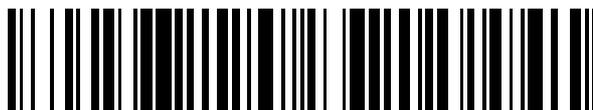


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 692**

51 Int. Cl.:

**C40B 60/14** (2006.01)

**C07K 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/6869** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2015 PCT/US2015/050376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2016 WO16044391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2015 E 15841893 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3194643**

54 Título: **Secuenciación por síntesis usando óptica de lectura por pulsos**

30 Prioridad:

**17.09.2014 US 201462051705 P**

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

**22.10.2020**

73 Titular/es:

**IBIS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
2251 Faraday Avenue Suite 150  
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**ESHOO, MARK W.;  
CLEMENS, JOHN M. y  
HAYDEN, MARK A.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 788 692 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

Secuenciación por síntesis usando óptica de lectura por pulsos

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan sistemas y métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos por síntesis en una pluralidad de pocillos usando nucleótidos de terminación de cadena marcados detectablemente con grupos de bloqueo fotolábiles y pulsos de luz de foto-escisión. En ciertas realizaciones, los sistemas y métodos proporcionan una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden un período de tiempo de desbloqueo inicial seguido de un período de luz de exploración, en el que por lo menos se produce uno de los siguientes en cada ciclo de desbloqueo-exploración: 1) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; 2) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos fotolábiles que forman parte de un cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; o 3) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms. Tales períodos de tiempo de desbloqueo más cortos ayudan a prevenir la adición de más de un nucleótido al cebador antes de la exploración (por ejemplo, se mejora la precisión).

## 20 ANTECEDENTES

En la secuenciación por síntesis con nucleótidos marcados detectablemente con grupos de bloqueo fotolábiles, el período de tiempo necesario para el desbloqueo completo es relativamente largo, mientras que el período de tiempo de incorporación de nucleótidos es relativamente rápido. Como resultado del tiempo de desbloqueo relativamente largo, pueden incorporarse nucleótidos adicionales al final de la secuencia del cebador antes de que puedan escanearse y detectarse. Por lo tanto, la precisión de la reacción de secuenciación puede verse comprometida.

## SUMARIO DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan sistemas y métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos por síntesis en una pluralidad de pocillos usando nucleótidos de terminación de cadena marcados detectablemente con grupos de bloqueo fotolábiles y pulsos de luz de foto-escisión. En ciertas realizaciones, los sistemas y métodos proporcionan una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden un período de tiempo de desbloqueo inicial seguido de un período de exploración de luz, en donde por lo menos se produce uno de los siguientes en cada ciclo de desbloqueo-exploración: 1) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; 2) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos fotolábiles que forman parte de un cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; o 3) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms. En algunas realizaciones tales períodos de tiempo de desbloqueo más cortos, ayudan a prevenir la adición de más de un nucleótido al cebador antes de la exploración (por ejemplo, se mejora la precisión).

En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente sistemas para fotoescindir y explorar análogos de nucleótidos que comprenden: a) un sustrato que comprende una pluralidad de pocillos que contienen cada uno, o están configurados para contener, una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado con la plantilla, y un primer análogo de nucleótido, en donde el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y b) un componente del sistema de luz que comprende: i) una fuente de luz en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos que está configurada para proporcionar: A) entrada de luz de fotoescisión que escinde el grupo de bloqueo fotolábil cuando es parte del cebador; y B) luz de entrada de exploración que proporciona una señal óptica desde la primera fracción detectable después de que se añada el primer análogo de nucleótido al cebador por la polimerasa; y ii) un componente de control de luz que activa la fuente de luz de tal manera que se generan una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración, en donde cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que se pasa por lo menos una parte de la entrada de luz de fotoescisión en la pluralidad de pocillos, y un período de tiempo de exploración siguiente en el que por lo menos parte de la entrada de luz de exploración pasa a la pluralidad de pocillos, y en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: A) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; B) el período de tiempo de desbloqueo es solo lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; y C) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms.

En ciertas realizaciones, en la presente se proporcionan sistemas que comprenden un componente de luz, en el que el componente de luz está configurado para interactuar ópticamente con un componente de sustrato, en donde el componente de sustrato comprende una pluralidad de pocillos, en donde cada pocillo contiene, o está

configurado para contener, una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado con la plantilla y un primer análogo de nucleótido, en donde el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y en donde el componente de luz comprende: a) una fuente de luz en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos que proporciona: A) entrada de luz de fotoescisión que escinde el grupo de bloqueo fotolábil cuando es parte del cebador; y B) luz de entrada de exploración que produce una señal óptica desde la primera fracción detectable después de que la polimerasa añade el primer análogo de nucleótido al cebador; y b) un componente de control de luz que activa la fuente de luz de tal manera que se genera una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración, en donde cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que por lo menos parte de la entrada de luz de fotoescisión se pasa a la pluralidad de pozos, y un período de tiempo de exploración siguiente en el que por lo menos parte de la entrada de luz de exploración pasa a la pluralidad de pocillos, y en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: i) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; ii) el período de tiempo de desbloqueo es solo lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; y iii) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms.

En realizaciones particulares, en la presente se proporcionan métodos para fotoescindir y detectar análogos de nucleótidos usando un sistema que comprende: i) un sustrato que comprende una pluralidad de pocillos, en donde cada pocillo contiene una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado a la plantilla, y un primer análogo de nucleótido, en donde el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y ii) un componente del sistema de luz que comprende: A) una fuente de luz en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos, en donde la fuente de luz proporciona: I) entrada de luz de fotoescisión; y II) entrada de luz de exploración; B) un componente de control de luz que activa la fuente de luz de tal manera que se genera una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden: I) un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que por lo menos una parte de la entrada de luz de fotoescisión se pasa a los pocillos, y II) un período de tiempo de exploración siguiente en el que por lo menos una parte de la entrada de luz de exploración se pasa a los pocillos, iii) un componente detector en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos de detección óptica, en donde el método comprende; y b) activar el componente de control de luz de tal manera que el componente de fuente de luz proporciona una pluralidad de los ciclos de desbloqueo-exploración que desbloquean los grupos de bloqueo fotolábiles, cuando los grupos de bloqueo fotolábiles son parte del cebador, en por lo menos algunos de los pocillos y genera una señal óptica de la fracción detectable en la pluralidad de pocillos después de que el primer análogo de nucleótido sea añadido al cebador por la polimerasa, en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: A) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; B) el período de tiempo de desbloqueo es solo lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; y C) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms; y c) detectar la señal óptica de la fracción detectable generada durante cada uno de la pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración en la pluralidad de pocillos con el componente detector.

