

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 006**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6837 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/US2014/017786**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14710688 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2961524**

54 Título: **Superficies modeladas en gel**

30 Prioridad:

26.02.2013 US 201361769289 P
06.03.2013 US 201313787396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BARNARD, STEVEN M.;
BOWEN, M. SHANE;
ROBERT BACIGALUPO, MARIA CANDELARIA;
GEORGE, WAYNE N.;
BROWN, ANDREW A. y
TSAY, JAMES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 006 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

Superficies modeladas en gel

Antecedentes

5 La presente descripción se refiere en general a la química analítica en fase sólida, y tiene aplicabilidad específica a matrices de ácido nucleico para análisis genómicos de alto rendimiento.

10 La tarea de catalogar la variación genética humana y correlacionar esta variación con la susceptibilidad a la enfermedad es beneficiarse de los avances en las metodologías de secuenciación amplia del genoma. Este esfuerzo de catalogación promete identificar los marcadores en el genoma de cada persona que ayudarán a los profesionales médicos a determinar la susceptibilidad de esa persona a la enfermedad, la capacidad de respuesta a terapias específicas como los medicamentos recetados, la susceptibilidad a los efectos secundarios de los medicamentos peligrosos y otras características de acción médica. El esfuerzo de catalogación está en marcha. Esto se debe en gran parte a las metodologías de secuenciación del genoma disponibles en el mercado que son lo suficientemente rentables para permitir que los sujetos de prueba sean evaluados en un entorno de investigación. Se necesitan mejoras en las metodologías de secuenciación para acelerar el esfuerzo de catalogación. Además, el costo relativamente alto de la secuenciación ha impedido que la tecnología se mueva más allá de los centros de investigación y pase a la clínica donde los médicos pueden obtener secuencias para los pacientes de la población general.

15 Las metodologías de secuenciación y los sistemas utilizados para llevarlas a cabo, explotan una compleja colección de tecnologías. El documento US2010/0304982 A1 describe el uso de partículas de polímero de ácido nucleico en micropozos. Se ha demostrado que las mejoras en algunas de estas tecnologías proporcionan reducciones sustanciales de costos. Sin embargo, es difícil predecir cuál de las dos es susceptible de mejoras de reducción de costos. Dadas las dependencias entre las tecnologías en los sistemas de secuenciación, es aún más difícil predecir qué se puede modificar sin tener un impacto adverso en el rendimiento general de la metodología o sistema. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar mejoras que puedan llevar la promesa de investigación genómica a la clínica, donde se pueden mejorar vidas y, en muchos casos, salvarlas. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

Breve resumen

20 La presente descripción proporciona una matriz que incluye un soporte sólido que tiene una superficie, teniendo la superficie una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; y una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo en el material de gel, en donde el material de gel en cada uno de los pozos comprende una sola especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca.

25 En algunas realizaciones, el sustrato está configurado como una matriz de pozos y los analitos son ácidos nucleicos. Por consiguiente, esta descripción proporciona una matriz que incluye un soporte sólido que tiene una superficie, teniendo la superficie una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; y una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo en el material de gel, en donde el material de gel en cada uno de los pozos incluye una única especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca.

30 La presente descripción también proporciona un método para fabricar un sustrato. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tenga una superficie plana, en donde la superficie plana está interrumpida por una o más características cóncavas y en la que las una o más características cóncavas están bordeadas por una o más regiones intersticiales en la superficie plana; (b) recubrir al menos una porción del soporte sólido con un material de gel, en donde la porción incluye al menos una de las características cóncavas y al menos una de las regiones intersticiales; y (c) pulir la superficie plana para eliminar el material de gel de al menos una de las regiones intersticiales y mantener el material de gel en al menos una característica cóncava.

35 Un método para elaborar una matriz puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tiene una superficie con una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados unos de otros por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; (b) suministrar una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo a los pozos del soporte sólido para producir una matriz de pozos que tienen una sola especie de ácido nucleico objetivo unida al material de gel en cada pozo, en donde diferentes pozos en la matriz tienen diferentes especies de ácido nucleico objetivo de la biblioteca; y (c) amplificar los ácidos nucleicos objetivo unidos al material de gel en los pozos de la matriz para producir una población clonal de un ácido nucleico objetivo individual en cada uno de los pozos de la matriz.

40 Esta descripción proporciona además un método para detectar analitos. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tenga una superficie plana, en donde la superficie plana está interrumpida por una

o más características cóncavas, en la que las características cóncavas contienen material de gel, en donde las una o más características cóncavas están bordeadas por una o más regiones intersticiales en la superficie plana, estando las regiones intersticiales sustancialmente desprovistas del material de gel, y en donde el material de gel está unido o contiene analitos objetivo; (b) poner en contacto el soporte sólido con sondas en condiciones en las que los analitos objetivo interactúan específicamente con las sondas; y (c) detectar el soporte sólido para distinguir al menos un subconjunto de los analitos objetivo que interactúan con una o más de las sondas.

En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos son los analitos que se detectan y las características cóncavas son los pozos. Por ejemplo, un método para detectar ácidos nucleicos puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tiene una superficie y una biblioteca de ácidos nucleicos, teniendo la superficie una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad, una única especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca que se une al material de gel en cada uno de los pozos; (b) poner en contacto el soporte sólido con al menos una sonda que se une a los ácidos nucleicos objetivo; y (c) detectar el soporte sólido para distinguir los pozos que tienen una especie de ácido nucleico objetivo que se une a al menos una sonda.

Las composiciones, aparatos y métodos de la presente descripción se ejemplifican en la presente memoria con respecto al material de gel. Se entenderá que el material de gel es un ejemplo y puede reemplazarse con otros materiales orgánicos que incluyen, por ejemplo, polímeros que pueden formar un recubrimiento de superficie y no necesariamente pueden considerarse en sí mismos geles. Los métodos descritos aquí para aplicar material de gel a una superficie, eliminar el material de gel de las regiones intersticiales, unir analitos al material de gel, usar las matrices resultantes en métodos analíticos o preparativos, etc., pueden adaptarse fácilmente reemplazando el material de gel con materiales que no son de gel.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un método para elaborar y usar una matriz modelada de características de ADN, en donde cada característica es un pozo que tiene material de gel que está unido a un grupo de ADN y la matriz se usa en una técnica de secuenciación.

La Figura 2 muestra imágenes de un sustrato BeadChip modificado para tener material de gel en los pozos en lugar de perlas. Panel A: imágenes de campo claro obtenidas antes del pulido. Paneles B-C: imágenes fluorescentes obtenidas después del pulido e hibridación con oligonucleótidos marcados con fluorescencia.

La Figura 3 muestra en el Panel A: un flujo de proceso esquemático que utiliza fotolitografía y una máscara dura de Cr junto con un ataque químico de iones reactivos para fabricar características cóncavas en un sustrato; en el Panel B, un ejemplo de imágenes SEM de pozos y porciones de un fiducial en un sustrato de vidrio; y en el Panel C una imagen de una oblea, una imagen de una porción de la oblea que incluye un fiducial y una matriz de pozos, y una imagen de una porción de la matriz que incluye pozos.

La Figura 4 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de alta resolución de sustratos de nanopozo que muestran características de gel modeladas en el sustrato de nanopozo después de que el sustrato se recubre con PAZAM y se pule con una suspensión de perlas de sílice. El PAZAM está marcado con un tinte para fines de visualización.

La Figura 5 muestra una combinación de imágenes de varios colores obtenida a partir de un ciclo de secuenciación HiSeq de un sustrato de nanopozo de paso de 1,5 μm que tiene agrupaciones moldeadas. Panel A: imagen que muestra un campo de agrupaciones modeladas en pozos que contienen gel junto con cuatro fiduciales de ojo de buey. Panel B: una imagen de mayor resolución que muestra la mezcla de colores (debido a una población mixta de amplicones) en un solo fiducial de ojo de buey.

La Figura 6 muestra en el Panel A: combinación de varios colores de agrupaciones modeladas en una secuenciación de HiSeq ejecutada con un sustrato de nanopozo de paso de 750 nm; Panel B: la curva vecina más cercana que muestra que la matriz está ordenada y las agrupaciones pasan filtros de calidad; y el Panel C: métricas de calidad de secuenciación que muestran que a una densidad de 1,6 millones de agrupaciones/ mm^2 pasaron exitosamente los filtros de calidad.

La Figura 7 es un gráfico de la fracción clonal frente a la fracción ocupada con la curva esperada para una distribución de Poisson, una línea recta esperada para la clonalidad y ocupación ideales y una X para la medida promedio obtenida de una secuenciación con un sustrato que tiene un patrón de nanopozos que contienen gel.

Descripción detallada

Esta descripción proporciona sustratos estructurados, métodos para elaborar sustratos estructurados y métodos para usar sustratos estructurados. En realizaciones particulares, los sustratos incluyen un soporte sólido que tiene regiones cóncavas, tales como pozos, que contienen material de gel (por ejemplo, están recubiertos por el material de gel). El material de gel puede a su vez unirse a un analito de interés, tal como un ácido nucleico. En realizaciones particulares,

las regiones que contienen gel son discretas, estando separadas por regiones intersticiales que carecen de la capacidad de unir el analito de interés. Por ejemplo, las regiones intersticiales pueden carecer del material de gel. Alternativamente, el material de gel en las regiones intersticiales puede inactivarse o bien modificarse para que carezca de una actividad o característica del material de gel en las regiones cóncavas, tal como la capacidad de soportar la unión del analito. La segregación resultante de las regiones de gel proporciona ventajas al llevar a cabo reacciones en los analitos y/o detectar los analitos. Se puede demostrar un ejemplo de una ventaja en el caso de una matriz de ácidos nucleicos objetivo distribuidos entre los pozos que contienen gel. Aquí, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación en el sustrato estructurado utilizando los ácidos nucleicos como plantillas para formar colonias de ácido nucleico que crecen en o sobre el gel (por ejemplo, características de ácido nucleico de la matriz). Las regiones intersticiales funcionan para limitar el área de crecimiento de la colonia. Las características individuales de la matriz resultante se pueden distinguir con relativa facilidad debido al patrón discreto creado por los pozos que contienen gel. El patrón también puede proporcionar beneficios al aumentar la densidad de las características y reducir los requisitos de procesamiento para el registro de imágenes en comparación con las matrices aleatorias de ácidos nucleicos.

En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de proceso para hacer una matriz modelada de ácidos nucleicos. Una vista del perfil de un sustrato bien modelado se muestra esquemáticamente. Los pozos tienen un paso (separación entre centros) de 1,5 μm y el diámetro de cada pozo es de 0,5 μm en el ejemplo. El sustrato bien modelado se puede recubrir con un material de gel de manera que el material entra en los pozos y cubra las regiones intersticiales. El sustrato revestido con gel resultante se puede pulir para eliminar el material de gel de las regiones intersticiales, dejando el material de gel en los pozos, formando así un sustrato modelado con gel. El gel puede funcionar para soportar la captura de una plantilla de ADN y la amplificación de la plantilla. Por ejemplo, el gel puede injertarse con cebadores oligonucleotídicos antes del recubrimiento de la superficie, después del recubrimiento de la superficie y antes del pulido, o después del pulido. Los cebadores pueden funcionar para capturar las plantillas de ADN y cebar la amplificación utilizando las plantillas capturadas. El sustrato resultante modelado de ADN se puede analizar, por ejemplo, en una técnica de secuenciación.

Una matriz modelada de ácidos nucleicos en pozos que contienen gel proporciona múltiples ventajas para la secuenciación de ADN. Los ejemplos de ventajas en comparación con las matrices aleatorias (es decir, las matrices que tienen un patrón aleatorio de características) incluyen una mayor densidad de empaquetamiento de características, un mayor control y un ajuste de la densidad de características mediante la siembra de plantillas independientes de la concentración, menores requisitos de procesamiento para el registro de imágenes y una mayor facilidad de extracción de la señal. Una ventaja adicional se puede derivar del confinamiento espacial de las poblaciones de ácido nucleico proporcionadas por cada característica. Una característica de una matriz modelada de la presente descripción puede funcionar para restringir el área o el volumen dentro del cual crecerá una colonia de ácido nucleico (por ejemplo, a través de la amplificación de grupos). Con un área ausente o restricciones de volumen, algunas colonias de ácido nucleico pueden amplificarse a un tamaño mayor que otras debido a las diferencias en el contenido en porcentaje de guanina y citosina en sus secuencias (es decir, contenido de GC) que influyen en las tasas de amplificación relativas. Para los métodos y composiciones expuestas en la presente memoria, el volumen o área de características individuales se puede seleccionar para prevenir o minimizar las diferencias en los tamaños de colonias de ácido nucleico que de otra manera se producirían a partir de una reacción de amplificación debido a las diferencias en el contenido de GC entre las especies de la plantilla que se están amplificando. Por ejemplo, el volumen o área de las características puede ser lo suficientemente pequeño como para limitar el crecimiento de las colonias que crecen más rápidamente, al tiempo que permite que las colonias de crecimiento más lento llenen efectivamente la característica al completar la reacción de amplificación.

En realizaciones particulares, esta descripción proporciona la fabricación de pozos (por ejemplo, micropozos o nanopozos) sobre vidrio, silicio, plástico u otros soportes sólidos adecuados con un gel modelado unido covalentemente tal como, como poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM, véase, por ejemplo, el documento US2014079923).

El proceso crea almohadillas de gel utilizadas para la secuenciación que pueden ser estables durante los procedimientos de secuenciación con una gran cantidad de ciclos. El enlace covalente del polímero con los pozos es útil para mantener el gel en las características estructuradas durante toda la vida útil del sustrato estructurado durante una variedad de usos. Sin embargo, en muchas realizaciones, el gel no necesita estar unido covalentemente a los pozos. Por ejemplo, en algunas condiciones se puede usar acrilamida libre de silano (SFA), (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1) que no está unida covalentemente a ninguna parte del sustrato estructurado, puede usarse como material de gel.

En realizaciones particulares, se puede hacer un sustrato estructurado modelando un material de soporte sólido con pozos (por ejemplo, micropozos o nanopozos), recubriendo el soporte modelado con un material de gel (por ejemplo, PAZAM, SFA o variantes modificadas químicamente de los mismos, tales como la versión azidolizada de SFA (azido-SFA)) y puliendo el soporte recubierto con gel, por ejemplo, mediante pulido químico o mecánico, reteniendo por lo tanto el gel en los pozos pero eliminando o inactivando sustancialmente todo el gel de las regiones intersticiales en la superficie del sustrato estructurado entre los pozos. Los ácidos nucleicos cebadores se pueden unir al material del gel. Una solución de ácidos nucleicos objetivo (por ejemplo, un genoma humano fragmentado) puede ponerse en contacto con el sustrato pulido de manera que los ácidos nucleicos objetivo sembrarán pozos individuales a través de interacciones con cebadores unidos al material de gel; sin embargo, los ácidos nucleicos objetivo no

ocuparán las regiones intersticiales debido a la ausencia o inactividad del material del gel. La amplificación de los ácidos nucleicos objetivo se limitará a los pozos, ya que la ausencia o inactividad del gel en las regiones intersticiales impide la migración hacia el exterior de la colonia de ácido nucleico en crecimiento. El proceso se puede fabricar convenientemente, es escalable y utiliza métodos convencionales de micro o nano-fabricación.

- 5 En realizaciones particulares, los marcadores fiduciales se incluyen en un sustrato estructurado para facilitar la identificación y localización de características individuales (por ejemplo, pozos u otras características cóncavas que contienen gel). Los marcadores fiduciales son particularmente útiles para sustratos estructurados que tienen un patrón de características espacialmente ordenadas, ya que los marcadores fiduciales proporcionan un punto de referencia para ubicaciones relativas de otras características. Los marcadores fiduciales también se pueden usar para registrar imágenes de matrices aleatorias, pero en su lugar se puede usar el desorden inherente de las agrupaciones, por ejemplo, tal como se usa con matrices aleatorias generadas en plataformas de secuencias comerciales como HiSeq, Genome Analyzer o MiSeq de Illumina, Inc. (San Diego, CA). Los marcadores fiduciales son especialmente beneficiosos para aplicaciones en las que el sustrato estructurado se detecta repetidamente para seguir los cambios que ocurren en las características individuales a lo largo del tiempo. Los marcadores fiduciales permiten que se sigan grupos de ácidos nucleicos individuales a través de imágenes secuenciales obtenidas a lo largo de múltiples ciclos de secuenciación, de modo que la secuencia de grupos individuales se pueda determinar de manera discreta.

