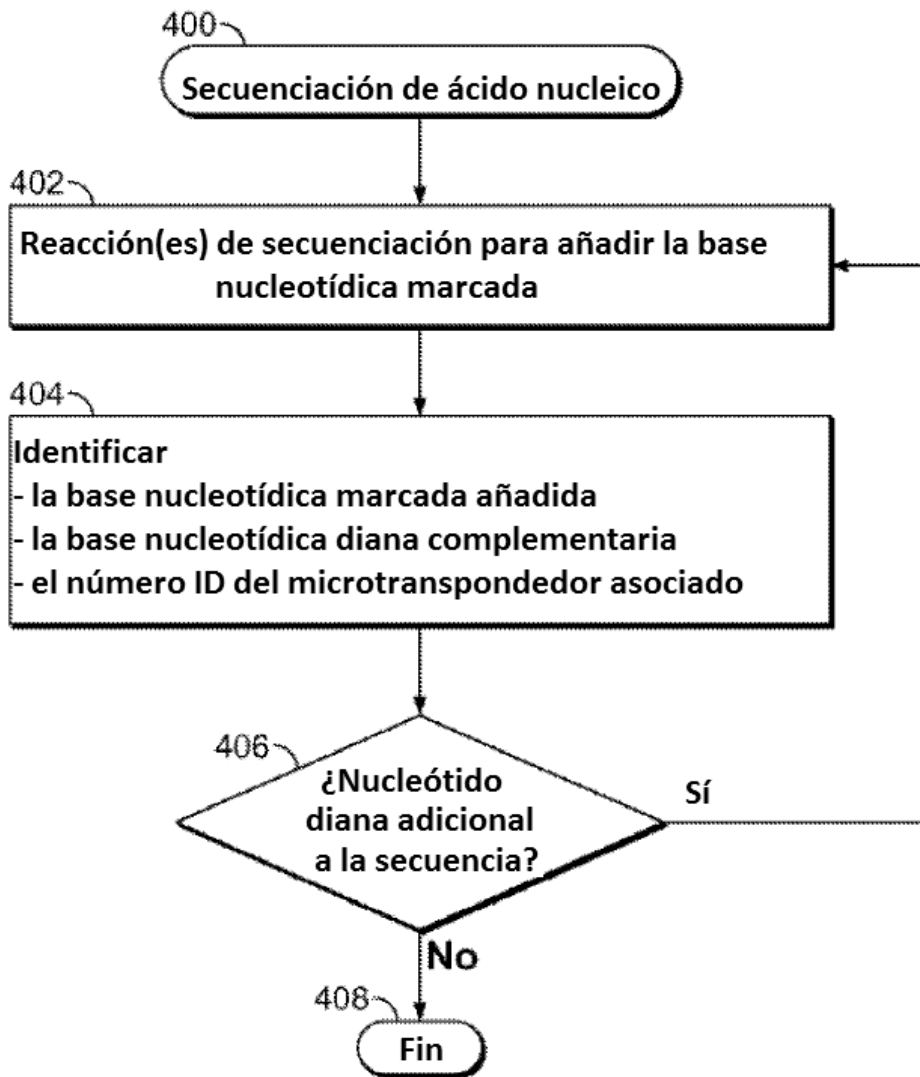


FIG. 4

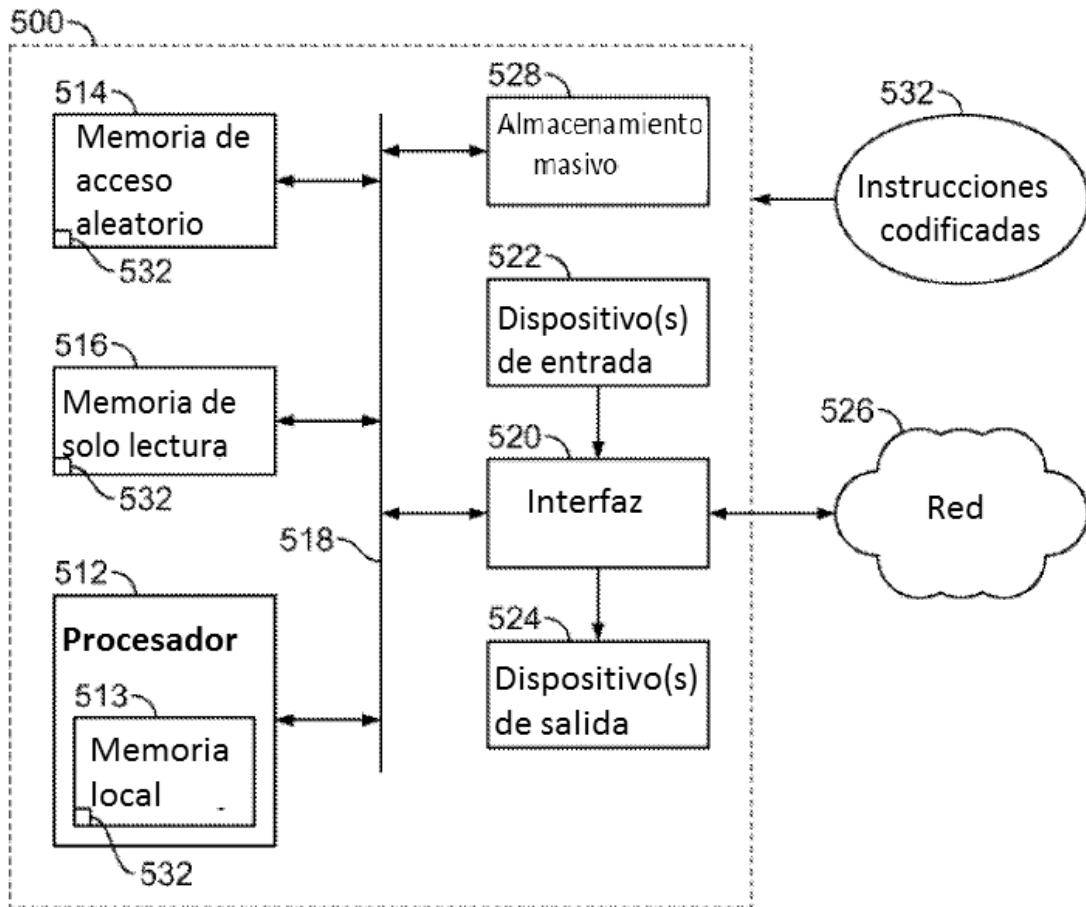


FIG. 5