En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente sistemas que comprenden un componente de luz, en donde el componente de luz está configurado para interactuar ópticamente con un componente de sustrato, en donde el componente de sustrato comprende una pluralidad de pocillos (por ejemplo pocillos de detección óptica), en donde cada uno de los pocillos está dimensionado para proporcionar una guía de onda interna (por ejemplo, una guía de onda de modo cero), y/o está acoplado ópticamente con una guía de onda externa (por ejemplo, una guía de onda planar), en donde cada pocillo contiene, o está configurado para contener, una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado a la plantilla, y un primer análogo de nucleótido, en donde el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de cadena, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y en donde el componente de luz comprende: a) una fuente de luz en comunicación óptica con las guías de onda internas y/o externas, en donde la fuente de luz está configurada para proporcionar: A) entrada de luz de fotoescisión que, cuando pasa a las guías de onda internas o externas, genera una primera onda electromagnética (por ejemplo, onda evanescente) en los pocillos de detección óptica que es capaz de escindir los grupos de bloqueo fotolábiles cuando forman parte del cebador; y B) luz de entrada de exploración que, cuando se pasa a las guías de onda internas o externas, genera una segunda onda electromagnética (por ejemplo, onda evanescente) en los pocillos de detección óptica que es capaz de producir una señal óptica de la fracción detectable después de que el primer análogo de nucleótido se añada al cebador; y b) un componente de control de luz configurado para activar la fuente de luz de tal manera que se genere una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración, en donde cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que la entrada de luz de fotoescisión se pasa a las guías de onda internas y/o externas, y un período de tiempo de exploración siguiente donde la entrada de

luz de exploración se pasa a las guías de onda internas y/o externas, y en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: A) el periodo de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; B) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos de detección óptica; y C) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms.

En ciertas realizaciones, se proporcionan en la presente sistemas para sistemas para fotoescindir y explorar análogos de nucleótidos que comprenden: a) un sustrato que comprenden una pluralidad de pocillos de detección óptica, en donde cada uno de los pocillos de detección óptica está dimensionado para proporcionar una guía de onda interna y/o está acoplado ópticamente con una guía de onda externa en donde cada pocillo contiene, o está configurado para contener, una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado a la plantilla, y un primer análogo de nucleótido, en donde el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de cadena, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y b) un componente del sistema de luz que comprende: i) una fuente de luz en comunicación óptica con las guías de onda interna y/o externa, en donde la fuente de luz está configurada para proporcionar: A) entrada de luz de fotoescisión que, cuando se pasa a las guías de onda interna o externa, genera una primera onda electromagnética (por ejemplo, onda evanescente) en los pocillos de detección óptica que es capaz de escindir el grupo de bloqueo fotolábil cuando es parte del cebador; y B) luz de entrada de exploración que, cuando se pasa a las guías de ondas interna o externa, genera una segunda onda electromagnética (por ejemplo, onda evanescente) en los pocillos de detección óptica que es capaz de producir una señal óptica desde la primera fracción detectable después de que el primer análogo de nucleótido sea añadido al cebador por la polimerasa; y ii) un componente de control de luz configurado para activar la fuente de luz de tal manera que se genere una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración, en donde cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que la entrada de luz de fotoescisión se pasa a las guías de onda interna y/o externa, y un período de tiempo de exploración siguiente donde la entrada de luz de exploración se pasa a las guías de onda interna y/o externa, y en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: A) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; B) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos de detección óptica; y C) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms.

En realizaciones particulares, en la presente se proporcionan métodos para fotoescindir y detectar análogos de nucleótidos usando un sistema que comprende: i) un sustrato que comprende una pluralidad de pocillos de detección óptica, en donde cada uno de los pocillos de detección óptica está dimensionado para proporcionar una guía de ondas interna y/o es ópticamente acoplado a una guía de onda externa, en donde cada pocillo de detección óptica contiene una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado con la plantilla y un primer análogo de nucleótido, en el que el cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena, y en donde el primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de cadena; y ii) un componente del sistema de luz que comprende: A) una fuente de luz en comunicación óptica con las guías de onda interna y/o externa, en donde la fuente de luz proporciona: I) entrada de luz de fotoescisión que genera una primera onda electromagnética en los pocillos de detección óptica cuando pasa a las guías de onda interna o externa; y II) luz de entrada de exploración que genera una segunda onda electromagnética en los pocillos de detección óptica cuando se pasa a las guías de onda interna o externa; B) un componente de control de luz configurado para activar la fuente de luz de tal manera que se genere una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden: I) un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que la entrada de luz de fotoescisión se pasa a las guías de onda interna y/o externa, y II) un período de tiempo de exploración siguiente en el que la entrada de luz de exploración se pasa a las guías de onda interna y/o externa, iii) un componente detector en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos de detección óptica, en donde el método comprende: activar el componente de control de luz de tal manera que el componente de fuente de luz proporcione una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que desbloquean los grupos de bloqueo fotolábiles, cuando son parte del cebador, en por lo menos algunos de los pocillos de detección óptica y genere una señal óptica de la fracción detectable en la pluralidad de pocillos de detección óptica después de que el primer análogo de nucleótido sea añadido al cebador por la polimerasa, en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada uno de los ciclos de desbloqueo-exploración: A) el periodo de tiempo de desbloqueo es más corto que el periodo de tiempo de exploración; B) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos de detección óptica; y C) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms; y c) detectar la señal óptica de la fracción detectable generada durante cada uno de la pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración en la pluralidad de pocillos de detección óptica con el componente detector.