Esta descripción proporciona un marcador fiducial que tiene un patrón de región o regiones cóncavas y regiones intersticiales. Un ejemplo de diseño para un marcador fiducial es un conjunto de círculos concéntricos que tienen un patrón alternante de dos o más de los siguientes: un anillo cóncavo, anillo intersticial y un anillo de pozos u otras características cóncavas (por ejemplo, un "ojo de buey"). En algunas realizaciones, la región o regiones cóncavas de un marcador fiducial contienen material de gel, mientras que las regiones intersticiales no. Esta ubicación diferencial del gel en la superficie se puede lograr utilizando los métodos de recubrimiento y pulido del gel que se exponen en la presente memoria. Normalmente, se utiliza un método de detección que puede distinguir las regiones que contienen gel de las regiones intersticiales. En algunos casos, la distinción puede basarse en la presencia de un analito particular en las regiones del gel que están ausentes de las regiones intersticiales. Por ejemplo, en el caso de las matrices de ácidos nucleicos, la región que contiene el gel de un marcador fiducial puede contener ácidos nucleicos que se marcan a través de los mismos métodos que se usan para marcar los ácidos nucleicos objetivo en la matriz. Por lo tanto, los marcadores fiduciales pueden fabricarse convenientemente utilizando los mismos métodos utilizados para fabricar características de analito. Por consiguiente, si se desea, los marcadores fiduciales y las características del analito pueden fabricarse simultáneamente en una o más etapas. Otro marcador fiducial útil que se puede usar en los sustratos estructurados y los métodos expuestos en esta memoria es uno que tiene subregiones donde el patrón de los pozos (u otras características cóncavas) en una subregión se rota con respecto al patrón en otra subregión. Dichas rejillas fiduciales pueden configurarse y usarse para el registro de imágenes como se expone en el documento US2013091176.

35 Como un ejemplo adicional, las perlas se pueden usar como un fiducial. Las perlas pueden incluir una etiqueta tal como un fluoróforo. En este caso, una superficie puede tener al menos dos tipos de pozos (u otras características cóncavas). Los pozos relativamente grandes pueden acomodar una o más perlas fiduciales, mientras que los pozos más pequeños, al ser demasiado pequeños para contener una perla, solo tendrán material de gel. Por lo tanto, los pozos más pequeños funcionan como características analíticas para el análisis y los pozos más grandes llenos de perlas funcionan como fiduciales. Como una alternativa a los pozos, las características fiduciales pueden ser canales, como los que se encuentran en la configuración de ojo de buey ejemplificada anteriormente, y los canales pueden tener dimensiones que acomodan las perlas. Como tal, se pueden colocar varias perlas en el canal para crear un fiducial, por ejemplo, en la forma aparente de una cadena de perlas.

45 Las matrices modeladas, los métodos para su fabricación y los métodos para su uso se ejemplifican en la presente memoria con respecto a un material de gel que se usa para unir analitos de interés. Se entenderá que el material de gel es un ejemplo y se puede reemplazar por otros materiales orgánicos que se pueden usar para mediar la localización de analitos a características en una superficie. Dichos materiales orgánicos incluyen, por ejemplo, polímeros que pueden formar un recubrimiento de superficie y no necesariamente pueden ser considerados por sí mismos como geles. Un ejemplo específico es un polímero formado por ATRP (polimerización por radicales de transferencia de átomos) o procesos de polimerización iniciados en la superficie. Los métodos expuestos en la presente memoria para aplicar material de gel a una superficie, eliminar el material de gel de las regiones intersticiales, utilizando las matrices resultantes en métodos analíticos o preparativos, etc., pueden adaptarse fácilmente para su uso con materiales que no sean de gel.

55 Se entenderá que los términos utilizados en la presente memoria adquieren su significado ordinario en la técnica relevante, a menos que se especifique lo contrario. Varios términos utilizados en esta memoria y sus significados se exponen a continuación.

60 Como se usa en la presente memoria, el término "unido" se refiere al estado de dos cosas que se unen, sujetan, adhieren, conectan o enlazan entre sí. Por ejemplo, un analito, tal como un ácido nucleico, se puede unir a un material, tal como un gel o un soporte sólido, mediante un enlace covalente o no covalente. Un enlace covalente se caracteriza por compartir pares de electrones entre los átomos. Un enlace no covalente es un enlace químico que no implica compartir pares de electrones y puede incluir, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der

Waals, interacciones hidrofílicas e interacciones hidrofóbicas.

Como se usa en la presente memoria, el término "población clonal" se refiere a una población de ácidos nucleicos que es homogénea con respecto a una secuencia de nucleótidos particulares. La secuencia homogénea tiene típicamente una longitud de al menos 10 nucleótidos, pero puede ser incluso más larga e incluye, por ejemplo, una longitud de al menos 50, 100, 250, 500, 1000 o 2500 nucleótidos. Una población clonal se puede derivar de un único ácido nucleico objetivo o ácido nucleico plantilla. Una población clonal puede incluir al menos 2, 5, 10, 100, 1000 o más copias de una secuencia de nucleótidos objetivo. Las copias pueden estar presentes en una única molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como un concatámero o las copias pueden estar presentes en moléculas de ácido nucleico separadas (es decir, una población clonal puede incluir al menos 2, 5, 10, 100, 1000 o más moléculas de ácido nucleico que tienen la misma secuencia de nucleótidos objetivo). Típicamente, todos los ácidos nucleicos en una población clonal tendrán la misma secuencia de nucleótidos. Se entenderá que puede ocurrir un número despreciable de ácidos nucleicos contaminantes o mutaciones (por ejemplo, debido a artefactos de amplificación) en una población clonal sin alejarse de la clonalidad. Por lo tanto, una población puede ser al menos 80%, 90%, 95% o 99% clonal. En algunos casos pueden estar presentes poblaciones clonales 100% puras.

Como se usa en esta memoria, el término "cubierta", cuando se usa como un verbo, significa proporcionar una capa o una cubierta sobre una superficie. Al menos una parte de la superficie puede estar provista de una capa o cubierta. En algunos casos, toda la superficie puede estar provista de una capa o cubierta. En casos alternativos, solo una parte de la superficie estará provista de una capa o cubierta. El término "cubierta", cuando se usa para describir la relación entre una superficie y un material, se entiende que significa que el material está presente como una capa o cubierta en la superficie. El material puede sellar la superficie, por ejemplo, evitando el contacto de líquido o gas con la superficie. Sin embargo, el material no necesita formar un sello. Por ejemplo, el material puede ser poroso a un líquido, gas o uno o más componentes transportados en un líquido o gas. Los ejemplos de materiales que pueden recubrir una superficie incluyen, pero no se limitan a, un gel, polímero, polímero orgánico, líquido, metal, una segunda superficie, plástico, sílice o gas.

Como se usa en la presente memoria, el término "característica cóncava", cuando se usa en referencia a un soporte sólido, se refiere a un rebaje o indentación en el soporte sólido. Los ejemplos de características cóncavas incluyen, pero no se limitan a, un pozo, hoyo, agujero, depresión, canal o zanja. Una característica cóncava puede tener opcionalmente una sección transversal curva (en la dimensión ortogonal a la superficie del soporte sólido); sin embargo, también es posible una sección transversal con una o más secciones lineales, ángulos o esquinas. Secciones transversales con combinaciones de secciones curvas y lineales también son posibles. En general, una característica cóncava no necesita pasar completamente a través del soporte sólido, por ejemplo, en lugar de tener una superficie inferior o un punto en el sustrato.

Como se usa en la presente memoria, el término "diferente", cuando se usa en referencia a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos tienen secuencias de nucleótidos que no son iguales entre sí. Dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de toda su longitud. Alternativamente, dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de una porción sustancial de su longitud. Por ejemplo, dos o más ácidos nucleicos pueden tener porciones de secuencia de nucleótidos objetivo que son diferentes para las dos o más moléculas, mientras que también tienen una porción de secuencia universal que es la misma en las dos o más moléculas.

Como se usa en esta memoria, el término "cada uno", cuando se usa en referencia a una colección de artículos, tiene la intención de identificar un artículo individual en la colección, pero no necesariamente se refiere a cada artículo en la colección. Se pueden producir excepciones si la descripción explícita o el contexto claramente dictan lo contrario.

Como se usa en la presente memoria, el término "acceso fluido", cuando se usa en referencia a una molécula en un fluido y un sitio en contacto con el fluido, se refiere a la capacidad de la molécula para moverse dentro o a través del fluido para contactar o entrar en el sitio. El término también puede referirse a la capacidad de la molécula para separarse o salir del sitio para ingresar a la solución. El acceso fluido puede ocurrir cuando no hay barreras que impidan que la molécula entre en el sitio, se ponga en contacto con el sitio, se separe del sitio y/o salga del sitio. Sin embargo, se entiende que el acceso fluido existe incluso si la difusión se retrasa, se reduce o se altera siempre y cuando el acceso no se impida absolutamente.

Como se usa en esta memoria, el término "material de gel" pretende significar un material semirrígido que es permeable a líquidos y gases. Típicamente, el material del gel puede hincharse cuando el líquido es absorbido y puede contraerse cuando el líquido es removido por secado. Los ejemplos de geles incluyen, pero no se limitan a aquellos que tienen una estructura coloidal, tal como agarosa; estructura de malla de polímero, tal como gelatina; o estructura polimérica entrelazada, como poliacrilamida, SFA (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1) o PAZAM (véase, por ejemplo, US2014079923).

El material de gel particularmente útil se ajustará a la forma de un pozo u otra característica cóncava donde reside. Algunos materiales de gel útiles pueden (a) adaptarse a la forma del pozo u otra característica cóncava donde reside y (b) tener un volumen que no exceda sustancialmente el volumen de la característica del pozo o cóncava donde reside.

Como se usa en la presente memoria, el término "región intersticial" se refiere a un área en un sustrato o en una superficie que separa otras áreas del sustrato o superficie. Por ejemplo, una región intersticial puede separar una característica cóncava de una matriz de otra característica cóncava de la matriz. Las dos regiones que están separadas entre sí pueden ser discretas, sin contacto entre ellas. En otro ejemplo, una región intersticial puede separar una primera parte de una característica de una segunda porción de una característica. En muchas realizaciones, la región intersticial es continua, mientras que las características son discretas, por ejemplo, como es el caso de una matriz de pozos en una superficie por lo demás continua. La separación proporcionada por una región intersticial puede ser una separación parcial o total. Las regiones intersticiales tendrán típicamente un material de superficie que difiere del material de superficie de las características en la superficie. Por ejemplo, las características de una matriz pueden tener una cantidad o concentración de material de gel o analitos que exceda la cantidad o concentración presente en las regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el material de gel o los analitos pueden no estar presentes en las regiones intersticiales.

Como se usa en la presente memoria, el término "biblioteca", cuando se usa en referencia a los analitos, se refiere a una colección de analitos que tienen diferentes composiciones químicas. Típicamente, los analitos en una biblioteca serán especies diferentes que tengan un rasgo o característica común de un género o clase, pero que por lo demás difieren de alguna manera. Por ejemplo, una biblioteca puede incluir especies de ácidos nucleicos que difieren en la secuencia de nucleótidos, pero que son similares con respecto a tener una cadena principal de azúcar-fosfato.

Como se usa en la presente memoria, los términos "ácido nucleico" y "nucleótido" pretenden ser coherentes con su uso en la técnica e incluir especies naturales o análogos funcionales de los mismos. Los análogos funcionales particularmente útiles de los ácidos nucleicos son capaces de hibridar con un ácido nucleico en una secuencia específica o pueden ser utilizados como una plantilla para la replicación de una secuencia de nucleótidos particular. Los ácidos nucleicos naturales tienen generalmente una cadena principal que contiene enlaces fosfodiéster. Una estructura análoga puede tener un enlace de cadena principal alternativo que incluye cualquiera de una variedad de los conocidos en la técnica. Los ácidos nucleicos naturales tienen generalmente un azúcar desoxirribosa (por ejemplo, se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (ADN)) o un azúcar ribosa (por ejemplo, que se encuentra en el ácido ribonucleico (ARN)). Un ácido nucleico puede contener nucleótidos que tienen cualquiera de una variedad de análogos de estas fracciones de azúcar que se conocen en la técnica. Un ácido nucleico puede incluir nucleótidos nativos o no nativos. A este respecto, un ácido desoxirribonucleico nativo puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en adenina, timina, citosina o guanina y un ácido ribonucleico puede tener una o más bases seleccionadas del grupo que consiste en uracilo, adenina, citosina o guanina. Las bases no nativas útiles que pueden incluirse en un ácido nucleico o nucleótido son conocidas en la técnica. Los términos "sonda" u "objetivo", cuando se usan en referencia a un ácido nucleico, se consideran identificadores semánticos para el ácido nucleico en el contexto de un método o composición expuesto en esta memoria y no limitan necesariamente la estructura o función del ácido nucleico más allá de lo que de otra manera se indica explícitamente. Los términos "sonda" y "objetivo" pueden aplicarse de manera similar a otros analitos como proteínas, moléculas pequeñas, células o similares.

Como se usa en esta memoria, el término "patrón aleatorio", cuando se usa en referencia a los pozos en una superficie, significa que las ubicaciones relativas de un subconjunto de pozos en una región de la superficie no son conocidas o predecibles a partir de las ubicaciones de un subconjunto de pozos en otra región de la superficie. El subconjunto utilizado para la medida generalmente incluirá al menos 3 pozos, pero puede incluir al menos 4, 5, 6, 10 o más pozos. Un patrón aleatorio generalmente no incluye repeticiones múltiples de ningún subpatrón. El término se puede aplicar a otras características cóncavas además de los pozos.

Como se usa en esta memoria, el término "patrón de repetición", cuando se usa en referencia a los pozos en una superficie, significa que las ubicaciones relativas de un subconjunto de pozos en una región de la superficie son las mismas que las ubicaciones relativas de un subconjunto de pozos en al menos otra región de la superficie. Por lo tanto, las ubicaciones relativas para los pozos en una región de un patrón de repetición son generalmente predecibles a partir de las ubicaciones relativas de los pozos en otra región del patrón de repetición. El subconjunto utilizado para la medida generalmente incluirá al menos 3 pozos, pero puede incluir al menos 4, 5, 6, 10 o más pozos. Los ejemplos de patrones de repetición incluyen patrones rectilíneos y patrones hexagonales. Un patrón de repetición puede incluir múltiples repeticiones de un subpatrón. El término se puede aplicar a otras características cóncavas además de los pozos.

Como se usa en esta memoria, el término "segregar", cuando se usa en referencia al material de gel en dos pozos (o en otras dos características), significa separar o aislar el material de gel en uno de los pozos (o en una de las características) del material de gel en el otro pozo (o en la otra característica). Por lo tanto, el material de gel en el primer pozo (o en la primera característica) no está en contacto directo con el material de gel en el otro pozo (o en la otra característica). En algunas realizaciones, el material de gel en los dos pozos (o en las dos características) está en contacto indirecto, por ejemplo, a través de una solución que hace contacto con los dos pozos (o características). Alternativamente, el material de gel en los dos pozos (o en las dos características) ni siquiera está en contacto indirecto. Una región intersticial en una superficie puede segregar el material de gel en dos pozos (o en dos características) al estar desprovisto de material de gel. En realizaciones particulares, un material de gel puede ser discontinuo en una superficie, estando presente en características cóncavas, tales como pozos, pero no presente en regiones intersticiales entre las características.

Como se usa en esta memoria, el término "superficie" pretende significar una parte externa o capa externa de un soporte sólido o material de gel. La superficie puede estar en contacto con otro material como un gas, líquido, gel, polímero, polímero orgánico, segunda superficie de un material, metal o recubrimiento similar o diferente. La superficie, o sus regiones, pueden ser sustancialmente planas. La superficie puede tener características de superficie tales como pozos, hoyos, canales, crestas, regiones elevadas, clavijas, postes o similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "especie única" significa sustancialmente una y solo una especie de un género particular. El término no tiene necesariamente la intención de limitar el número de representantes de una sola especie que están presentes. Por ejemplo, una población de moléculas de ácido nucleico que tienen cada una la misma secuencia de nucleótidos comprende una única especie de ácido nucleico. El término "solo" en este contexto no pretende excluir la presencia de otras cosas que no están dentro de los géneros relevantes. Por ejemplo, un pozo que contiene una sola especie de ácido nucleico objetivo de una biblioteca puede incluir múltiples ácidos nucleicos que tienen la misma secuencia, excluirá otro nucleico objetivo de la biblioteca, pero no necesariamente excluirá ningún otro componente de ácido nucleico. Se entenderá que una población aparente de una sola especie puede tener una pequeña cantidad de otra especie presente a un nivel que los expertos en la técnica consideren un nivel insignificante de contaminación o artefacto para el uso particular de la población. Por ejemplo, se considerará que una agrupación de ácido nucleico, derivada de una sola plantilla que tiene una primera secuencia, tiene una especie única aparente si la cantidad de cualquier molécula de ácido nucleico que tiene una segunda secuencia es lo suficientemente baja para ser indetectable o ignorada cuando la primera secuencia es detectada. Alternativamente, una población de una sola especie absoluta tendrá una y solo una especie.

Como se usa en la presente memoria, el término "soporte sólido" se refiere a un sustrato rígido que es insoluble en un líquido acuoso. El sustrato puede ser no poroso o poroso. El sustrato puede ser opcionalmente capaz de absorber un líquido (por ejemplo, debido a la porosidad), pero típicamente será lo suficientemente rígido para que el sustrato no se hinche sustancialmente cuando absorba el líquido y no se contraiga sustancialmente cuando el líquido se elimina por secado. Un soporte sólido no poroso es generalmente impermeable a líquidos o gases. Los soportes sólidos pueden ser opcionalmente inertes a una química que se utiliza para modificar un gel. Por ejemplo, un soporte sólido puede ser inerte para la química utilizada para unir analitos, tales como ácidos nucleicos, a geles en un método expuesto en la presente memoria. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio y vidrio modificado o con otras funciones, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon^{MR}, olefinas cíclicas, poliimidas, etc.), nailon, cerámicas, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice, incluyendo silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, haces de fibra óptica y polímeros. Los soportes sólidos particularmente útiles para algunas realizaciones se encuentran dentro de un aparato de celda de flujo. Los ejemplos de celdas de flujo se exponen con más detalle a continuación.