En realizaciones particulares, la detección proporciona información de secuencia para por lo menos una parte del ácido nucleico plantilla en por lo menos algunos de la pluralidad de pocillos (por ejemplo, la identidad de 5 bases... 10 bases... o más; o la secuencia completa de la plantilla). En ciertas realizaciones, el componente de control de luz comprende una interfaz de usuario, y en donde la activación es realizada por un usuario a través de la interfaz de usuario. En realizaciones adicionales, la interfaz de usuario comprende un teclado de ordenador y/o un ratón de ordenador. En realizaciones particulares, los métodos se realizan sin ningún paso de lavado (por ejemplo, mezcla de reacción única en pocillo durante la secuencia completa por reacción de síntesis).

En algunas realizaciones, los sistemas comprenden además c) un componente detector en comunicación óptica con la pluralidad de pocillos que es capaz de detectar la señal óptica de la pluralidad de pocillos. En ciertas realizaciones, el sistema comprende además un filtro, donde dicha señal óptica pasa a través de dicho filtro antes de ser detectado por dicho detector. En ciertas realizaciones, el componente de control de luz comprende un procesador informático y un programa informático incorporado dentro del procesador informático, en donde el programa informático controla la fuente de luz de tal manera que se genera la pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración.

En realizaciones particulares, el sustrato está compuesto de un material seleccionado del grupo que consiste de: vidrio transparente, plástico transparente, óxido de silicio-titanio, óxido de titanio, óxido de tántalo, óxido de niobio, óxido de hafnio, óxido de aluminio, óxido de circonio, nitruro de silicio, nitruro de aluminio, nitruro de titanio, policarbonato (PC), PMMA o Su8. En otras realizaciones, la pluralidad de pocillos comprende por lo menos 5 pocillos (por ejemplo, por lo menos 5... 25... 100... 250... 500... 1000... 2000... 4000... 8000... 50.000... o más).

En realizaciones particulares, la pluralidad de pocillos está dimensionada para proporcionar una guía de ondas interna (por ejemplo, una guía de ondas interna en el fondo de dichos pocillos). En ciertas realizaciones, cada uno de la pluralidad de pocillos comprende una guía de ondas de modo cero. En realizaciones particulares, los sistemas comprenden además una o una pluralidad de guías de ondas externas (por ejemplo, una guía de ondas externa para cada uno de la pluralidad de pocillos de detección óptica). En realizaciones particulares, la pluralidad de pocillos tiene un volumen entre 200 nanolitros y 10 zeptolitros. En realizaciones adicionales, la pluralidad de pocillos está acoplada ópticamente a una guía de ondas externa. En realizaciones adicionales, cada uno de los pocillos contiene la mezcla de reacción.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico plantilla en cada uno de la pluralidad de pocillos es parte de una biblioteca de secuenciación (por ejemplo, biblioteca de secuenciación genómica humana). En realizaciones adicionales, el grupo de bloqueo fotolábil que es parte del cebador es el mismo o diferente de el del grupo de bloqueo fotolábil que es parte del primer análogo de nucleótido. En otras realizaciones, la mezcla de reacción comprende además un segundo análogo de nucleótido (por ejemplo, un segundo tipo de análogo de nucleótidos) que comprende un grupo de bloqueo fotolábil y una segunda fracción detectable diferente de la primera fracción detectable, en donde el primer y segundo análogos de nucleótidos tienen bases diferentes (por ejemplo, seleccionadas de guanina, citosina, adenina y timina). En otras realizaciones, la polimerasa comprende una polimerasa Phi29 o mutante de la misma.

En realizaciones adicionales, la primera fracción detectable comprende un colorante fluorescente. En realizaciones adicionales, el grupo de bloqueo fotolábil se selecciona del grupo que consiste de: un grupo de bloqueo o-nitrobenzilo, nitroveratrilo, 1-pirrenilmetilo, 6-nitroveratriloxicarbonilo, dimetildimetoxibenciloxicarbonilo, 2-nitrobenziloxicarbonilo, 5-bromo-7-nitroindolinilo, O-hidroxi-alfa-metil-cinamoilo, metilo, 6-nitroveratriloxicarbonilo, metil-6-nitropiperoniloxicarbonilo, y 2-oximetileno antraquinona, dimetoxibenciloxi carbonilo, 5-bromo-7-nitroindolinilo, o-hidroxi-alfa-metil cinamoilo, y 2-oximetileno antraquinona.

En realizaciones adicionales, la fuente de luz comprende un primer componente generador de luz configurado para generar la entrada de luz de fotoescisión, y un segundo componente generador de luz configurado para generar la entrada de luz de exploración. En otras realizaciones, la fuente de luz comprende un componente generador de luz configurado para generar alternativamente tanto la entrada de luz de fotoescisión como la entrada de luz de exploración. En realizaciones adicionales, la entrada de luz de fotoescisión tiene una longitud de onda entre 300 nm y 2000 nm (por ejemplo, 300 nm... 500 nm... 800 nm... 1200 nm... 1500 nm... y 2000 nm). En otras realizaciones, la entrada de luz de exploración tiene una longitud de onda entre 230 nm y 1000 nm (por ejemplo, 230 nm... 450... 680... 850... y 1000 nm). En realizaciones adicionales, la entrada de luz de fotoescisión tiene una longitud de onda diferente que la longitud de onda de entrada de luz de exploración.

En ciertas realizaciones, la guía de ondas externa comprende una o más guías de onda planas. En realizaciones adicionales, la pluralidad de pocillos está acoplada ópticamente a una guía de ondas externa, en donde la guía de ondas externa es una guía de ondas en comunicación óptica con toda la pluralidad de pocillos, o en donde la guía de ondas externa es una pluralidad de guías de onda, una para cada una de la pluralidad de pocillos.

En realizaciones adicionales, la primera y/o la segunda onda electromagnética comprende una onda evanescente o una onda de campo itinerante. En realizaciones adicionales, el componente de control de luz

comprende una interfaz de usuario que permite a un usuario activar la fuente de luz. En realizaciones adicionales, la pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración es por lo menos cinco ciclos de desbloqueo-exploración (por ejemplo, por lo menos 5... 10... 15... 25... 100... 1000 o más). En realizaciones adicionales, el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración. En realizaciones adicionales, el período de tiempo de desbloqueo es un 5% más corto que el período de tiempo de exploración (por ejemplo, un 5%... 15%... 25%... 50%... 68%... 75%... 90%... 95%... o 99% más corto).