Como se usa en la presente memoria, el término "pozo" se refiere a una característica cóncava discreta en un soporte sólido que tiene una abertura en la superficie que está completamente rodeada por una o varias regiones intersticiales de la superficie. Los pozos pueden tener cualquiera de una variedad de formas en su apertura en una superficie que incluye, entre otras, redondas, elípticas, cuadradas, poligonales, en forma de estrella (con cualquier número de vértices), etc. La sección transversal de un pozo tomada ortogonalmente con la superficie puede ser curva, cuadrada, poligonal, hiperbólica, cónica, angular, etc.

Las realizaciones expuestas a continuación y enumeradas en las reivindicaciones pueden entenderse a partir de las definiciones anteriores.

La presente descripción proporciona un sustrato que incluye un soporte sólido que tiene una superficie, teniendo la superficie al menos una característica cóncava, al menos una característica cóncava que contiene un material de gel, al menos una característica cóncava que está rodeada por al menos una región intersticial en la superficie; y una biblioteca de analitos en el material de gel, en donde el material de gel en cada uno de los pozos incluye una sola especie de los analitos de la biblioteca.

En algunas realizaciones, el sustrato está configurado como una matriz de pozos y los analitos son ácidos nucleicos. Por consiguiente, esta descripción proporciona una matriz que incluye un soporte sólido que tiene una superficie, teniendo la superficie una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; y una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo en el material de gel, en donde el material de gel en cada uno de los pozos incluye una única especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca.

Un soporte sólido usado en un sustrato estructurado expuesto en esta memoria puede ser elaborado a partir de cualquiera de una variedad de materiales expuestos en esta memoria, por ejemplo, anteriormente en las definiciones, a continuación en los ejemplos o inmediatamente después. Un material particularmente útil es el vidrio. Otros materiales de sustrato adecuados pueden incluir materiales poliméricos, plásticos, silicio, cuarzo (sílice fundida), vidrio borosilicato de calidad óptica, sílice, materiales a base de sílice, carbono, metales, una fibra óptica o haces de fibra óptica, zafiro o materiales plásticos tales como COC y epóxicos. El material particular puede seleccionarse en función de las propiedades deseadas para un uso particular. Por ejemplo, los materiales que son transparentes a la longitud de onda deseada de la radiación son útiles para las técnicas analíticas que utilizarán la radiación de la longitud de

onda deseada, tal como una o más de las técnicas expuestas en la presente memoria. Por el contrario, puede ser conveniente seleccionar un material que no pase la radiación de una cierta longitud de onda (por ejemplo, que sea opaco, absorbente o reflectivo). Esto puede ser útil para la formación de una máscara que se usará durante la fabricación del sustrato estructurado, tal como un método expuesto en esta memoria; o para ser utilizado para una reacción química o detección analítica llevada a cabo utilizando el sustrato estructurado, tal como los que se exponen en la presente memoria. Otras propiedades de un material que pueden explotarse son la inercia o la reactividad a ciertos reactivos utilizados en un proceso posterior, como los que se exponen en la presente memoria; o facilidad de manipulación o bajo costo durante un proceso de fabricación, tal como las que se detallan en la presente memoria. Otros ejemplos de materiales que se pueden usar en los sustratos estructurados o métodos de la presente descripción se describen en los documentos US2013116153 y en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2012/0316086 A1.

En una realización particular, se puede hacer y usar un sustrato basado en Sol-Gel. El modelamiento basado en Sol-Gel se puede lograr mediante el recubrimiento de un sustrato rígido o flexible, tal como vidrio, silicio, plástico, metal o similar, con un recubrimiento de Sol-Gel que se puede realizar, por ejemplo, a través de recubrimiento por centrifugación, inmersión o recubrimiento por pulverización. El Sol-Gel se puede proporcionar en estado líquido cuando se aplica al sustrato y puede contener fotoiniciadores o iniciadores térmicos que permiten el curado (volviendo el líquido un gel) a través de la exposición del Sol-Gel a la luz o al calor. Luego de recubrir el sustrato con el Sol-Gel y antes de curar el material, el Sol-Gel se puede imprimir con una plantilla (sello tridimensional) que tiene una o varias características sobresalientes. La plantilla puede estar hecha, por ejemplo, de silicio, vidrio (tal como cuarzo), metal (tal como níquel), plástico o polímero (tal como PDMS). La impresión del sello en el Sol-Gel puede realizarse colocando la plantilla en contacto con el Sol-Gel. Cuando la plantilla está en contacto con el Sol-Gel, el Sol-Gel se redistribuye para rodear de manera conformal la estructura de la plantilla. Cuando la plantilla está en contacto con el Sol-Gel, la redistribución del Sol-Gel se puede conducir a través de una fuerza externa aplicada a la plantilla o al sustrato, o mediante fuerzas capilares intrínsecas a la naturaleza de la plantilla modelada. Cuando la plantilla está en contacto con el Sol-Gel, la pila de sustrato + Sol-Gel + plantilla puede exponerse a la luz o al calor para curar el Sol-Gel y para bloquear el patrón original de la plantilla en el Sol-Gel. Este proceso de diseño de patrones se conoce tradicionalmente como litografía por nanoimpresión. Después del curado del Sol-Gel, la plantilla se puede separar del sustrato + la pila de Sol-Gel, y la plantilla se puede descartar o reutilizar para modelar otro sustrato recubierto con Sol-Gel sin curar. El sustrato con el Sol-Gel curado y modelado puede luego ser llevado a un proceso de deposición química, o si se desea una superficie tal como vidrio puro, el sustrato + pila de Sol-Gel modelado se puede tomar a través de un proceso térmico (sinterización) que removerá el material orgánico que originalmente estaba presente en el Sol-Gel. Esto no es obligatorio pero puede hacer que el sustrato sea un material de SiO₂ puro que tenga ventajas en ciertos esquemas de unión química.

Otro enfoque para producir un sustrato modelado es usar un material plástico como COC o COP (tal como Zeonor o Topas) y realizar un proceso de estampado térmico para crear la matriz de indentaciones. El proceso es similar a la litografía de nanoimpresión. Se puede montar un sustrato plástico en una boquilla que tiene la capacidad de controlar la temperatura. El sustrato plástico se puede calentar a una temperatura tal que la capa exterior del plástico supere la temperatura de transición vítrea. Mientras el sustrato está a temperatura elevada, la plantilla se pone en contacto duro con una plantilla (por ejemplo, de cuarzo, silicio, polímero o metálica). Por lo general, la plantilla tiene una fuerza externa aplicada para garantizar que el plástico recubre completamente la plantilla estructurada. Mientras está en contacto a temperatura elevada, el plástico se redistribuye para convertirse en una réplica negativa de la plantilla; por ejemplo, si la plantilla tiene una matriz de postes, entonces el plástico en relieve da como resultado una matriz de pozos. Mientras la plantilla está en contacto con el sustrato plástico, la temperatura del sustrato se reduce, lo que bloquea el patrón grabado en relieve en el sustrato.

Una característica cóncava que está en un sustrato puede tener cualquiera de una variedad de formas. En términos de la forma en la superficie, la característica puede tener lados curvos, lados lineales, esquinas o una combinación de ellos. Por ejemplo, las características pueden ser pozos con aberturas en la superficie que son circulares, ovaladas, cuadradas, poligonales, con forma de estrella (con cualquier número de vértices) o con forma irregular. Las características pueden ser canales y la forma de los canales en la superficie puede incluir lados que son curvos, lineales, en ángulo o una combinación de ellos. Otras características del canal pueden ser lineales, en serpentin, rectangulares, cuadradas, triangulares, circulares, ovales, hiperbólicas o una combinación de ellas. Los canales pueden tener una o más ramas o esquinas. Los canales pueden conectar dos puntos en una superficie, uno de los cuales o ambos pueden ser el borde del sustrato. La Fig. 3B y la Fig. 3C muestran ejemplos de características de canales en fiduciales de ojo de buey junto con pozos dentro y alrededor de los fiduciales de ojo de buey.

La forma de la sección transversal de una característica cóncava, tomada ortogonal a la superficie, puede tener paredes que son curvas, lineales o una combinación de las dos. Por lo tanto, la forma de la sección transversal puede ser una porción de un círculo u óvalo (por ejemplo, en forma de U), o puede tener dos o más lados lineales que se encuentran en las esquinas (por ejemplo, en forma de V, cuadrada, poligonal o en forma de estrella). En términos de la forma de la sección transversal, la parte inferior de la característica cóncava puede ser más estrecha, más ancha o aproximadamente igual a la abertura en la superficie. Estas formas de sección transversal se pueden ilustrar para el caso donde la característica cóncava es un pozo, en cuyo caso, la abertura en la superficie será aproximadamente la misma área que el fondo del pozo cuando el pozo tiene una sección transversal cilíndrica, mientras que la parte inferior del pozo tendrá un área diferente (típicamente más pequeña) que el área en la abertura en la superficie cuando el

pozo tiene una sección transversal cónica. Por supuesto, las secciones transversales, aunque ilustradas para pozos, también pueden aplicarse a los canales.

Para realizaciones en las que las características cóncavas forman pozos, cada pozo puede tener cualquier volumen que sea capaz de confinar un líquido. El volumen mínimo o máximo puede seleccionarse, por ejemplo, para adaptarse al rendimiento (por ejemplo, multiplexidad), resolución, composición del analito o reactividad del analito esperada para usos posteriores del sustrato. Por ejemplo, el volumen puede ser de al menos $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$, $0,1 \mu\text{m}^3$, $1 \mu\text{m}^3$, $10 \mu\text{m}^3$, $100 \mu\text{m}^3$ o más. De forma alternativa o adicional, el volumen puede ser como máximo $1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, $1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, $100 \mu\text{m}^3$, $10 \mu\text{m}^3$, $1 \mu\text{m}^3$, $0,1 \mu\text{m}^3$ o menos. Se entenderá que el material de gel puede llenar todo o parte del volumen de un pozo. El volumen del gel en un pozo individual puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

El área ocupada por cada abertura de pozo en una superficie puede seleccionarse con base a criterios similares a los establecidos anteriormente para el volumen de pozo. Por ejemplo, el área para cada abertura de pozo en una superficie puede ser al menos de $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$, $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, $0,1 \mu\text{m}^2$, $1 \mu\text{m}^2$, $10 \mu\text{m}^2$, $100 \mu\text{m}^2$ o más. De forma alternativa o adicional, el área puede ser como máximo de $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, $100 \mu\text{m}^2$, $10 \mu\text{m}^2$, $1 \mu\text{m}^2$, $0,1 \mu\text{m}^2$, $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, o menos. La profundidad de cada pozo puede ser de al menos $0,1 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m}$ o más. Alternativa o adicionalmente, la profundidad puede ser como máximo de $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $0,1 \mu\text{m}$ o menos.

Se pueden prever muchos diseños diferentes de pozos u otras características cóncavas, que incluyen patrones regulares, repetitivos y no regulares. Por ejemplo, los pozos se pueden disponer en una rejilla hexagonal para un empaque cerrado y una densidad mejorada. Otros diseños pueden incluir, por ejemplo, diseños rectilíneos (es decir, rectangulares), diseños triangulares, etc. Los diseños particulares, y las diferencias entre los diseños de diferentes dominios, si se utilizan, pueden seguir las enseñanzas de la patente de EE. UU. No. 7.813.013, y/o del documento US2013091176. Cualquiera de una variedad de patrones cristalinos o policristalinos puede ser útil.

Un patrón de pozos se puede caracterizar en términos del paso promedio (es decir, espaciado de centro a centro) para los pozos. Nuevamente, el patrón puede ser regular, de manera que el coeficiente de variación alrededor del paso promedio sea pequeño o el patrón no sea regular, en cuyo caso el coeficiente de variación puede ser relativamente grande. En cualquier caso, el paso promedio puede ser, por ejemplo, al menos de 10 nm , $0,1 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m}$ o más. Alternativa o adicionalmente, el paso promedio puede ser, por ejemplo, a lo sumo de $100 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$, $0,1 \mu\text{m}$ o menos. Por supuesto, el paso promedio para un patrón particular de pozos puede estar entre uno de los valores más bajos y uno de los valores más altos seleccionados de los intervalos anteriores.

Un patrón de pozos también se puede caracterizar con respecto a la densidad de los pozos (es decir, la cantidad de pozos) en un área definida. Por ejemplo, los pozos pueden estar presentes a una densidad de aproximadamente 2 millones por mm^2 . De acuerdo con los métodos de fabricación que se exponen en la presente memoria, la densidad puede ajustarse fácilmente a diferentes densidades que incluyen, por ejemplo, una densidad de al menos 100 por mm^2 , 1.000 por mm^2 , 0,1 millones por mm^2 , 1 millón por mm^2 , 2 millones por mm^2 , 5 millones por mm^2 o más. Alternativa o adicionalmente, la densidad puede ajustarse para que no supere los 5 millones por mm^2 , 2 millones por mm^2 , 1 millón por mm^2 , 0,1 millones por mm^2 , 1.000 por mm^2 , 100 por mm^2 o menos. Por supuesto, la densidad de los pozos en un sustrato puede estar entre uno de los valores más bajos y uno de los valores más altos seleccionados de los intervalos anteriores.

En realizaciones particulares, se usa un material de gel. En algunos casos, se proporciona un material formador de gel (por ejemplo, polimerizable) a un soporte sólido en estado líquido y posteriormente se convierte en un gel. Los ejemplos de materiales polimerizables incluyen, sin limitación, acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo, N-vinilpirrolidinona o derivados de los mismos. Tales materiales son útiles para preparar hidrogeles. En algunas realizaciones, el material polimerizable puede incluir dos o más especies diferentes de compuestos que forman un copolímero. Por ejemplo, dos o más especies diferentes de acrilamida, metacrilamida, metacrilato de hidroxietilo, N-vinilpirrolidinona o derivados de la misma pueden funcionar como comonómeros que se polimerizan para formar un hidrogel de copolímero. Los hidrogeles útiles incluyen, pero no se limitan a, polímero de acrilamida libre de silano (SFA) (véase la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1), poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM, véase el documento US2014079923), polímeros de poli(acrilamida) formados a partir de acrilamida y un ácido acrílico o un ácido acrílico que contiene un grupo vinilo como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/31148; polímeros de poli(acrilamida) formados a partir de monómeros que forman reacciones de foto-cicloaddición [2 + 2], por ejemplo, como se describe en los documentos WO 01/01143 o WO 03/014392; o copolímeros de poli(acrilamida) descritos en la patente de EE. UU. No. 6.465.178, documentos WO 01/62982 o WO 00/53812. Las variantes de estos materiales en gel tratadas químicamente también son útiles, tales como el SFA tratado químicamente hecho para reaccionar con oligonucleótidos que tienen un grupo reactivo correspondiente (como la azidolisis de SFA para producir azido-SFA que es reactivo con oligonucleótidos modificados con alquínilo 5'- o 3'-). Los ejemplos de hidrogeles y los materiales polimerizables que se pueden usar para formar hidrogeles se describen, por ejemplo, en el documento US2014079923 o en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1. Otros geles útiles son aquellos que se forman por un cambio dependiente de la temperatura en el estado de líquido a gelatinoso. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, agar, agarosa o gelatina.

El material de gel que se encuentra en un pozo u otra característica cóncava en la superficie de un sustrato estructurado puede unirse covalentemente a la superficie. Por ejemplo, PAZAM puede unirse covalentemente a una superficie utilizando materiales de superficie y otros reactivos expuestos en el documento US2014079923, y tal como se expone en la sección de Ejemplos de este documento. Sin embargo, el material de gel no necesita estar covalentemente unido a los pozos u otras características cóncavas como se ejemplifica para SFA en la sección de ejemplos a continuación.

Uno o más analitos pueden estar presentes en o sobre el material de gel que está presente en un sustrato estructurado. Los sustratos que contienen gel de la presente descripción son particularmente útiles para la detección de analitos, o para llevar a cabo reacciones sintéticas con analitos. Por lo tanto, cualquiera de una variedad de analitos que deben detectarse, caracterizarse, modificarse, sintetizarse o similares puede estar presente en o sobre material de gel de un sustrato expuesto en la presente memoria. Los ejemplos de analitos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN o análogos de los mismos), proteínas, polisacáridos, células, anticuerpos, epítomos, receptores, ligandos, enzimas (por ejemplo, quinasas, fosfatasas o polimerasas), candidatos a fármaco de molécula pequeña, o similares. Un sustrato estructurado puede incluir múltiples especies diferentes de una biblioteca de analitos. Por ejemplo, las especies pueden ser diferentes anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos, ácidos nucleicos que tienen diferentes secuencias de una biblioteca de ácidos nucleicos, proteínas que tienen una estructura y/o función diferentes de una biblioteca de proteínas, fármacos candidatos de una biblioteca combinatoria de moléculas pequeñas, etc.

En algunas realizaciones, los analitos pueden distribuirse sobre un sustrato estructurado de manera que puedan resolverse individualmente. Por ejemplo, una molécula única de cada analito puede estar presente en cada pozo que contiene gel de un sustrato estructurado. Alternativamente, los analitos pueden estar presentes como colonias o poblaciones, de modo que las moléculas individuales no se resuelvan necesariamente. Las colonias o poblaciones pueden ser homogéneas con respecto a contener solo una única especie de analito (aunque en múltiples copias). Tomando los ácidos nucleicos como ejemplo, cada pozo en un sustrato estructurado puede incluir una colonia o población de ácidos nucleicos y cada ácido nucleico en la colonia o población puede tener la misma secuencia de nucleótidos (ya sea de cadena sencilla o de doble cadena). Dichas colonias pueden crearse por amplificación de grupo o amplificación en puente como se expone con más detalle en otra parte de este documento. Múltiples repeticiones de una secuencia objetivo pueden estar presentes en una única molécula de ácido nucleico, como un concatámero creado usando un procedimiento de amplificación en círculo rodante. Por lo tanto, el material de gel en cada pozo en un sustrato estructurado puede contener múltiples copias de una sola especie de un analito. Alternativamente, una colonia o población de analitos que están en un pozo pueden incluir dos o más especies diferentes. Por ejemplo, uno o más pozos en un sustrato estructurado pueden contener cada uno una colonia mixta que tiene dos o más especies de ácido nucleico diferentes (es decir, moléculas de ácido nucleico con diferentes secuencias). Las dos o más especies de ácido nucleico en una colonia mixta pueden estar presentes en cantidades no despreciables, por ejemplo, lo que permite detectar más de un ácido nucleico en la colonia mixta.

Los analitos se pueden unir a un material de gel. La unión puede ser covalente o no covalente. Los ejemplos de métodos y reactivos para unir ácidos nucleicos a geles se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1, o el documento US2014079923, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia. Los analitos pueden ser ácidos nucleicos y los ácidos nucleicos pueden unirse al gel a través de su oxígeno 3', oxígeno 5', o en otros lugares a lo largo de su longitud, como por ejemplo a través de un fracción base del nucleótido terminal 3', una fracción base del nucleótido 5', y/o uno o más fracciones bases en cualquier otra parte en la molécula. Los modos de unión no covalentes incluyen, por ejemplo, interacciones iónicas entre ácido nucleico y gel, atrapamiento de ácido nucleico dentro de los poros de un gel, interacciones proteína-proteína, unión entre receptores y ligandos en el gel y/o ácido nucleico, y otros modos conocidos.

En algunas realizaciones, un recubrimiento de gel que se aplica a una superficie contiene uno o más analitos antes de la eliminación del material de gel de las regiones intersticiales. Por lo tanto, el material de gel puede estar presente en las regiones intersticiales y el material de gel en las regiones intersticiales puede unirse a uno o más analitos diferentes. Alternativamente, los analitos se agregan a un material de gel en características cóncavas después de eliminar el material de gel de las regiones intersticiales.

Un sustrato estructurado de la presente descripción puede estar presente en una celda de flujo. Los ejemplos de celdas de flujo, los métodos para su fabricación y los métodos para su uso se describen en las publicaciones de las solicitudes de patente de EE. UU. Nos 2010/0111768 A1 o 2012-0270305 A1; o el documento WO 05/065814. Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para albergar una matriz que se produce mediante los métodos de la presente descripción y que se somete a una secuenciación por síntesis (SBS) u otra técnica que involucra el suministro repetido de reactivos en ciclos (por ejemplo, técnicas de síntesis o técnicas de detección que tienen etapas repetitivas o cíclicas). Los ejemplos de métodos de detección se exponen con más detalle a continuación.

En algunas realizaciones, se usa una celda de flujo u otro recipiente que tiene múltiples superficies. Los recipientes que tienen múltiples superficies se pueden usar de manera que solo una superficie individual tenga características cóncavas que contienen gel (por ejemplo, pozos). Alternativamente, dos o más superficies presentes en el recipiente pueden tener características cóncavas que contienen gel. Se pueden detectar selectivamente una o más superficies de una celda de flujo. Por ejemplo, las superficies opuestas en el interior de una celda de flujo pueden abordarse

selectivamente con radiación enfocada utilizando métodos conocidos en la técnica, como las técnicas confocales. Las técnicas y dispositivos confocales útiles para dirigir selectivamente la radiación a múltiples superficies de un recipiente (por ejemplo, una celda de flujo) se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2009/0272914 A1 o la patente de EE. UU. No. 8,039,817.

5 La presente descripción proporciona un método para fabricar un sustrato. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tenga una superficie plana, en donde la superficie plana está interrumpida por una o más características cóncavas y en donde las una o más características cóncavas están bordeadas por una o más regiones intersticiales en la superficie plana; (b) recubrir al menos una porción del soporte sólido con un material de gel, en donde la porción incluye al menos una de las características cóncavas y al menos una de las regiones intersticiales; y (c) pulir la superficie plana para eliminar el material de gel de al menos una región intersticial y mantener el material de gel en al menos una característica cóncava.

10 Se puede fabricar un sustrato para tener características cóncavas usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en el arte. En muchas realizaciones, las características cóncavas serán pequeñas, del orden de nanómetros o micrómetros. En tales casos se pueden utilizar técnicas de nanofabricación o microfabricación. Los ejemplos de estas técnicas se exponen en otras partes del presente documento, tal como en el Ejemplo II a continuación. Otros ejemplos de técnicas de nanofabricación y microfabricación se describen en los documentos US2013116153 y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2012/0316086 A1.

15 Una o más características cóncavas, tales como los pozos, pueden recubrirse con material de gel preformado o con un líquido que posteriormente forma un material de gel. Un ejemplo del anterior enfoque es el recubrimiento de un sustrato con PAZAM preformado usando recubrimiento por centrifugación, inmersión, flujo del gel bajo presión positiva o negativa o técnicas expuestas en el documento US2014079923. El recubrimiento de una matriz de pozos con PAZAM preformado se muestra a continuación en el Ejemplo III. Un ejemplo de aplicación de líquido que posteriormente forma un material de gel es el recubrimiento de una matriz de pozos con acrilamida libre de silano y N-[5-(2-bromoacetil)aminopentil]acrilamida (BRAPA) en forma líquida y permitiendo que los reactivos formen un gel por polimerización en la superficie. El recubrimiento de una matriz de esta manera se demuestra en el Ejemplo I a continuación y puede usar reactivos químicos y procedimientos según lo establecido en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1. En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando un sustrato que contiene un pozo se sumerge en un material de gel preformado, el material de gel puede llenar los pozos de forma selectiva y el pulido puede no ser necesario.

20 Los analitos se pueden agregar a un material de gel antes del contacto con un soporte sólido o después. Además, se pueden agregar analitos a un gel (es decir, después de que el gel se haya formado a partir de sus reactivos precursores) o se pueden agregar analitos a una solución de reactivo formador de gel (es decir, antes de la formación del gel). En algunas realizaciones, pueden añadirse diversos analitos antes de la formación del gel y otros pueden agregarse después de la formación del gel. En un ejemplo, los ácidos nucleicos cebadores se agregan a una solución formadora de gel y luego se deja que la solución se forme en un gel (por ejemplo, mediante polimerización como ocurre para SFA y PAZAM). La formación del gel puede ocurrir en un soporte sólido o el gel puede preformarse y luego recubrirse sobre un soporte sólido. De cualquier manera, los cebadores se unirán al gel que está presente en las características cóncavas como los pozos. Los ácidos nucleicos objetivo que son complementarios a los cebadores se pueden agregar al gel que contiene el cebador, de modo que los ácidos nucleicos objetivo se unen al gel (mediante hibridación) después de que el material del gel se haya recubierto sobre el soporte sólido. La hibridación de los ácidos nucleicos objetivo puede ocurrir opcionalmente después de que se haya llevado a cabo una etapa de pulido (el pulido se describe con más detalle a continuación). El ejemplo anterior, describe varios casos en los que los ácidos nucleicos (que funcionan como cebadores o objetivos) se agregan a un gel en diferentes etapas de la fabricación de un sustrato estructurado.

25 En varias realizaciones, los ácidos nucleicos cebadores que se unen a un gel (o bien están presentes en o sobre un gel) se pueden usar para la captura y/o amplificación de ácidos nucleicos de la plantilla. Los cebadores pueden ser cebadores universales que se hibridan con una secuencia adaptadora universal que está unida a diferentes ácidos nucleicos objetivo en una biblioteca (es decir, cada ácido nucleico objetivo incluye una región objetivo que difiere de otros ácidos nucleicos objetivo en la biblioteca y varios ácidos nucleicos objetivo en la biblioteca tiene la misma secuencia del adaptador universal). En algunas realizaciones, un ácido nucleico objetivo se puede unir al material del gel, y los cebadores (ya sea en solución o también se unen al gel) se pueden usar para amplificar el ácido nucleico objetivo unido (es decir, el ácido nucleico objetivo puede servir como una plantilla para amplificación).

30 Un método expuesto en esta memoria puede usar cualquiera de una variedad de técnicas de amplificación. Los ejemplos de técnicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación en círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) o amplificación principal aleatoria (RPA). En realizaciones particulares, uno o más cebadores usados para la amplificación se pueden unir a un material de gel. En realizaciones de PCR, uno o ambos de los cebadores utilizados para la amplificación se pueden unir a un material de gel. Los formatos que utilizan dos especies de cebadores adjuntos a menudo se denominan como amplificación en puente porque los amplicones de doble cadena forman una estructura similar a un puente entre los dos cebadores unidos que flanquean la secuencia de la plantilla que se ha copiado. Los ejemplos de reactivos y condiciones que se pueden usar para la amplificación en puentes se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU.

No. 5.641.658; en la publicación de la patente de EE. UU. No. 2002/0055100; en la patente de EE. UU. No. 7.115.400; en la publicación de la patente de EE. UU. No. 2004/0096853; en la publicación de la patente de EE. UU. No. 2004/0002090; en la publicación de la patente de EE. UU. No. 2007/0128624; y la publicación de la patente de EE. UU. No. 2008/0009420.

5 La amplificación por PCR también se puede llevar a cabo con uno de los cebadores de amplificación unidos a un material de gel y el segundo cebador en solución. Un ejemplo de formato que usa una combinación de un cebador unido en fase sólida y un cebador en fase de solución es la PCR en emulsión como se describe, por ejemplo, en Dressman et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 100: 8817-8822 (2003), en el documento WO 05/010145, o en las publicaciones de patente de EE. UU. Nos. 2005/0130173 o 2005/0064460. La PCR de emulsión es ilustrativa del formato y se entenderá que para los fines de los métodos expuestos en la presente memoria, el uso de una emulsión es opcional y, de hecho, para varias realizaciones, no se usa una emulsión. Además, los cebadores no necesitan estar unidos directamente a soportes sólidos como se establece en las referencias de ePCR y, en su lugar, se pueden unir a un material de gel como se establece en la presente memoria. En algunos formatos de PCR en fase sólida o amplificación en puente, un ácido nucleico objetivo puede unirse a un material de gel y usarse como plantilla para la amplificación.

Las técnicas de RCA pueden modificarse para su uso en un método de la presente descripción. Los ejemplos de componentes que se pueden usar en una reacción de RCA y los principios por los cuales RCA produce amplicones se describen, por ejemplo, en Lizardi et al., Nat. Genet. 19: 225-232 (1998) y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2007/0099208 A1. Los cebadores utilizados para RCA pueden estar en solución o adheridos a un material de gel.

Las técnicas de MDA pueden modificarse para su uso en un método de la presente descripción. Algunos principios básicos y condiciones útiles para la MDA se describen, por ejemplo, en Dean et al., Proc Natl. Acad Sci. USA 99: 5261-66 (2002); Lage et al., Genome Research 13: 294-307 (2003); Walker et al., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; Walker et al., Nucl. Acidos Res. 20: 1691-96 (1992); las patentes de EE. UU. Nos. 5.455.166; 5.130.238; y 6.214.587. Los cebadores utilizados para MDA pueden estar en solución o adheridos a un material de gel.

En realizaciones particulares, se puede usar una combinación de las técnicas de amplificación ejemplificadas anteriormente. Por ejemplo, RCA y MDA se pueden usar en una combinación en donde RCA se usa para generar un amplicón concatamérico en solución (por ejemplo, usando cebadores en fase de solución). El amplicón se puede usar como plantilla para MDA utilizando cebadores que se unen a un material de gel. En este ejemplo, los amplicones producidos después de las etapas combinadas de RCA y MDA se unirán al material del gel. Los amplicones generalmente contendrán repeticiones concataméricas de una secuencia de nucleótidos objetivo.

Las técnicas de amplificación, tales como las ejemplificadas anteriormente, pueden usarse para producir características que contienen gel que tienen múltiples copias de ácidos nucleicos objetivo. Una característica individual, tal como un pozo, puede tener una población clonal de secuencias de nucleótidos en forma de un concatámero de una sola molécula, tal como las producidas por RCA, o en forma de muchas moléculas de ácido nucleico que tienen la misma secuencia que las producidas por PCR en puente. En general, uno o varios ácidos nucleicos que tienen varias copias del objetivo amplificado se unirán al material de gel.

Para algunas aplicaciones, un pozo que contiene un gel individual (u otra característica cóncava) puede ser poblado predominantemente con amplicones de un primer ácido nucleico objetivo y también puede tener un bajo nivel de amplicones contaminantes de un segundo ácido nucleico objetivo o de una mutación espontánea que se produce durante la amplificación. Una matriz puede tener uno o más sitios de amplificación que tienen un nivel suficientemente bajo de amplicones contaminantes para tener un impacto inaceptable en un uso posterior de la matriz. Por ejemplo, cuando la matriz se va a utilizar en una aplicación de detección, un nivel aceptable de contaminación sería un nivel que no afecte la relación señal a ruido o la resolución de la técnica de detección de una manera inaceptable. Por consiguiente, la clonalidad aparente generalmente será relevante para un uso o aplicación particular de una matriz hecha por los métodos establecidos en esta memoria. Los ejemplos de niveles de contaminación que pueden ser aceptables en un pozo individual u otra característica para aplicaciones particulares incluyen, pero no se limitan a, como máximo, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10% o 25% de amplicones contaminantes. Una matriz puede incluir uno o más pozos u otras características que tengan estos ejemplos de niveles de amplicones contaminantes. Por ejemplo, hasta el 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o incluso el 100% de las características en una matriz pueden tener algunos amplicones contaminantes.

Un material de gel que ha sido recubierto sobre la superficie de un soporte sólido puede unirse covalentemente al soporte. Como se expuso anteriormente, la etapa de unir un analito, tal como un ácido nucleico, al material de gel puede llevarse a cabo en una variedad de diferentes etapas en la fabricación de un sustrato estructurado. De este modo, se puede unir un material de gel a un soporte sólido antes o después de unir un analito al material de gel. La unión del material de gel a un soporte sólido puede llevarse a cabo utilizando cualquier química útil que incluya, sin limitación, las expuestas en el documento US2014079923 o demostradas en el Ejemplo III a continuación. Se entenderá que la unión covalente de material de gel a un soporte sólido no es necesaria en todas las realizaciones. Por lo tanto, las etapas subsiguientes de pulir un soporte recubierto con gel o usar un sustrato pulido se pueden llevar

a cabo para un sustrato que tiene material de gel que está opcionalmente, pero no necesariamente, unido covalentemente a características cóncavas, tales como pozos.

Un método expuesto en la presente memoria puede incluir una etapa de eliminación del material de gel de la superficie de un soporte sólido. El material de gel que está recubierto sobre un soporte sólido puede eliminarse selectivamente de las regiones intersticiales utilizando cualquiera de una variedad de técnicas. Por ejemplo, el material de gel se puede eliminar de un soporte sólido que tiene características cóncavas y regiones intersticiales mediante una técnica de pulido mecánico. El pulido mecánico se puede realizar aplicando fuerzas abrasivas a la superficie del soporte sólido. Los ejemplos de métodos incluyen abrasión con una suspensión de perlas, limpieza con una lámina o tela, raspado o similares. Un ejemplo de pulido incluye el uso de un paño sin pelusa (grado de sala limpia) recubierto con una suspensión de perlas de sílice de 3 μm (10% p/v en agua) para eliminar el gel intersticial. También se puede usar una rueda/molino pulidor con esta suspensión. El pulido mecánico también se puede lograr usando un chorro de fluido o un chorro de aire para eliminar el gel de las regiones intersticiales.

El pulido puede involucrar pulido químico tal como hidrólisis o degradación basada en radicales de acrilamida (por ejemplo, mediante la exposición a peróxido de benzoilo o peróxido de hidrógeno diluido como se describe en Kurenkov, et al., *Russian Journal of Applied Chemistry*, 75: 1039-1050 (2002); Caulfield et al., *Polym.* 44: 1331-1337 (2003); y Caulfield, et al., *Chem. Rev.* 102: 3067-3083 (2002).