En realizaciones particulares, el período de tiempo de desbloqueo es solo lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en menos de toda la pluralidad de pocillos. En realizaciones adicionales, el período de tiempo de desbloqueo es solo lo suficientemente largo como para desbloquear los grupos de bloqueo fotolábiles que son parte del cebador en aproximadamente el 7-12 por ciento, o aproximadamente el 12-25%, o aproximadamente el 25-55% de la pluralidad de pocillos. En ciertas realizaciones, el período de tiempo de desbloqueo es entre 15 y 150 ms (por ejemplo, 15... 25... 50... 75... 100... 125... y 150 ms) y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms (por ejemplo, por lo menos 200 ms... 500 ms... 750 ms... 1 segundo... 1,5 segundos... 2 segundos... 5 segundos... 10 segundos... o más).

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el DT50 (tiempo requerido para desbloquear el 50% de las moléculas) para varios análogos de dNTP de Lasergen.

La Figura 2 muestra una curva de deterioro para una base bloqueada ((S)-t-butil-5-metoxi-2-nitrobencil dNTP) con una  $t_{1/2}$  de 750 ms.

La Figura 3 muestra, en base a la curva en la Figura 2, un tiempo de desprotección de 4,6 segundos requerido para desproteger el 98,5% de los dNTP.

La Figura 4 muestra que un pulso de luz rápido de 100 ms, por ejemplo, podría usarse luego para eliminar el problema de la adición de bases espurias.

La Figura 5 muestra que, dado que la tasa de extensión de la ADN polimerasa estándar en una superficie es de aproximadamente 5 bases/seg, se esperaría que la nueva base incorporada después del pulso de 100 ms sea relativamente rápida.

La Figura 6 muestra que la cinética de desprotección puede derivarse de la curva de deterioro estándar, dando como resultado la relación de desprotección mostrada en esta figura.

La Figura 7 muestra tres ciclos estroboscópicos, usando  $10^6$  moléculas en el modelo de expansión binomial descrito en el Ejemplo 1 a continuación.

Las Figuras 8a-i modelan 35 ciclos estroboscópicos que comienzan con  $10^6$  moléculas objetivo en una superficie como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 8a modela el ciclo 0, donde hay  $10^6$  moléculas en la superficie esperando a ser desbloqueadas. En el ciclo 1 (mostrado en la Figura 8b.), Se desprotegerá y extenderá el 8,8% de las  $10^6$  moléculas en la superficie (barra más oscura/azul), mientras que el 91,2% permanecerá bloqueado (barra más clara). La Figura 8c muestra 5 ciclos, La Figura 8d muestra 10 ciclos, La Figura 8e muestra 15 ciclos, y la Figura 8f muestra 20 ciclos. La Figura 8f muestra que está comenzando a aparecer una distribución normal. Como se muestra en la Figura 8g (25 ciclos), la curva de distribución se mueve lentamente hacia la derecha, mientras que la distribución en sí disminuye lentamente y se extiende más, con cada ciclo sucesivo. La Figura 8h muestra la distribución después de 30 ciclos. Como se muestra en la Figura 8i (35 ciclos), la distribución normal continúa disminuyendo y extendiéndose, al igual que la distribución de Poisson en un número de copia alto. Los 35 ciclos en la Figura 8i representan aproximadamente 3 minutos de tiempo de ejecución de secuenciación.

La Figura 9 muestra los resultados de extender el número de ciclos a 400 ciclos (todavía usando 100 ms de pulsos estroboscópicos de luz de desbloqueo), donde cada curva representa la distribución después de 10 ciclos estroboscópicos.

La Figura 10 muestra los resultados de extender el número de ciclo a 400 ciclos usando pulsos estroboscópicos de 50 ms, donde el 4,4% de las bases fotolábiles disponibles están desbloqueadas.

La Figura 11 muestra la distribución esperada si el 50% de las moléculas se desbloquean durante el pulso de 100 ms (en comparación con el 8,8%). Cada curva representa la distribución después de 10 ciclos estroboscópicos.

La Figura 12 muestra un modelo matemático para detectar homopolímeros mediante pulsos cortos de luz desprotectora.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se proporcionan sistemas y métodos para la secuenciación de ácidos nucleicos por síntesis en una pluralidad de pocillos que usan nucleótidos de terminación de cadena marcados detectablemente con grupos de bloqueo fotolábiles y pulsos de luz de fotoescisión. En ciertas realizaciones, los sistemas y métodos proporcionan una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden un período de tiempo de desbloqueo inicial seguido de un período de luz de exploración, en donde se produce por lo menos uno de los siguientes en cada ciclo de desbloqueo-exploración: 1) el período de tiempo de desbloqueo es más corto que el período de tiempo de exploración; 2) el período de tiempo de desbloqueo solo es lo suficientemente largo como para desbloquear los

grupos fotolábiles que forman parte de un cebador en menos de la totalidad de la pluralidad de pocillos; o 3) el período de tiempo de desbloqueo es de entre 25 y 150 ms y el tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms. Tales periodos de tiempo de desbloqueo más cortos ayudan a prevenir la adición de más de un nucleótido al cebador antes de la exploración (por ejemplo, se mejora la precisión).

5 La presente descripción no se limita al tipo de enfoque de secuenciación que se usa con los nucleótidos bloqueados fotolábiles y los ciclos de desbloqueo-exploración proporcionados en la presente. En ciertas realizaciones, se emplean métodos de secuenciación por síntesis. Los métodos de secuenciación ejemplares se detallan más adelante. En ciertas realizaciones, los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente se usan con metodologías de secuenciación que emplean guías de onda de modo cero (por ejemplo, como las producidas por Pacific Biosciences). En realizaciones ejemplares, se usa un enfoque de secuenciación por síntesis que usa una guía de onda de modo cero ZMWG y un nucleótido fotodesbloqueable para permitir una secuenciación de fluido única por proceso de síntesis. El ZMWG se usa, por ejemplo, tanto para detectar el nucleótido marcado detectablemente (por ejemplo, fluorescentemente) en el sitio aceptor de una polimerasa como para desbloquear selectivamente este nucleótido sin desbloquear los nucleótidos en el tampón de reacción que están fuera del campo de iluminación de los ZMWG. Tal enfoque permite la secuenciación de moléculas individuales por síntesis. El desafío es que los dominios de tiempo para el desbloqueo (relativamente lento) y la incorporación de nucleótidos (relativamente rápida) pueden no ser compatibles para una secuenciación precisa ya que pueden incorporarse nucleótidos adicionales durante el paso de desbloqueo relativamente más largo.