El pulido también puede involucrar una combinación de métodos de pulido químico y mecánico donde se utiliza una suspensión química que contiene una suspensión coloidal de partículas para exfoliar mecánicamente y luego disolver químicamente las porciones desplazadas de material de gel de las regiones intersticiales. Otros métodos para pulir o limpiar las regiones intersticiales incluyen técnicas basadas en adhesivo, por ejemplo, técnicas en las que una película adhesiva plana y rígida con afinidad al material de gel está recubierta en la superficie, haciendo contacto íntimo (por ejemplo, a través de un enlace químico) con el material de gel en regiones intersticiales. La eliminación/descamación mecánica de esta película adhesiva dará como resultado la eliminación mecánica del material de gel de las regiones intersticiales, mientras deja el material de gel en las características cóncavas.

En otro ejemplo, el SFA injertado con tiofosfato se puede eliminar de las regiones intersticiales en una superficie de la siguiente manera. Una toallita Whatman humedecida con agua se puede aplicar en óxido de aluminio (~100 mg, 0,3 μm) o en perlas de acero. Luego, la suspensión formada se puede frotar sobre la superficie de un soporte sólido, en pequeños círculos concéntricos, utilizando una presión uniforme. Luego se puede usar una toallita Whatman humedecida con agua limpia para eliminar la suspensión de la superficie. Los métodos de pulido mecánico y químico ejemplificados en la presente memoria para eliminar el material de gel de las regiones intersticiales también se pueden usar para inactivar el material de gel en las regiones intersticiales, ya sea que se elimine o no el material de gel. Por ejemplo, el material de gel puede inactivarse con respecto a la capacidad de unirse a analitos tales como ácidos nucleicos o con respecto a la capacidad de soportar la amplificación de ácidos nucleicos.

Un método para elaborar una matriz puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tenga una superficie con una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; (b) suministrar una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo a los pozos del soporte sólido para producir una matriz de pozos que tienen una sola especie de ácido nucleico objetivo unida al material de gel en cada pozo, en donde diferentes pozos en la matriz tienen diferentes especies de ácido nucleico objetivo de la biblioteca; y (c) amplificar los ácidos nucleicos objetivo unidos al material de gel en los pozos de la matriz para producir una población clonal de un ácido nucleico objetivo individual en cada uno de los pozos de la matriz.

En varias realizaciones, los sustratos estructurados expuestos en esta memoria proporcionan la ventaja de la administración conveniente de múltiples analitos diferentes desde una mezcla a ubicaciones individualizadas sobre el sustrato, formando así una matriz. Los sustratos estructurados facilitan la captura selectiva de un solo analito en cada pozo individual que contiene gel (u otra característica cóncava) de una mezcla de analitos en contacto con el sustrato. El patrón de pozos que contienen gel (u otras características cóncavas) en el sustrato estructurado y la eficiencia de la carga se pueden ajustar para obtener matrices que tengan las características deseadas, como la densidad del analito y la pureza de cada característica con respecto a tener una sola especie de analito. Por ejemplo, se puede usar una mayor densidad de pozos para obtener una mayor densidad de analitos en la matriz y, por el contrario, se puede usar una menor densidad de pozos para obtener una menor densidad de analitos en la matriz. Alternativa o adicionalmente, la concentración o la cantidad de analito en solución se puede aumentar para obtener una mayor densidad de analitos en la matriz o disminuir para obtener una menor densidad de analitos en la matriz. La pureza promedio de los analitos en cada pozo que contiene gel (u otra característica cóncava) se puede ajustar alterando las propiedades del sustrato o las condiciones para la administración del analito como se explica con más detalle a continuación y se demuestra en la sección de Ejemplos.

En realizaciones particulares, el tamaño o el volumen de los pozos (u otras características cóncavas) se pueden ajustar para influir en la pureza de los analitos capturados. Por ejemplo, un pozo puede tener un área o volumen de material de gel que se acomoda solo a un analito de un tipo particular, de tal manera que la exclusión estérica impida que más de una molécula de analito sea capturada o sembrada en el pozo. La exclusión estérica puede ser particularmente útil

para analitos grandes como los ácidos nucleicos. Más específicamente, los pozos (u otras características cóncavas) pueden presentar una superficie de gel que tiene un área que es equivalente o más pequeña que el diámetro del volumen excluido de los ácidos nucleicos objetivo que se van a sembrar sobre el sustrato. El volumen excluido para un ácido nucleico objetivo y su diámetro se puede determinar, por ejemplo, a partir de la longitud del ácido nucleico objetivo. Los métodos para determinar el volumen excluido de ácidos nucleicos y el diámetro del volumen excluido se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. No. 7.785.790; Rybenkov et al., Proc. Natl Acad Sci. U.S.A. 90: 5307-5311 (1993); Zimmerman et al., J. Mol. Biol. 222: 599-620 (1991); o Sobel et al., Biopolymers 31: 1559-1564 (1991), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Las condiciones para la exclusión estérica se exponen en el documento US2013116153 y en la patente de EE. UU. No. 7.785.790, y se pueden usar fácilmente para sustratos estructurados de la presente descripción.

Se entenderá que en algunas realizaciones, los pozos (u otras características cóncavas) pueden presentar una superficie de gel que tiene un área que es sustancialmente mayor que el diámetro del volumen excluido de los ácidos nucleicos objetivo que se transportan a los sitios de amplificación. Por lo tanto, el área para las características puede ser lo suficientemente grande como para que no se produzca la exclusión estérica.

En algunas realizaciones, tales como las realizaciones de exclusión estérica expuestas anteriormente, puede suministrarse una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo a pozos que contienen gel (u otras características cóncavas) de un soporte sólido antes del inicio de un proceso de amplificación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos objetivo se pueden administrar a un sustrato estructurado en condiciones para sembrar el material de gel en el sustrato con los ácidos nucleicos objetivo. El sustrato puede lavarse opcionalmente para eliminar los ácidos nucleicos objetivo que no siembran el gel, así como cualquier otro material que no sea necesario para el procesamiento o uso posterior del sustrato. La amplificación puede incluir una o más de las técnicas expuestas anteriormente en esta memoria.

En realizaciones alternativas, puede suministrarse una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo a pozos que contienen gel (u otras características cóncavas) de un soporte sólido y puede ocurrir un proceso de amplificación simultáneamente con el evento de siembra. Por ejemplo, la siembra puede ocurrir bajo un régimen que explota la exclusión cinética como se describe, por ejemplo, en el documento US201338042, que se incorpora en esta memoria por referencia. La exclusión cinética puede ocurrir cuando un proceso ocurre a una velocidad suficientemente rápida para excluir efectivamente que ocurra otro evento o proceso. En el caso de una serie de pozos que contienen gel, los pozos se pueden sembrar al azar con ácidos nucleicos objetivo de una solución y se pueden generar copias del ácido nucleico objetivo en un proceso de amplificación para llenar cada uno de los sitios sembrados hasta su capacidad. Los procesos de siembra y amplificación pueden proceder simultáneamente en condiciones donde la tasa de amplificación excede la tasa de siembra. Como tal, la velocidad relativamente rápida a la que se realizan las copias en un sitio que ha sido sembrado por un primer ácido nucleico objetivo excluirá efectivamente a un segundo ácido nucleico de la siembra del sitio para la amplificación. De manera similar, la exclusión cinética puede explotar una velocidad relativamente lenta para hacer una primera copia de un ácido nucleico objetivo frente a una velocidad relativamente rápida para elaborar copias posteriores del ácido nucleico objetivo o de la primera copia. Por ejemplo, la exclusión cinética puede ocurrir debido a un retraso en la formación de una primera copia de un ácido nucleico objetivo que ha sembrado un pozo que contiene gel (por ejemplo, activación retardada o lenta) frente a la velocidad relativamente rápida a la que se realizan las copias posteriores para llenar el sitio. En este ejemplo, un pozo que contiene un gel individual puede haber sido sembrado con varios ácidos nucleicos objetivo diferentes (por ejemplo, varios ácidos nucleicos objetivo pueden estar presentes en cada sitio antes de la amplificación). Sin embargo, la formación de la primera copia para cualquier ácido nucleico objetivo dado puede activarse aleatoriamente, de modo que la velocidad promedio de la formación de la primera copia es relativamente lenta en comparación con la velocidad a la que se generan las copias posteriores. En este caso, aunque un pozo que contiene un gel individual puede haber sido sembrado con varios ácidos nucleicos objetivo diferentes, la exclusión cinética permitirá que solo uno de esos ácidos nucleicos objetivo se amplifique. En general, un pozo que contiene gel (u otra característica cóncava) puede servir como un sitio para la amplificación y la formación de la matriz en un método expuesto en el documento US2013338042.

Como alternativa a la administración de múltiples analitos diferentes de una mezcla a características individuales cóncavas que contienen gel, los analitos pueden suministrarse discretamente a características individuales a partir de soluciones madre puras. De manera similar, los analitos pueden sintetizarse en características individuales mediante el suministro discreto de bloques de construcción sintéticos (por ejemplo, los precursores de nucleótidos pueden administrarse secuencialmente para sintetizar ácidos nucleicos). Los ejemplos de métodos para el suministro de analitos puros o bloques de construcción para sintetizar analitos *in situ* incluyen, pero no se limitan a, la marcación de matrices de inyección de tinta y la síntesis de matrices fotolitográficas. Los métodos fotolitográficos útiles incluyen aquellos utilizados comercialmente por Affymetrix (Santa Clara, CA) para fabricar microarreglos GeneChip® o descritos en las patentes de EE. UU. Nos. 5.324.633; 5.744.305; 5.624.711; 6.022.963; 6.291.183; y 6.416.949. También son útiles las técnicas de marcación de inyección de tinta, tales como las comercializadas por Agilent (Santa Clara, CA) para imprimir matrices SurePrint^{MR} o descritas en las patentes de EE. UU. Nos. 6.337.393; 6.419.883; 6.420.180 o 6.689.319. Dichos métodos pueden modificarse fácilmente para dirigir la administración a las características que contienen gel de la presente descripción.

El material de gel en una característica cóncava particular no necesita contener solo una única especie de analito. Más bien, en algunas realizaciones, una característica cóncava puede contener varias especies diferentes de analito

en el gel del mismo. Un ejemplo es demostrado por los marcadores fiduciales de ojo de buey en la Fig. 5. Los marcadores fiduciales incluyen dos canales 'brillantes' en forma de anillo, cada uno de los dos canales contiene material de gel, y el material de gel en cada canal brillante está unido a una pluralidad de diferentes colonias de ácido nucleico. Las colonias de ácido nucleico en los canales brillantes se formaron mediante la siembra de cada anillo con varias especies diferentes de ácido nucleico objetivo que funcionaron como plantillas en un procedimiento de amplificación. El marcador fiducial también incluye dos regiones 'oscuras' en forma de anillo. Los anillos oscuros están formados por patrones superficiales intersticiales. El ejemplo de ojo de buey se forma alternando anillos oscuros y brillantes en un patrón concéntrico. En el ejemplo de la Fig. 5, el sustrato estructurado también incluye pozos que contienen gel y cada uno generalmente contiene una población clonal derivada de un único objetivo de ácido nucleico. Los pozos se producen en una banda en forma de anillo entre los anillos brillantes y oscuros. Por lo tanto, los fiduciales tienen un patrón alternante de anillo intersticial, una banda que contiene un pozo y un anillo de canal. Se utilizó el mismo procedimiento de amplificación para hacer crecer simultáneamente las colonias de ácido nucleico clonales en los pozos y la población mixta en el marcador fiducial (véase el Ejemplo III, más adelante). Otros ejemplos de fiduciales que tienen patrones alternantes de anillos se muestran en la Fig. 3B y en la Fig. 3C.

Esta descripción proporciona además un método para detectar analitos. El método puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido que tenga una superficie plana, en donde la superficie plana está interrumpida por una o más características cóncavas, en donde las características cóncavas contienen material de gel, en donde las una o más características cóncavas están bordeadas por una o más regiones intersticiales en la superficie plana, estando las regiones intersticiales sustancialmente desprovistas del material de gel, y en donde el material de gel está unido o contiene analitos objetivo; (b) poner en contacto el soporte sólido con sondas en condiciones en las que los analitos objetivo interactúan específicamente con las sondas; y (c) detectar el soporte sólido para distinguir al menos un subconjunto de los analitos objetivo que interactúan con una o más de las sondas.

En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos son los analitos que se detectan y las características cóncavas son pozos. Por ejemplo, un método para detectar ácidos nucleicos puede incluir las etapas de (a) proporcionar un soporte sólido con una superficie y una biblioteca de ácidos nucleicos, teniendo la superficie una pluralidad de pozos, conteniendo los pozos un material de gel, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad, estando una única especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca unida al material de gel en cada uno de los pozos; (b) poner en contacto el soporte sólido con al menos una sonda que se une a los ácidos nucleicos objetivo; y (c) detectar el soporte sólido para distinguir los pozos que tienen una especie de ácido nucleico objetivo que se une a al menos una sonda.

Los sustratos estructurados de la presente descripción que contienen matrices de ácido nucleico se pueden usar para cualquiera de una variedad de propósitos. Un uso particularmente deseable para los ácidos nucleicos es servir como sondas de captura que hibridan con ácidos nucleicos objetivo que tienen secuencias complementarias. Los ácidos nucleicos objetivo una vez hibridados con las sondas de captura pueden detectarse, por ejemplo, a través de una etiqueta reclutada para la sonda de captura. Los métodos para la detección de ácidos nucleicos objetivo mediante hibridación para capturar sondas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes de EE. UU. Nos. 7,582,420; 6,890,741; 6,913,884 o 6,355,431 o las publicaciones de las solicitudes de patente de EE. UU. Nos. 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o 2005/0181440 A1. Por ejemplo, una etiqueta puede ser reclutada para una sonda de captura en virtud de la hibridación de la sonda de captura a una sonda de destino que porta la etiqueta. En otro ejemplo, se puede reclutar una etiqueta para una sonda de captura mediante la hibridación de una sonda objetivo con la sonda de captura, de modo que la sonda de captura se puede extender mediante la ligación a un oligonucleótido marcado (por ejemplo, a través de la actividad de la ligasa) o mediante la adición de un nucleótido marcado (por ejemplo, a través de la actividad de la polimerasa).

Una matriz de ácido nucleico también se puede utilizar en un procedimiento de secuenciación, tal como una técnica de secuenciación por síntesis (SBS). Brevemente, la SBS puede iniciarse poniendo en contacto los ácidos nucleicos objetivo con uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc. Las características en las que un cebador se extiende utilizando el ácido nucleico objetivo como plantilla incorporarán un nucleótido marcado que puede detectarse. Opcionalmente, los nucleótidos marcados pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina una extensión del cebador adicional una vez que se ha agregado un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene una fracción terminadora reversible se puede agregar a un cebador de tal manera que la extensión subsiguiente no pueda ocurrir hasta que se suministre un agente de desbloqueo para eliminar la fracción. Por lo tanto, para las realizaciones que utilizan una terminación reversible, se puede administrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Los lavados se pueden realizar entre las distintas etapas de suministro. El ciclo se puede repetir n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los ejemplos de procedimientos SBS, sistemas fluidicos y plataformas de detección que pueden adaptarse fácilmente para su uso con una matriz producida por los métodos de la presente descripción se describen, por ejemplo, en Bentley et al., Nature 456: 53-59 (2008), WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744; patentes de EE. UU. Nos. 7.057.026; 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019 o 7.405.281, y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2008/0108082 A1.

Se pueden usar otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tales como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se

incorporan nucleótidos particulares a una cadena de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242 (1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11 (1), 3-11 (2001); Ronaghi et al., *Science* 281 (5375), 363 (1998); patentes de EE. UU. Nos. 6.210.891; 6.258.568 y 6.274.320. En pirosecuenciación, el PPI liberado puede detectarse convirtiéndose en trifosfato de adenosina (ATP) por ATP sulfurilasa, y el ATP resultante puede detectarse a través de fotones producidos por luciferasa. Por lo tanto, la reacción de secuenciación puede monitorizarse a través de un sistema de detección de luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas fluidos, detectores y procedimientos que se pueden usar para la aplicación de pirosecuenciación a las matrices de la presente descripción se describen, por ejemplo, en el documento WO2012058096 A2, la publicación de patente de EE. UU. No. 2005/0191698 A1, la patente de EE. UU. No. 7.595.883, y la patente de EE. UU. No. 7.244.559.

Las reacciones de secuenciación por ligación también son útiles, incluyendo, por ejemplo, las descritas en Shendure et al. *Science* 309: 1728-1732 (2005); la patente de EE. UU. No. 5.599.675; y la patente de EE. UU. No. 5.750.341. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación por hibridación como se describe, por ejemplo, en Bains et al., *Journal of Theoretical Biology* 135 (3), 303-7 (1988); Drmanac et al., *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor et al., *Science* 251 (4995), 767-773 (1995); y WO 1989/10977. Tanto en los procedimientos de secuenciación por ligación como de secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos que están presentes en los pozos que contienen gel (u otras características cóncavas) se someten a ciclos repetidos de administración y detección de oligonucleótidos. Los sistemas fluidicos para los métodos de SBS como se exponen en la presente memoria, o en las referencias citadas aquí, pueden adaptarse fácilmente para el suministro de reactivos para procedimientos de secuenciación por ligación o de secuenciación por hibridación. Típicamente, los oligonucleótidos están marcados de manera fluorescente y pueden detectarse usando detectores de fluorescencia similares a los descritos con respecto a los procedimientos de SBS en esta memoria o en las referencias citadas en aquí.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse a través de interacciones de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa que contiene fluoróforos y nucleótidos marcados con γ -fosfato, o con guías de onda en modo cero. Las técnicas y los reactivos para la secuenciación basada en FRET se describen, por ejemplo, en Levene et al. *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korfach et al. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008).

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente en Ion Torrent (Guilford, CT, una subsidiaria de Life Technologies) o los métodos y sistemas de secuenciación descritos en las solicitudes de patente de EE. UU. Nos. 2009/0026082 A1; 2009/0127589 A1; 2010/0137143 A1; o 2010/0282617 A1. En realizaciones particulares, los detectores eléctricos que se usan para detectar los protones liberados pueden modificarse para incluir pozos y los pozos pueden contener material de gel como se expone en la presente memoria.

Otra aplicación útil para una matriz de la presente descripción es el análisis de la expresión génica. La expresión génica se puede detectar o cuantificar utilizando técnicas de secuenciación de ARN, como las denominadas secuenciación digital de ARN. Las técnicas de secuenciación de ARN pueden llevarse a cabo utilizando metodologías de secuenciación conocidas en la técnica tales como las expuestas anteriormente. La expresión génica también se puede detectar o cuantificar utilizando técnicas de hibridación llevadas a cabo por hibridación directa con una matriz o utilizando un ensayo multiplex, cuyos productos se detectan en una matriz. También se puede usar una matriz de la presente descripción para determinar genotipos para una muestra de ADN genómico de uno o más individuos. Los ejemplos de métodos para análisis de genotipos y de expresión basados en matrices que pueden llevarse a cabo en una matriz de la presente descripción se describen en las patentes de EE. UU. Nos. 7,582,420; 6,890,741; 6,913,884 o 6,355,431 o las publicaciones de las solicitudes de patente de EE. UU. Nos. 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 o 2005/0181440 A1.

Varias aplicaciones para matrices de la presente descripción se han ejemplificado anteriormente en el contexto de la detección por conjuntos, en la que están presentes múltiples copias de un ácido nucleico objetivo en cada característica y se detectan juntas. En realizaciones alternativas, se puede detectar un único ácido nucleico, ya sea un ácido nucleico objetivo o un amplicón del mismo, en cada característica. Por ejemplo, un pozo que contiene gel (u otra característica cóncava) puede configurarse para contener una única molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos objetivo que se va a detectar. Se puede usar cualquiera de una variedad de técnicas de detección de una sola molécula, incluidas, por ejemplo, modificaciones de las técnicas de detección de conjuntos establecidas anteriormente para detectar los sitios con mayor resolución o usar etiquetas más sensibles. Otros ejemplos de métodos de detección de una sola molécula que se pueden usar se exponen en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0312529 A1; los documentos US2013165328; y US2013085073.

Se entenderá que un sustrato que contiene gel de la presente descripción, por ejemplo, que se ha producido mediante un método expuesto en esta memoria, no necesita usarse para un método de detección. Más bien, el sustrato estructurado se puede usar para almacenar una biblioteca de ácidos nucleicos. Por consiguiente, el sustrato estructurado puede almacenarse en un estado que conserva los ácidos nucleicos en el mismo. Por ejemplo, un sustrato que tiene pozos que contienen gel que están unidos a ácidos nucleicos puede almacenarse en un estado

desecado, en estado congelado (por ejemplo, en nitrógeno líquido), o en una solución protectora de los ácidos nucleicos. De forma alternativa o adicional, el sustrato estructurado se puede usar para replicar una biblioteca de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un sustrato que tiene pozos que contienen gel que están unidos a ácidos nucleicos se puede usar para crear amplicones replicados de uno o más de los pozos de la matriz.

5 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la presente invención.

Ejemplo I

Sustratos de múltiples pozos recubiertos con acrilamida libre de silano

10 Este ejemplo demuestra el recubrimiento de sustratos de nanopozo con acrilamida libre de silano (SFA), seguido de un injerto con cebadores de tiofosfato y realizando una hibridación de los cebadores injertados en gel con un oligonucleótido fluorescente complementario para confirmar el éxito del enfoque de funcionalización.

Los sustratos de un chip normalmente usados para la fabricación de BeadChips se obtuvieron a través de Illumina (San Diego, CA). Los chips estaban hechos de silicio o Zeonor (Zeon Corp., Tokio, Japón) con pozos de 0,5 μm dispuestos en un patrón hexagonal con un paso de 1,5 μm , pero los pozos no contenían perlas. Los chips se modelaron con almohadillas de gel como se muestra a continuación y se diagraman en la Fig. 1.

15 Los chips se encerraron en una cámara sellada con empaquetadura y el oxígeno se eliminó por desplazamiento con reactivos fluidos para la formación de SFA. SFA se polimerizó en los chips en la cámara. Los reactivos para la formación de SFA y las condiciones para la polimerización fueron como se describe en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1. La cámara sellada se usó para colocar la mezcla de polimerización en contacto directo con el chip y para asegurar la eliminación completa del aire, ya que la polimerización por radicales libres de SFA es un proceso sensible al aire. Después de la polimerización, los cebadores se injertaron en el polímero de SFA en la cámara sellada como se expone en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. No. 2011/0059865 A1 y a continuación. Se retiró una solución que contenía los cebadores a través de la superficie recubierta con polímero del BeadChip y la mezcla se incubó luego durante 1,25 h a 65 °C (todo el conjunto sellado se colocó en un horno grande).

25 Este enfoque produjo sustratos recubiertos uniformemente. En la Fig. 2, Panel A se muestra la imagen de una muestra. Para crear regiones poliméricas discretas, se eliminó el "exceso" de polímero situado entre los pozos en el sustrato mediante una técnica de pulido mecánico utilizando una suspensión de nanopartículas de óxido de aluminio (300 nm de diámetro) en agua desionizada. También se puede utilizar una suspensión de 10% en peso de partículas de sílice de 3 micras (Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Alemania). La superficie se depuró manualmente con la suspensión de nanopartículas utilizando un tejido óptico sin pelusa. Después de lavar para eliminar la suspensión y los residuos de polímero, se hibridó una solución de sondas marcadas con fluorescencia con el chip. Las imágenes capturadas utilizando un microscopio de fluorescencia mostraron que este enfoque era capaz de producir características poliméricas con regiones intersticiales limpias (Fig. 2, paneles B a C).

35 Estos resultados indicaron que las intensidades de fluorescencia en los pozos rellenos de gel fueron espacialmente discretas en contraste con la ausencia de señal de las regiones intersticiales. Los resultados también demostraron que el modelado del gel se puede lograr utilizando material de gel unido no covalentemente sobre un sustrato que tiene pozos nanofabricados.

Ejemplo II

Fabricación de un sustrato con nanopozos que contienen gel

40 Se pueden usar múltiples técnicas para fabricar matrices estructuradas que posteriormente se pueden cargar con material de gel.

El proceso puede comenzar con un sustrato/oblea en blanco y se introduce un patrón en el sustrato mediante técnicas de micro o nanofabricación. El material del sustrato/oblea puede ser de silicio convencional, vidrio, plástico, COC o cualquiera de una variedad de materiales que pueden estructurarse. Los ejemplos de técnicas para introducir el patrón en el sustrato incluyen la fotolitografía, la litografía por nanoimpresión, el grabado en relieve de las estructuras en un material a base de plástico/COC y el moldeo por inyección de un plástico o COC en un molde maestro que tiene las estructuras modeladas en él. Los enfoques basados en la fotolitografía generalmente implican el uso de una fotorresistencia que está modelada con un alineador paso a paso o máscara, expuesta a radiación que transfiere el patrón presente en una retícula/fotomáscara en la fotorresistencia, y luego se desarrolla la resistencia para producir una película estructurada (fotorresistencia) en la parte superior del sustrato. La resistencia estructurada es potencialmente el sustrato final que se puede usar para el subsiguiente recubrimiento de gel o el patrón en la resistencia se puede transferir al sustrato siguiendo con el procesamiento. Las siguientes etapas del proceso incluirán típicamente el grabado con iones reactivos (grabado basado en plasma) o un proceso de grabado en húmedo (químico). Si el patrón se transfiere al sustrato, la fotorresistencia modelada se elimina posteriormente para producir el sustrato modelado para el posterior recubrimiento con gel. Puede ser deseable usar una película de sacrificio de un material como cromo o titanio (un metal) debajo de la fotorresistencia, y primero transferir el patrón en la fotorresistencia

a la película de metal y luego usar esa película como una máscara dura mediante la cual el patrón se transfiere al sustrato. Tras la transferencia del patrón al sustrato, las películas se retiran y, por lo tanto, se consideran de sacrificio para el proceso de fabricación. Si se utiliza la litografía de nanoimpresión, la fotorresistencia impresa puede ser un material de sacrificio y, de manera similar, se puede utilizar como una herramienta intermedia para transferir la resistencia modelada al sustrato o se puede usar una variación de la resistencia de modo que la resistencia impresa sirva como entrada para una subsiguiente etapa de recubrimiento. Un ejemplo de una resistencia que se mantendría después del modelado sería un material basado en Sol-Gel.

En la Fig. 3 se muestra una representación esquemática de cómo se puede fabricar un sustrato estructurado y se describe a continuación. Las imágenes de los sustratos moldeados se muestran en varios niveles de ampliación en la Fig. 3B y en la Fig. 3C.

La creación de almohadillas de gel químicamente específicas en un sustrato de secuenciación/celda de flujo puede implicar una o más de las técnicas de nanofabricación expuestas anteriormente en este Ejemplo. El proceso puede opcionalmente incluir una o más etapas de procesamiento químico, como la silanización para permitir la unión posterior de un polímero en gel al sustrato a través del silano. Luego se utiliza el pulido químico/mecánico (CMP) para eliminar todo el polímero intersticial en la superficie del sustrato. El proceso de pulido eliminará el material de arriba hacia abajo y, dado que las características estructuradas en el sustrato se compensan de manera efectiva con respecto a las regiones intersticiales de la matriz, el pulido eliminará el polímero del intersticio antes de eliminar las características estructuradas. Si el proceso de pulido se detiene después del tiempo óptimo, las estructuras retendrán el recubrimiento del polímero y las regiones intersticiales quedarán vacías del polímero. El sustrato de la almohadilla de gel modelada se injerta luego con cebadores, los ácidos nucleicos objetivo se siembran en las almohadillas de gel y los ácidos nucleicos objetivo se usan como plantillas para la creación de agrupaciones de ácido nucleico en las almohadillas de gel.

Ejemplo III

Sustratos de múltiples pozos recubiertos con PAZAM

Este ejemplo muestra la fabricación de una matriz de pozos que contienen gel, la amplificación de agrupaciones de ácido nucleico en los pozos y la secuenciación de los ácidos nucleicos en las agrupaciones.

Los sustratos se fabricaron de la siguiente manera. Se fabricó un sustrato de nanopozo (400 nm de diámetro, paso de 1,5 μm , pozo de 300 nm de profundidad) utilizando litografía por nanoimpresión. Se depositó una monocapa/multicapa de amino silano (APTES o APTMS) sobre toda la superficie del sustrato utilizando deposición química de vapor. A continuación, se hizo reaccionar una solución salina 1x regulada con fosfato (pH 7,4) de éster N-hidroxisuccinimida de ácido acrílico (Aldrich PN 8060) a una concentración de 100 mM con la superficie de amino silano agregando 1 mL de la solución de acrilato de NHS a la superficie, cubriéndola con un cubreobjetos de vidrio delgado y permitiendo que la reacción se desarrolle durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se aplicó un polímero (PAZAM) a la superficie mediante recubrimiento por centrifugación de 500 μL de una solución de PAZAM al 2% en peso en agua sobre la superficie funcionalizada con acrilamida recién formada. PAZAM se sintetizó como se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 61/753.833. El calentamiento posterior del sustrato recubierto con PAZAM a 60 °C durante 1 hora dio como resultado un enlace covalente entre el polímero y la superficie. El polímero intersticial unido covalentemente se eliminó puliendo la superficie con 10% en peso de una suspensión de micropartículas de SiO_2 de 3 μm en agua. Se puede usar una superficie de Janeway (cloruro de acrililo con DIPEA en MeCN) en lugar de la superficie recubierta con amino silano en el procedimiento anterior.

El sustrato polimérico modelado se injertó luego con cebadores como se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 61/753.833. A continuación, se expusieron los complementos inversos marcados con colorante (Cy5) de los cebadores injertados a la superficie en una solución de regulador 1X PBS a una concentración de complemento de 20 μM , y luego se lavó la superficie con 50 mL de regulador 1PBS aplicado con una botella con atomizador. Se tomaron imágenes de los complementos marcados en el sustrato con un FLA 9500Typhoon Imager ajustado en el canal de escaneo de Cy5 y se usó un valor de PMT de 450. También se tomaron imágenes de los complementos etiquetados en el sustrato con un microscopio de alta resolución, que muestra el modelado o polímero/cebadores que no conservan polímeros/cebadores intersticiales (Fig. 4). El sustrato se sembró luego con ADN de phiX, y los grupos crecieron como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. No. 61/715.478.

Se secuenció una celda de flujo que contenía el sustrato que contenía agrupamientos en un HiSeq 2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA). Se empleó un algoritmo para extraer las ubicaciones de las agrupaciones de secuenciación modeladas (registro rígido), lo que produjo exitosamente mediciones de secuenciación de alta calidad (Fig. 5 y Fig. 6). Los resultados de la secuenciación mostraron que la ocupación frente a la clonalidad fue sorprendentemente más alta de lo esperado para una distribución estándar de Poisson. Específicamente, la medida de ocupación promedio frente a la clonalidad para el proceso de secuenciación, como lo indica la "x" en la Fig. 7, está por encima de los límites de la curva de Poisson y se acerca a la línea para la fracción clonal ideal).

El término "que comprende" está destinado aquí a ser abierto, lo que incluye no solo los elementos citados, sino que además abarca cualquier elemento adicional.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos proporcionados anteriormente, debe entenderse que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse de la invención. Por consiguiente, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz, que comprende
- 5 un soporte sólido que comprende una superficie, comprendiendo la superficie una pluralidad de pozos, los pozos recubiertos con un material de gel que se adapta a la forma del pozo donde se encuentra, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en la superficie, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad; y
- una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo en el material de gel, en donde el material de gel en cada uno de los pozos comprende una única especie de los ácidos nucleicos objetivo de la biblioteca.
- 10 2. La matriz de la reivindicación 1, en donde el volumen de cada uno de los pozos es a lo sumo de $1.000 \mu\text{m}^3$ o en donde el volumen del gel en cada uno de los pozos es a lo sumo de $1.000 \mu\text{m}^3$.
3. La matriz de la reivindicación 1 o 2, en donde la pluralidad de pozos forma una matriz que tiene un patrón repetitivo, y opcionalmente en donde los pozos en el patrón tienen un paso de no más de 5 micrómetros.
4. La matriz de la reivindicación 1 a 3, en donde el gel comprende un hidrogel, y opcionalmente en donde el gel comprende SFA o PAZAM.
- 15 5. La matriz de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el material de gel en cada uno de los pozos comprende una sola especie de los ácidos nucleicos objetivo en la biblioteca, y opcionalmente en donde múltiples copias de la única especie forman una población clonal de moléculas de ácido nucleico en cada uno de los pozos.
6. La matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la superficie comprende una densidad de al menos 1.000 de los pozos por mm^2 .
- 20 7. La matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el material de gel está unido covalentemente a la superficie de los pozos.
8. Un método para elaborar un sustrato que comprende
- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie plana, en donde la superficie plana está interrumpida por uno o más pozos y en donde los uno o más pozos están bordeados por una o más regiones intersticiales en la superficie plana;
- 25 (b) recubrir al menos una porción del soporte sólido con un material de gel que se ajustará a la forma del pozo donde reside, en donde la porción comprende al menos uno de los pozos y al menos una de las regiones intersticiales; y
- (c) pulir la superficie plana para eliminar el material de gel de al menos una región intersticial y mantener el material de gel en al menos un pozo.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde el volumen de cada uno de los pozos es a lo sumo de $1.000 \mu\text{m}^3$, o en donde el volumen del gel en cada uno de los pozos es a lo sumo de $1.000 \mu\text{m}^3$.
10. El método de la reivindicación 8, en donde el pulido comprende abrasión mecánica con una suspensión de perlas, o en donde el pulido comprende abrasión mecánica al limpiar o raspar la superficie del soporte sólido, o en donde el pulido comprende pulido químico.
- 35 11. Un método para elaborar una matriz, que comprende
- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende una superficie, comprendiendo la superficie una pluralidad de pozos, los pozos recubiertos con un material de gel que se adapta a la forma del pozo donde se encuentra, estando los pozos separados entre sí por regiones intersticiales en el superficie, la superficie se pule para eliminar el material de gel de las regiones intersticiales, segregando las regiones intersticiales el material de gel en cada uno de los pozos del material de gel en otros pozos de la pluralidad;
- 40 (b) suministrar una biblioteca de ácidos nucleicos objetivo a los pozos del soporte sólido para producir una matriz de pozos que tienen una única especie de ácido nucleico objetivo unida al material de gel en cada pozo, en donde diferentes pozos en la matriz comprenden diferentes especies de ácido nucleico objetivo de la biblioteca; y
- (c) amplificar los ácidos nucleicos objetivo unidos al material de gel en los pozos de la matriz para producir una población clonal de un ácido nucleico objetivo individual en cada uno de los pozos de la matriz.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde el suministro en la etapa (b) comprende proporcionar la biblioteca como una mezcla de los ácidos nucleicos objetivo en un fluido y poner en contacto el fluido con el soporte sólido, por lo que los ácidos nucleicos objetivo tienen acceso fluídico a los pozos y las regiones intersticiales.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la amplificación comprende la extensión de la polimerasa de al

menos una especie de cebador que está unida al material de gel en los pozos, y opcionalmente en donde la amplificación comprende la amplificación en puente utilizando al menos dos especies de cebador que están unidas al material del gel en los pozos.