20 La presente descripción supera tales problemas con tiempo y precisión. Por ejemplo, los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente dividen el tiempo de desbloqueo en pulsos seguidos de lecturas. Por ejemplo, si lleva 5 segundos desbloquear eficientemente el 99% de los nucleótidos en la polimerasa y 200ms incorporar un nucleótido, entonces un pulso (con luz de fotoescisión) durante un breve período de tiempo, por ejemplo 50ms, y luego leer la base (usando luz de exploración y un detector). De esta manera, se detectan cambios en la secuencia de nucleótidos y el tiempo de desbloqueo es, por ejemplo, significativamente más corto que el tiempo de incorporación. Además, en ciertas realizaciones, se detectan las moléculas que todavía están esperando aceptar el siguiente nucleótido como moléculas sin un nucleótido marcado para permitir la secuenciación precisa de secuencias homopoliméricas. A este respecto, los sistemas y métodos descritos en la presente permiten la secuenciación de moléculas individuales de fluido único (por ejemplo, no se requiere lavado) mediante síntesis cuando no son compatibles los dominios de tiempo para el desbloqueo y la incorporación de nucleótidos.

35 Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción no se limita a ninguna tecnología de secuenciación particular que pueda emplear nucleótidos bloqueados fotolábiles y los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente. En ciertas realizaciones, la secuenciación por métodos de síntesis emplea guías de onda (por ejemplo, guías de onda planas, de modo cero, etc.). En ciertas realizaciones, tales métodos se describen en las siguientes publicaciones: Patente de Estados Unidos 7.476.504; Patente de Estados Unidos 8.747.751; Publicación de Patente 20110306143; y Publicación de Patente 20120156100.

40 De nuevo, la presente descripción no se limita a ninguna tecnología de secuenciación particular que pueda emplear nucleótidos bloqueados fotolábiles y los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente. Un sistema de secuenciación de moléculas individuales en tiempo real que se emplea es el desarrollado por Pacific Biosciences que emplea guías de onda de modo cero (ZMW), y se describe en Voelkerding et al., *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean et al., *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; Patente de Estados Unidos N° 7.170.050; Patente de Estados Unidos 7.302.146; Patente de Estados Unidos 7.313.308; Patente de Estados Unidos 7.476.503. En general, tales métodos utilizan pocillos de reacción de 50-100 nm de diámetro y abarcan un volumen de reacción de aproximadamente 20 zeptolitros ( $10 \times 10^{-21}$ ). Las reacciones de secuenciación se realizan usando una plantilla inmovilizada, ADN polimerasa phi29 modificada y altas concentraciones locales de dNTP marcados fluorescentemente. Las altas concentraciones locales y las condiciones de reacción continua permiten capturar los eventos de incorporación en tiempo real mediante detección de la señal de flúor usando excitación láser, una guía de ondas ópticas y una cámara CCD. Con esta tecnología, la secuenciación de ADN se realiza generalmente en chips SMRT, cada uno conteniendo miles de guías de onda de modo cero (ZMW). Una ZMW es un orificio/pocillo, de decenas de nanómetros de diámetro, fabricado en una película de metal de 100 nm depositada sobre un sustrato de dióxido de silicio. Cada ZMW se vuelve una cámara de visualización nanofotónica que proporciona un volumen de detección de solo 20 zeptolitros (10-21 litros). A este volumen, la actividad de una molécula individual se detecta entre un fondo de miles de nucleótidos marcados. La ZMW proporciona una ventana para observar la ADN polimerasa a medida que realiza la secuenciación por síntesis. Dentro de cada cámara, una única molécula de ADN polimerasa se une a la superficie inferior de manera que permanece permanentemente dentro del volumen de detección. Los nucleótidos fosforilados (se bloquearían con grupos de bloqueo fotolábiles para los sistemas y métodos descritos en la presente), cada tipo marcado con un fluoróforo de diferente color, se introducen luego en la solución de reacción a altas concentraciones que promueven la velocidad, precisión y procesividad de enzimas. Debido al pequeño tamaño de la ZMW, incluso a estas altas concentraciones biológicamente relevantes, el volumen de detección es ocupado por nucleótidos solo durante una pequeña fracción del tiempo. Adicionalmente, las visitas al volumen de detección son rápidas, durando solo unos pocos microsegundos, debido a la distancia muy pequeña que tiene la difusión para transportar los nucleótidos. El resultado es un fondo muy bajo.

Otros procesos y sistemas que pueden adaptarse para emplear nucleótidos bloqueados fotolábiles y los ciclos de desbloqueo-exploración proporcionados en la presente se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 7.405.281, titulada " Fluorescentnucleotide analogs and uses therefor"; 7.315.019, titulada " Arrays of optical confinements and uses thereof 7.313.308, titulada " Optical analysis of molecules"; 7.302.146, titulada "Apparatus and method for analysis of molecules", y 7.170.050, titulada "Apparatus and methods for optical analysis of molecules"; Las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 20080212960, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20080206764, titulada "Flowcell system for single molecule detection", 20080199932, titulada "Active surface coupled polymerases", 20080199874, titulada "CONTROLLABLE STRAND SCISSION OF MINI CIRCLE DNA", 20080176769, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", 20080176241, titulada "Mitigation of photodamage in analytical reactions", 20080165346, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20080160531, titulada "Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same", 20080157005, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20080153100, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", 20080153095, titulada "CHARGE SWITCH NUCLEOTIDES", 20080152281, titulada "Substrates, systems and methods for analyzing materials", 20080152280, titulada "Substrates, systems and methods for analyzing materials", 20080145278, titulada "Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same", 20080128627, titulada "SUBSTRATES, SYSTEMS AND METHODS FOR ANALYZING MATERIALS", 20080108082, titulada "Polymerase enzymes and reagents for enhanced nucleic acid sequencing", 20080095488, titulada "SUBSTRATES FOR PERFORMING ANALYTICAL REACTIONS", 20080080059, titulada "MODULAR OPTICAL COMPONENTS AND SYSTEMS INCORPORATING SAME", 20080050747, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing and using same", 20080032301, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", 20080030628, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20080009007, titulada "CONTROLLED INITIATION OF PRIMER EXTENSION", 20070238679, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", 20070231804, titulada "Methods, systems and compositions for monitoring enzyme activity and applications thereof, 20070206187, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20070196846, titulada "Polymerases for nucleotide analogue incorporation", 20070188750, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", 20070161017, titulada "MITIGATION OF PHOTODAMAGE IN ANALYTICAL REACTIONS", 20070141598, titulada "Nucleotide Compositions and Uses Thereof, 20070134128, titulada "Uniform surfaces for hybrid material substrate and methods for making and using same", 20070128133, titulada "Mitigation of photodamage in analytical reactions", 20070077564, titulada "Reactive surfaces, substrates and methods of producing same", 20070072196, titulada "Fluorescent nucleotide analogs and uses therefore", y 20070036511, titulada "Methods and systems for monitoring multiple optical signals from a single source", y Korfach et al. (2008) "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures" Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105(4): 11761181.