14. Un método para detectar ácidos nucleicos, que comprende

- 5 (a) proporcionar la matriz de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
- (b) poner en contacto la matriz con al menos una sonda que se une a los ácidos nucleicos objetivo; y
- (c) detectar la matriz para distinguir los pozos que tienen una especie de ácido nucleico objetivo que se une a al menos una sonda.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde al menos una sonda comprende (i) al menos un ácido nucleico que es complementario a al menos una porción de al menos uno de los ácidos nucleicos objetivo, y opcionalmente en donde al menos una sonda comprende una etiqueta fluorescente que se detecta en la etapa (c), o (ii) una polimerasa y un nucleótido, y opcionalmente en donde la detección en la etapa (c) comprende detectar la incorporación del nucleótido en la sonda o en el ácido nucleico objetivo.

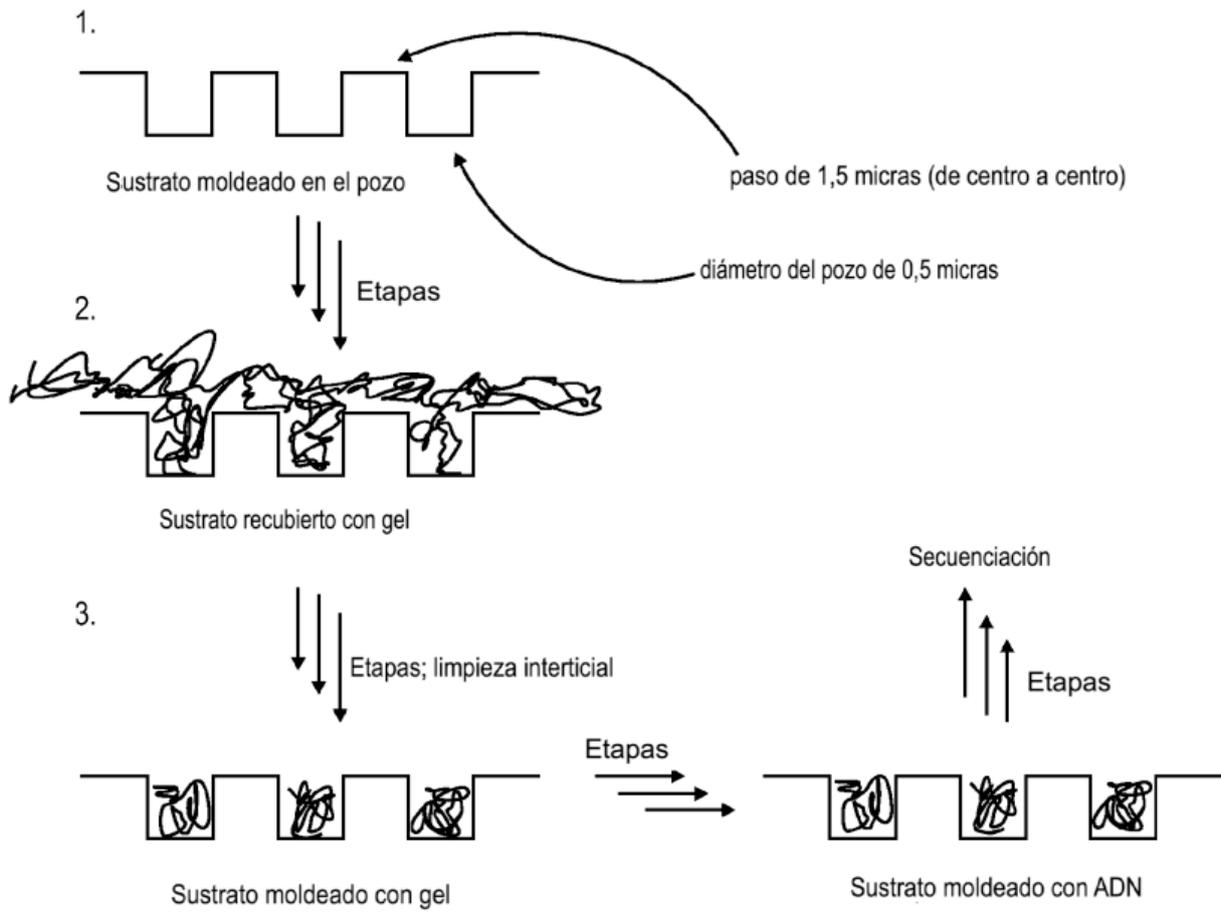


Fig. 1

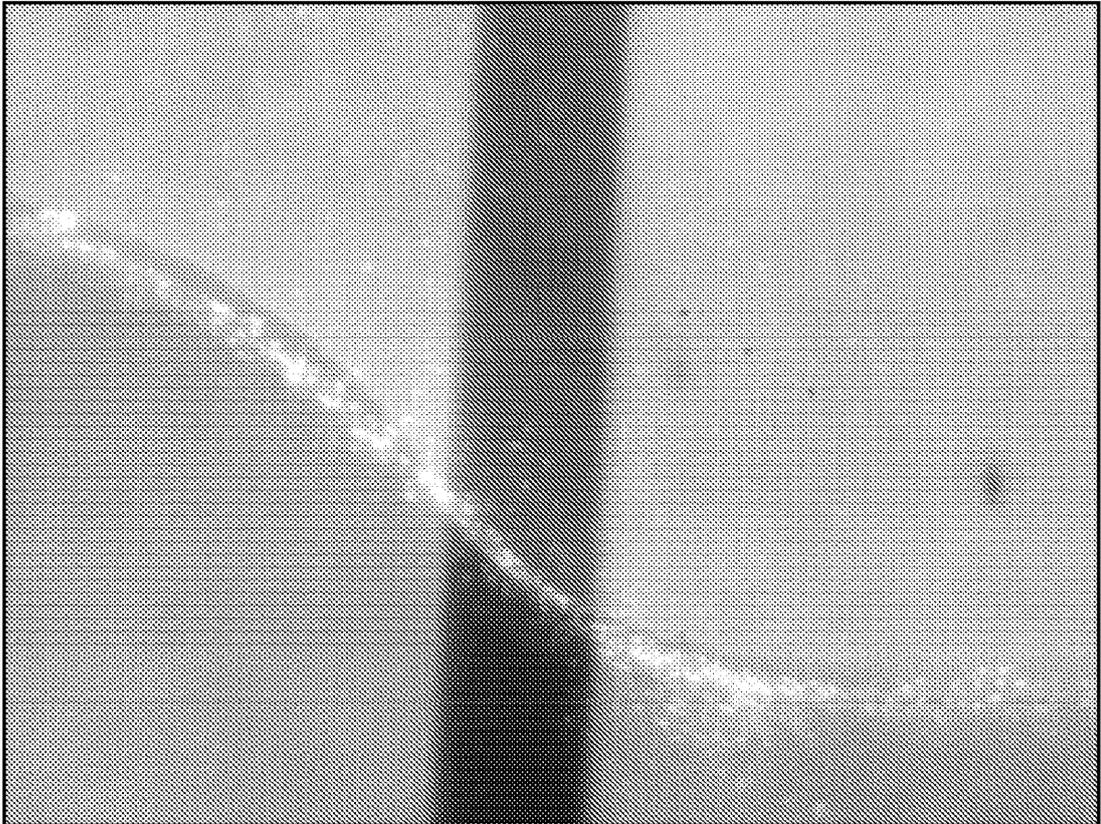


Fig. 2A

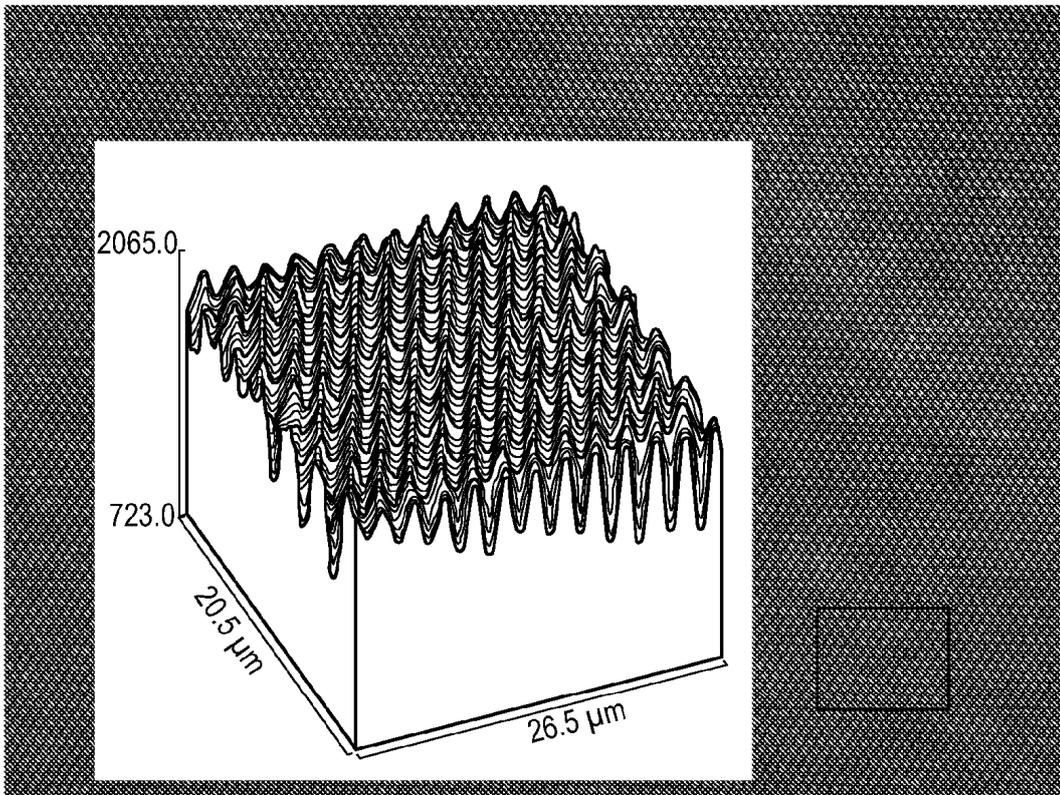


Fig. 2B

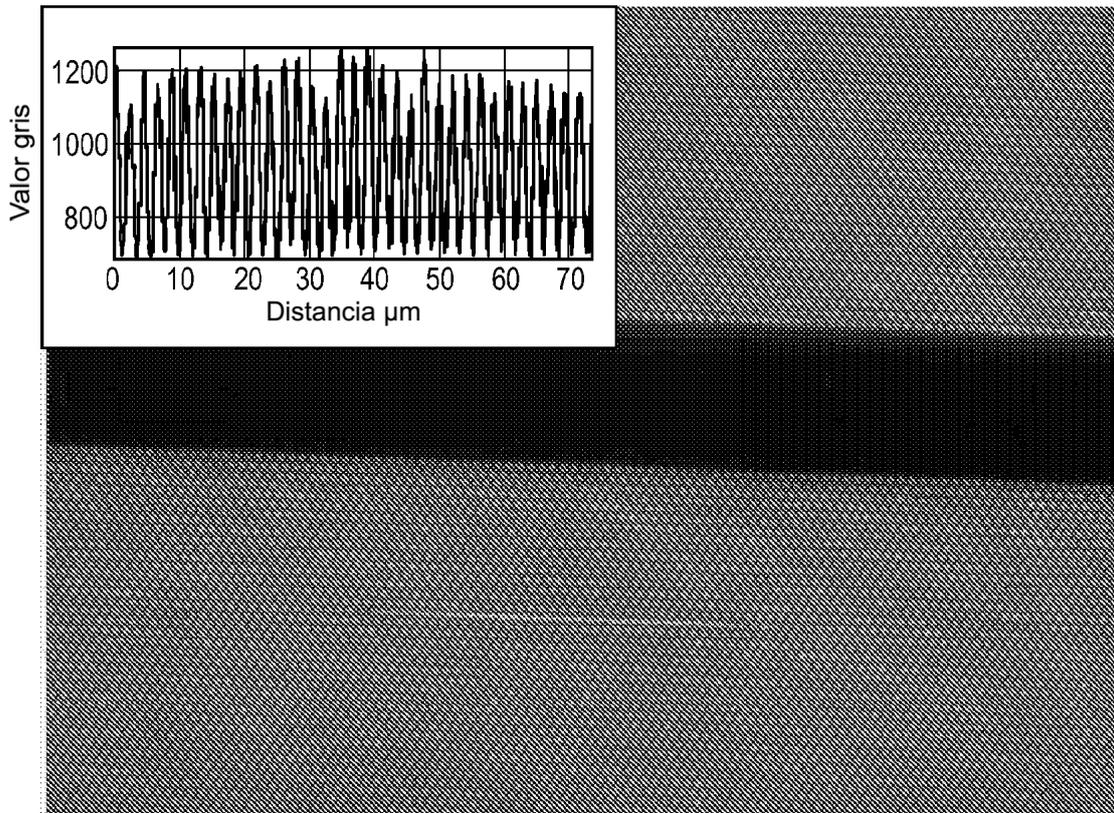


Fig. 2C

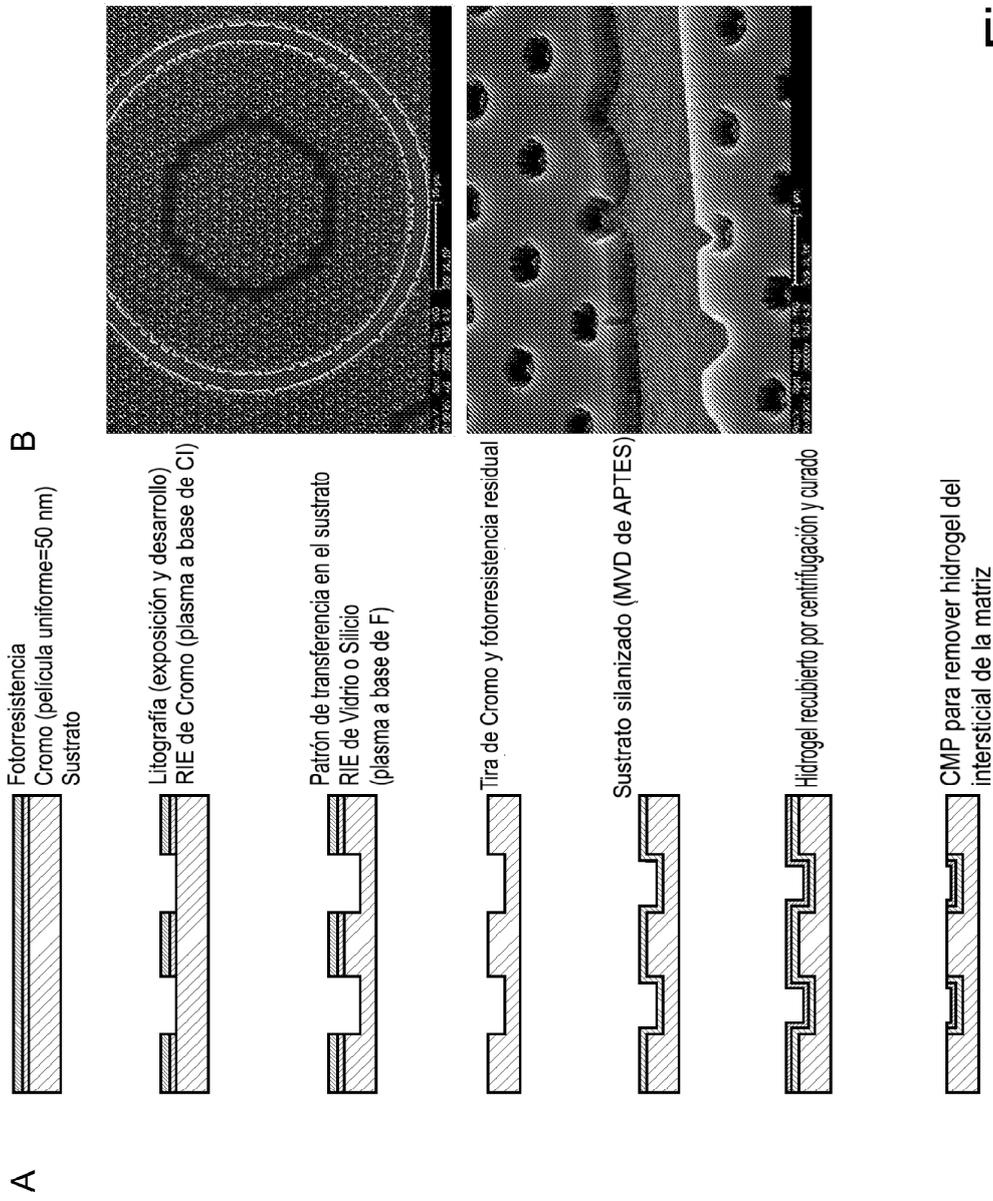


Fig. 3

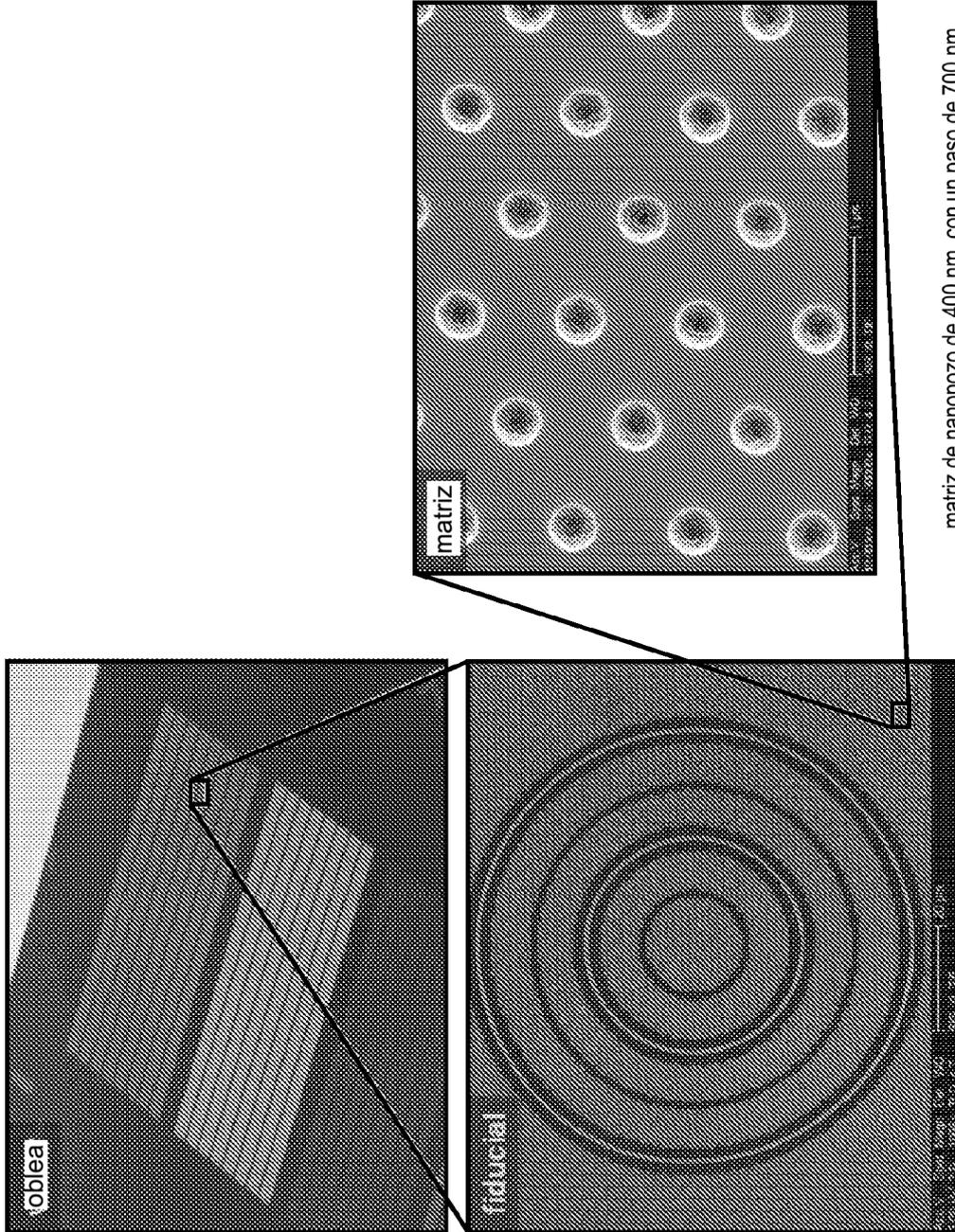
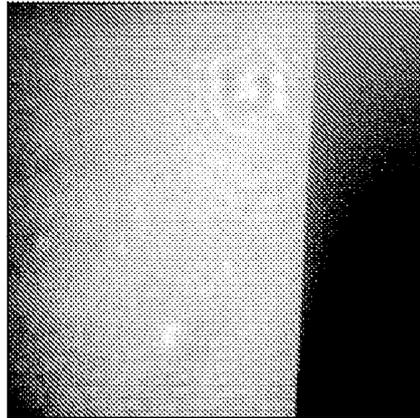
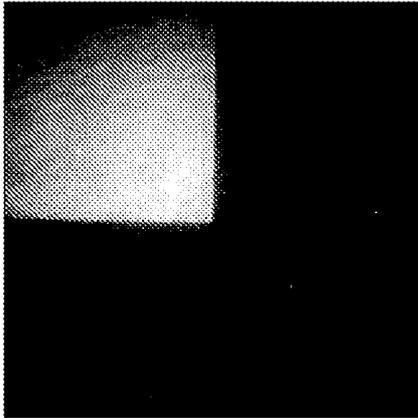
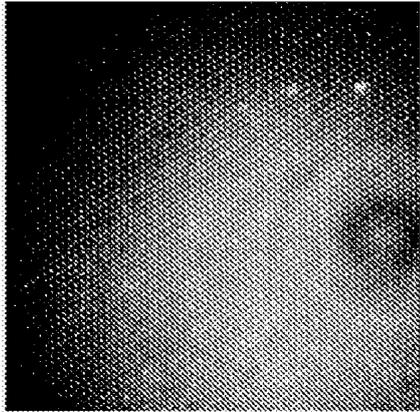
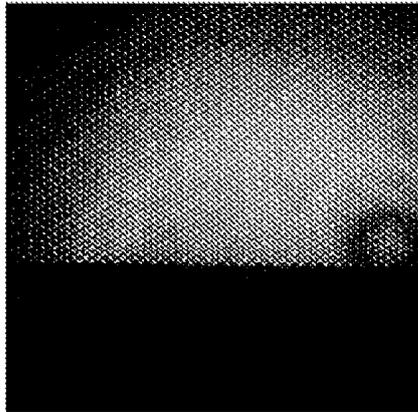


Fig. 3C



NILT5
paso de 750 nm
pozos de 550 nm



NILT5
paso de 1,5 μm
pozos de 550 nm

Fig. 4

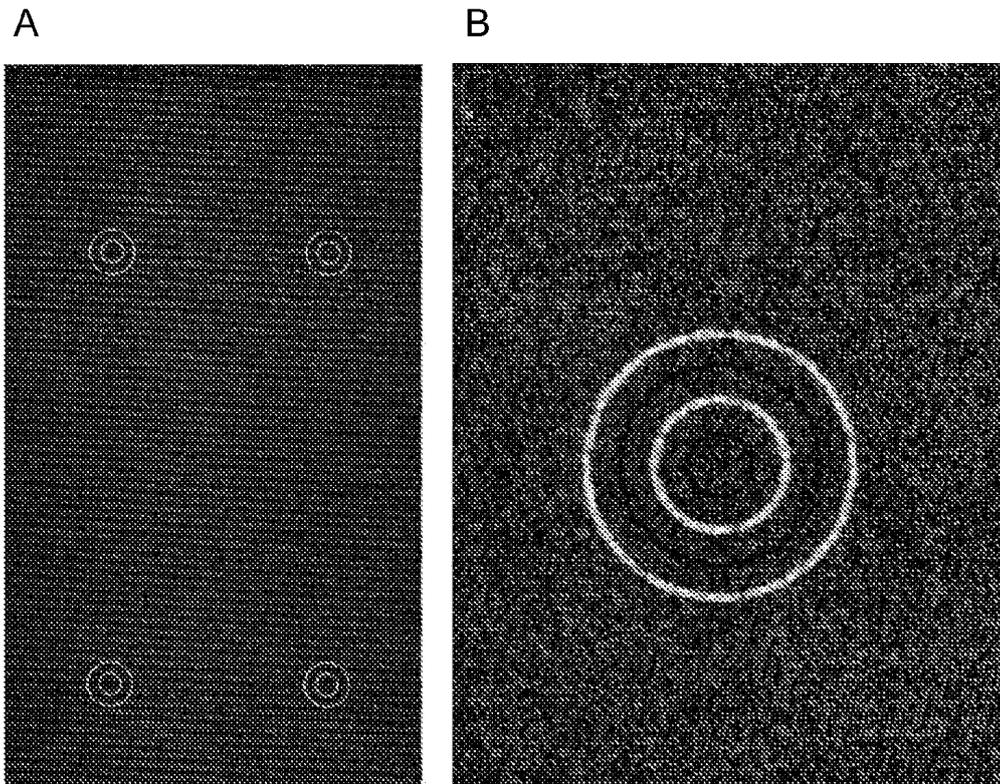


Fig. 5

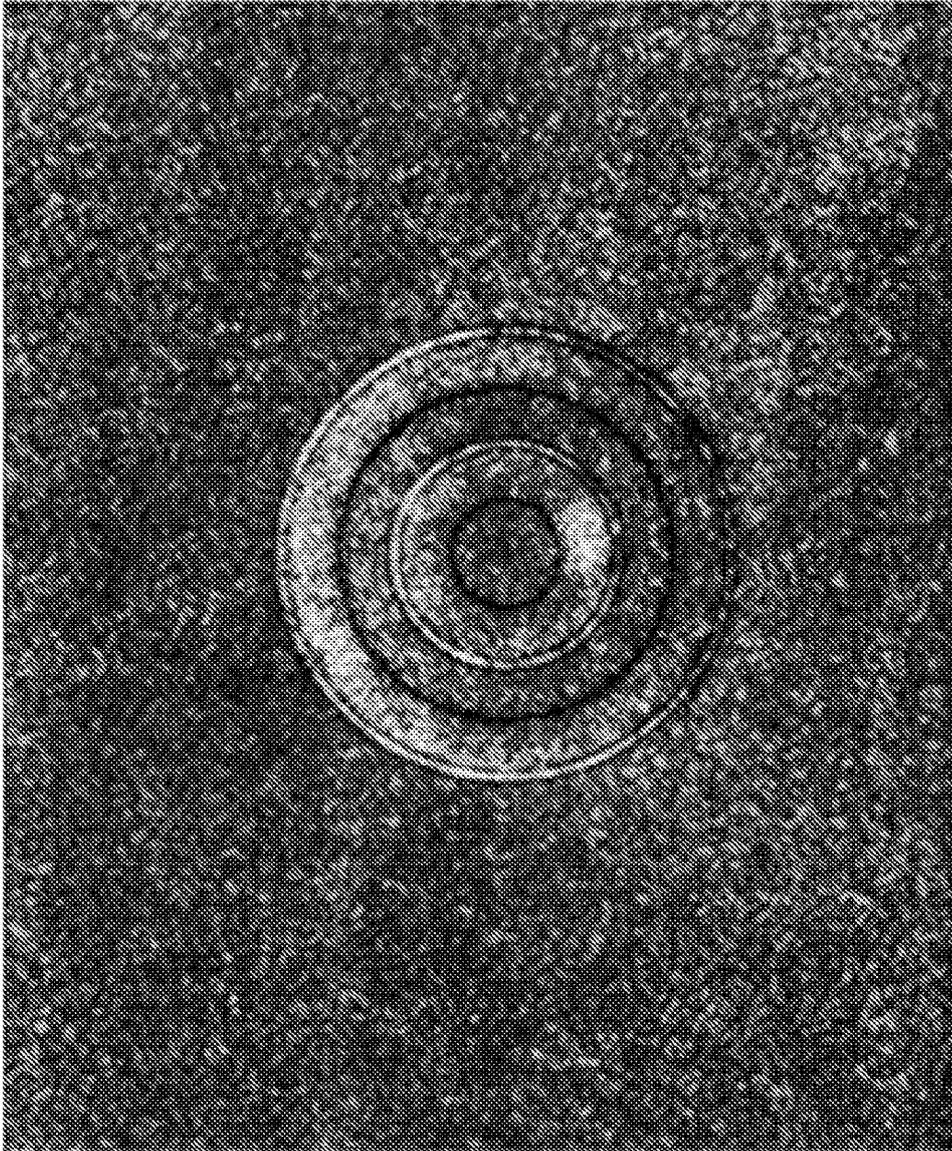


Fig. 6A

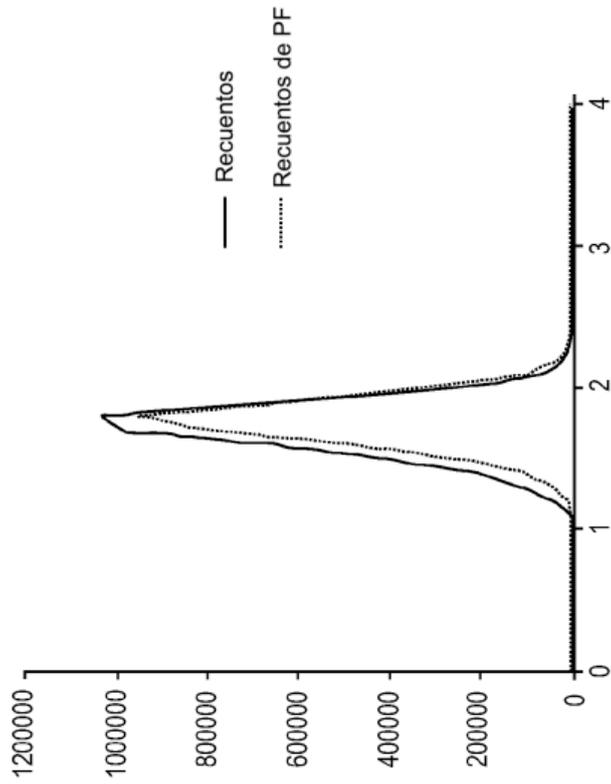


Fig. 6B

Carril	Bloque	Tasa de error	Densidad PF (K/mm2)	Densidad PF (K/mm2)	% R1 alineado	% Ajuste de fase R1	% Preajuste de fase R1	% PF	Fracción ocupada	Fracción clonal	Porcentaje PadHop
8	2113	0,112	1561,6	1349,1	94,3	0,195	0,265	86,4			
8	2105	0,146	1347,1	1121	98,7	0,263	0,433	83,2			
8	2107	0,119	1531,4	1306,8	98,8	0,197	0,312	85,3	0,7488	0,6419	0,0139

Fig. 6C

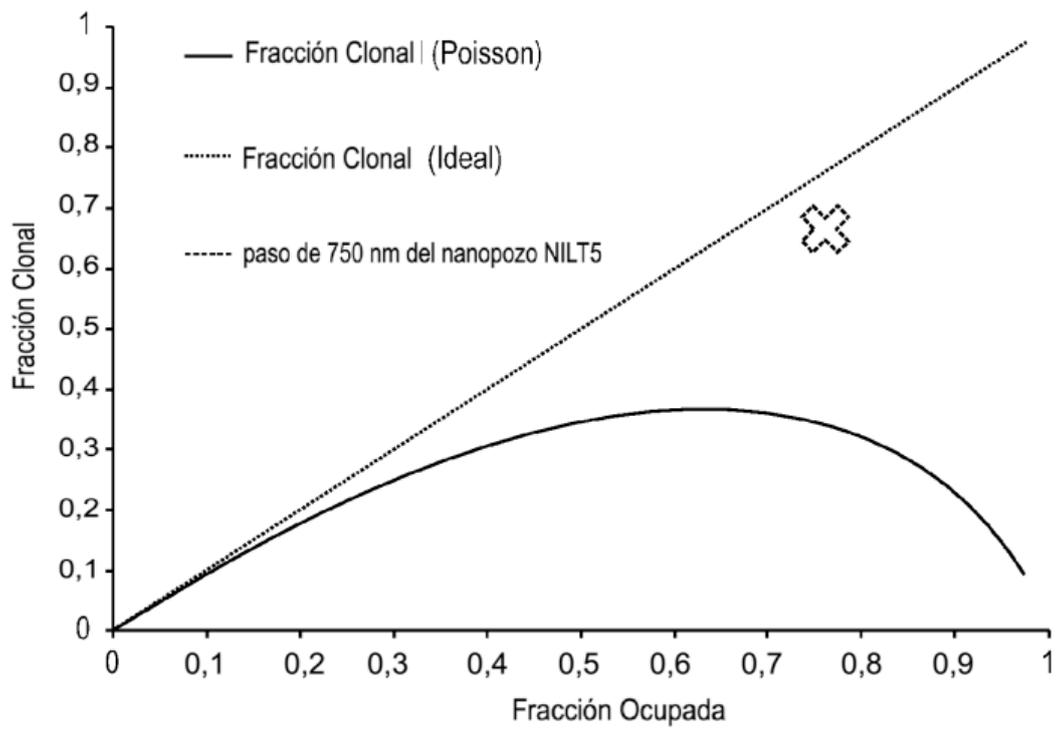


Fig. 7