En la técnica se conocen otras metodologías de secuenciación que pueden adaptarse para emplear los nucleótidos bloqueados fotolábiles y los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente, incluyendo las metodologías de secuenciación basadas en fluorescencia (ver, por ejemplo, Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, 1, Cold Spring Harbor, N.Y.). En algunas realizaciones, se utilizan técnicas de secuenciación automatizadas entendidas en esa técnica. En algunas realizaciones, la secuenciación del ADN se logra mediante la extensión de oligonucleótidos paralela (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.750.341 de Macevicz et al. y la Patente de Estados Unidos N° 6.306.597 de Macevicz et al.). Ejemplos adicionales de técnicas de secuenciación incluyen la tecnología de polonio de Church (Mitra et al., 2003, Analytical Biochemistry 320, 55-65; Shendure et al., 2005 Science 309, 1728-1732; Patente de Estados Unidos N° 6.432.360, Patente de Estados Unidos N° 6.485.944, Patente de Estados Unidos N° 6.511.803, la tecnología de pirosecuenciación de picotítulos 454 (Margulies et al., 2005 Nature 437, 376-380; US 20050130173, la tecnología de adición de bases individuales Solexa (Bennett et al., 2005, Pharmacogenomics, 6, 373-382; Patente de Estados Unidos N° 6.787.308; Patente de Estados Unidos N° 6.833.246, la tecnología de secuenciación de firma masivamente paralela Lynx (Brenner et al. (2000). Nat. Biotechnol. 18: 630-634; Patente de Estados Unidos N° 5,695,934; Patente de Estados Unidos N° 5.714.330 y la tecnología de colonias de PCR Adessi (Adessi et al. (2000). Nucleic Acid Res. 28, E87; WO 00018957.

Otra metodología de secuenciación que puede adaptarse para emplear los nucleótidos fotolábiles bloqueados y los ciclos de desbloqueo-exploración descritos en la presente es la plataforma Solexa/Illumina. En la plataforma Solexa/Illumina (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; Patente de Estados Unidos N° 6.833.246; Patente de Estados Unidos N° 7.115.400; Patente de Estados Unidos N° 6.969.488, los datos de secuenciación se producen en forma de lecturas de menor longitud. En este método, el ADN fragmentado de cadena sencilla se repara en los extremos para generar extremos romos 5' fosforilados, seguido de la adición mediada de Klenow de una base A individual en el extremo 3' de los fragmentos. La adición A facilita la adición de oligonucleótidos adaptadores colgantes en T, que posteriormente se usan para

capturar las moléculas adaptadoras de plantilla en la superficie de una célula de flujo que está sembrada con anclajes de oligonucleótidos. El anclaje se usa como un cebador de PCR, pero debido a la longitud de la plantilla y su proximidad a otros oligonucleótidos de anclaje cercanos, la extensión por PCR resulta en el "arqueamiento" de la molécula para hibridar con un oligonucleótido de anclaje adyacente para formar una estructura de puente en la superficie de la célula de flujo. Estos giros de ADN están desnaturalizados y escindidos. Las cadenas delanteras se secuencian luego con terminadores de colorante reversibles. La secuencia de nucleótidos incorporados se determina mediante la detección de fluorescencia posterior a la incorporación, eliminando cada flúor y bloque antes del siguiente ciclo de adición de dNTP. La longitud de la lectura de secuencia varía de 36 nucleótidos a más de 50 nucleótidos, con una producción total que supera el billón de pares de nucleótidos por ejecución analítica.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Tiempo de desprotección de nucleótidos bloqueados

La generación más reciente de los análogos protegidos con dNTP de Lasergen tiene un DT50 de aproximadamente 750 ms (tiempo requerido para desbloqueo del 50% de las moléculas). El DT50 para tres análogos de dNTP de Lasergen se muestra en la Figura 1. Un  $t_{1/2}$  de 750 ms da la curva de deterioro en la solución mostrada en la Figura 2. En base a esta curva, se requiere un tiempo de desprotección de 4,6 segundos para desproteger el 98,5% de los dNTP (como se muestra en la Figura 3) Esto es necesario para cada ciclo usando el enfoque de "lavado" estándar, donde los nucleótidos no incorporados se eliminan antes de la desprotección. Como se muestra en la Figura 4, se usa un pulso de luz rápido de 100 ms, por ejemplo, para eliminar el problema de la adición de bases espurias. Por lo tanto, un pulso de luz rápido, seguido de un tiempo de lectura más largo (para moléculas individuales) generalmente limita la extensión de bases a una sola base, aumentando de este modo la precisión de la secuencia.

Dado que la tasa de extensión de la ADN polimerasa estándar en una superficie es de aproximadamente 5 bases/seg, la nueva base incorporada después del pulso de 100 ms es relativamente rápida, como se muestra en la secuencia de tiempo en la Figura 5. La Figura 5 usa un tiempo de detección arbitrario de 5 segundos solo con propósitos de demostración. Bajo este escenario, la cinética de la desprotección se deriva de la curva de deterioro estándar. Esto da como resultado la relación de desprotección mostrada en la Figura 6.

El mecanismo de adición de bases, para este ejemplo, puede modelarse usando la ecuación de expansión binomial:

$$(X + Y)^N$$

En este caso, X = fracción de moléculas que quedan bloqueadas después de un pulso de luz de 100 ms; Y = fracción de moléculas desprotegidas después de un pulso de luz de 100 ms; y N = número de ciclo. Para el presente ejemplo, X = 0,9121; e Y = 0,0879. Esta relación permanece constante para cada ciclo estroboscópico ya que un total de  $10^6$  moléculas o tienen una base existente o una nueva base después de cada fase de detección. En la Figura 7 se muestran tres ciclos estroboscópicos, usando  $10^6$  moléculas en el modelo de expansión binomial.

En el presente ejemplo hipotético, los destellos estroboscópicos se entremezclan con un paso de detección de 5 segundos. No se produjeron múltiples destellos estroboscópicos en serie (antes de una lectura de detección) ya que esto no daría ninguna ventaja durante un largo tiempo de desprotección. En general se supone para este ejemplo, que llega suficiente luz a la superficie para imitar la cinética de desprotección en solución. En este ejemplo, cada pulso de luz desprotegerá el 8,8% de las moléculas en la superficie (de la curva de deterioro). La adición de nucleótidos se produce rápidamente después de la desprotección.

La Figura 8(a-i) modela 35 ciclos estroboscópicos que comienzan con  $10^6$  moléculas objetivo en la superficie. La Figura 8a modela el ciclo 0, donde hay  $10^6$  moléculas en la superficie esperando a ser desbloqueadas. En el ciclo 1 (mostrado en la Figura 8b), el 8,8% de las  $10^6$  moléculas en la superficie están desprotegidas y extendidas (barra más oscura/azul), mientras que el 91,2% permanece bloqueada (barra más clara). La Figura 8c muestra 5 ciclos, la Figura 8d muestra 10 ciclos, la Figura 8e muestra 15 ciclos, y la Figura 8f muestra 20 ciclos. La Figura 8f muestra que está empezando a aparecer una distribución normal. Como se muestra en la Figura 8g (25 ciclos), la curva de distribución se mueve lentamente hacia la derecha, mientras que la distribución en sí disminuye lentamente y se extiende más con cada ciclo sucesivo. La Figura 8h muestra la distribución después de 30 ciclos. Como se muestra en la Figura 8i (35 ciclos), la distribución normal continúa disminuyendo y extendiéndose, de manera muy parecida a la distribución de Poisson en un número de copias alto. Los 35 ciclos en la Figura 8i representan aproximadamente 3 minutos de tiempo de ejecución de secuenciación. La Figura 9 muestra los

resultados de extender el número de ciclo a 400 ciclos (todavía usando 100 ms de pulsos estroboscópicos de luz de desbloqueo), donde cada curva representa la distribución después de 10 ciclos estroboscópicos. La Figura 10 muestra los resultados de extender el número de ciclos a 400 ciclos usando 50 ms de pulsos estroboscópicos, donde el 4,4% de las bases fotolábiles disponibles están desbloqueadas. La Figura 11 muestra la distribución esperada si el 50% de las moléculas se desbloquean durante el pulso de 100 ms (en oposición al 8,8%). Cada curva representa la distribución después de 10 ciclos estroboscópicos.

El uso de pulsos cortos de luz desprotectora se usa beneficiosamente para detectar homopolímeros. La capacidad de detectar homopolímeros depende de la capacidad de detectar pequeños cambios en el muestreo estadístico. Los homopolímeros reducen el número de cambios de bases durante cada paso de detección. En la Figura 12 se muestra un modelo matemático para detectar homopolímeros.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema para fotoescindir y explorar análogos de nucleótidos que comprende:

- 5 a) un sustrato que comprende una pluralidad de pocillos que contienen cada uno, o están configurados para contener, una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado con dicha plantilla y un primer análogo de nucleótido, en donde dicho cebador comprende un análogo de nucleótido terminal 3' con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena, y
- 10 en donde dicho primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena;
- y
- b) un componente de sistema de luz que comprende:
- 15 i) una fuente de luz en comunicación óptica con dicha pluralidad de pocillos que proporciona: A) entrada de luz de fotoescisión que escinde dicho grupo de bloqueo fotolábil cuando es parte de dicho cebador; y B) luz de entrada de exploración que produce una señal óptica de dicha primera fracción detectable después de que dicho primer análogo de nucleótido sea añadido a dicho cebador por dicha polimerasa; y
- 20 ii) un componente de control de luz que activa dicha fuente de luz de tal manera que se genera una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración, en donde cada uno de dichos ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que por lo menos una parte de dicha entrada de luz de fotoescisión se pasa a dicha pluralidad de pocillos, y un período de tiempo de exploración siguiente en el que por lo menos parte de dicha entrada de luz de exploración se pasa a dicha pluralidad de pocillos, y
- 25 en donde dicho período de tiempo de desbloqueo está entre 25 y 150 ms y dicho tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms.

2. Un método para fotoescindir y detectar análogos de nucleótidos usando un sistema que comprende:

- 30 i) un sustrato que comprende una pluralidad de pocillos, en donde cada pocillo contiene una mezcla de reacción que comprende un ácido nucleico plantilla, una polimerasa, un cebador hibridado con dicha plantilla y un primer análogo de nucleótido, en donde dicho cebador comprende un análogo de nucleótido 3' terminal con un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena, y
- 35 en donde dicho primer análogo de nucleótido comprende: i) una primera fracción detectable, y ii) un grupo de bloqueo fotolábil que termina la extensión de la cadena; y
- ii) un componente del sistema de luz que comprende:
- 40 A) una fuente de luz en comunicación óptica con dicha pluralidad de pocillos, en donde dicha fuente de luz proporciona: I) entrada de luz de fotoescisión; y II) entrada de luz de exploración;
- B) un componente de control de luz configurado para activar dicha fuente de luz de tal manera que se genere una pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración que comprenden: I) un período de tiempo de desbloqueo inicial en el que por lo menos una parte de dicha entrada de luz de fotoescisión se pasa a dichos pocillos, y II) un período de tiempo de exploración siguiente en el que por lo menos una parte de
- 45 dicha entrada de luz de exploración se pasa a dichos pocillos,
- iii) un componente detector en comunicación óptica con dicha pluralidad de pocillos de detección óptica,

en donde el método comprende:

- 50 a) activar dicho componente de control de luz de tal manera que dicho componente de fuente de luz proporcione una pluralidad de dichos ciclos de desbloqueo-exploración que desbloquean dichos grupos de bloqueo fotolábiles, cuando dichos grupos fotolábiles son parte de dicho cebador, en por lo menos algunos de dichos pocillos y generan una señal óptica de dicha fracción detectable en dicha pluralidad de pocillos después de que dicho primer análogo de nucleótido sea añadido a dicho cebador por dicha polimerasa, en donde dicho período de tiempo de desbloqueo está entre 25 y 150 ms y dicho tiempo de exploración es de por lo menos 200 ms; y
- 55 b) detectar dicha señal óptica de la fracción detectable generada durante cada uno de dicha pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración en dicha pluralidad de pocillos con dicho componente detector.

3. El sistema de la reivindicación 1, o el método de la reivindicación 2 en donde:

- 60 los pocillos son pocillos de detección óptica, en donde cada uno de dichos pocillos de detección óptica está dimensionado para proporcionar una guía de ondas interna y/o está acoplado ópticamente a una guía de ondas externa,
- 65

- 5 en donde la fuente de luz está en comunicación óptica con dichas guías de onda interna y/o externa, en donde dicha fuente de luz proporciona: A) entrada de luz de fotoescisión que, cuando se pasa a dichas guías de onda interna o externa, genera una primera onda electromagnética en dichos pocillos de detección óptica que es capaz de escindir dicho grupo de bloqueo fotolábil cuando es parte de dicho cebador; y B) exploración de la luz de entrada que, cuando se pasa a dichas guías de ondas interna o externa, genera una segunda onda electromagnética en dichos pocillos de detección óptica que es capaz de producir una señal óptica de dicha primera fracción detectable después de que dicho primer análogo de nucleótido sea añadido a dicho cebador por dicha polimerasa; y
- 10 en donde cada uno de dichos ciclos de desbloqueo-exploración comprende un período de tiempo de desbloqueo inicial donde dicha entrada de luz de fotoescisión se pasa a dichas guías de onda interna y/o externa, y un período de tiempo de exploración siguiente donde dicha entrada de luz de exploración se pasa a dichas guías de ondas interna y/o externa.
- 15 **4.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, que comprende además un componente detector en comunicación óptica con dicha pluralidad de pocillos que detecta dicha señal óptica de dicha pluralidad de pocillos.
- 20 **5.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicho componente de control de luz comprende un procesador informático y un programa informático incorporado en dicho procesador informático, en donde dicho programa informático está configurado para controlar dicha fuente de luz de tal manera que se genere dicha pluralidad de ciclos de desbloqueo-exploración.
- 25 **6.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicho sustrato está compuesto de un material seleccionado del grupo que consiste de: vidrio transparente, plástico transparente, óxido de silicio-titanio, óxido de titanio, óxido de tantalio, óxido de niobio, óxido de hafnio, óxido de aluminio, óxido de circonio, nitruro de silicio, nitruro de aluminio, nitruro de titanio, policarbonato (PC), PMMA o Su8.
- 30 **7.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:
- 35 a) dicha pluralidad de pocillos comprende por lo menos 25 pocillos de detección óptica, en donde dicha pluralidad de pocillos comprende por lo menos 250 pocillos de detección óptica;
- b) dicha pluralidad de pocillos de detección óptica están dimensionados para proporcionar una guía de ondas interna, en donde opcionalmente cada uno de dichos pocillos comprende una guía de ondas de modo cero;
- c) dichos pocillos tienen un volumen entre 200 nanolitros y 10 zeptolitros; y/o d) cada uno de dichos pocillos contiene dicha mezcla de reacción.
- 40 **8.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que comprende además una guía de ondas externa, en donde opcionalmente dichos pocillos están acoplados ópticamente a dicha guía de ondas externa, en donde además opcionalmente dicha guía de ondas externa es o una guía de ondas en comunicación óptica con todos de dicha pluralidad de pocillos, o en donde dicha guía de ondas externa es una pluralidad de guías de ondas, una para cada una de dicha pluralidad de pocillos.
- 45 **9.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde dicho ácido nucleico plantilla en cada uno de dicha pluralidad de pocillos de detección óptica es parte de una biblioteca de secuenciación.
- 50 **10.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:
- 55 a) dicho grupo de bloqueo fotolábil que es parte de dicho cebador es igual o diferente del grupo de bloqueo fotolábil que es parte de dicho primer análogo de nucleótido; y/o
- b) dicho grupo de bloqueo fotolábil se selecciona del grupo que consiste de: un grupo de bloqueo de o-nitrobencilo, nitroveratril, 1-pirenilmétilo, 6-nitroveratriloxicarbonilo, dimetildimetoxibenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, 5-bromo-7-nitroindolinilo, O-hidroxi-alfa-metil-cinamoilo, metilo, 6-nitroveratriloxicarbonilo, metil-6-nitropiperoniloxicarbonilo, y 2-oximetileno antraquinona, dimetoxibenciloxi carbonilo, 5-bromo-7-nitroindolinilo, o-hidroxi-alfa-metil cinamoilo, y 2-oximetileno antraquinona.
- 60 **11.** El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:
- 65 a) dicha mezcla de reacción comprende además un segundo análogo de nucleótido que comprende un grupo de bloqueo fotolábil y una segunda fracción detectable diferente de dicha primera fracción detectable, en donde dichos primer y segundo análogos de nucleótido tienen bases diferentes;
- b) dicha polimerasa comprende una polimerasa Phi29 o mutante de la misma; y/o

c) dicha primera fracción detectable comprende un colorante fluorescente.

12. El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:

- 5
- a) dicha fuente de luz comprende un primer componente generador de luz configurado para generar dicha entrada de luz de fotoescisión, y un segundo componente generador de luz configurado para generar dicha entrada de luz de exploración; o dicha fuente de luz comprende un componente generador de luz que genera dicha entrada de luz de fotoescisión y dicha entrada de luz de exploración; y/o
  - 10 b) dicha entrada de luz de fotoescisión tiene una longitud de onda entre 300 nm y 2000 nm;
  - c) dicha entrada de luz de exploración tiene una longitud de onda entre 230 nm y 1000 nm;
  - d) dicha entrada de luz de fotoescisión tiene una longitud de onda diferente a la de dicha longitud de onda de entrada de luz de exploración; y/o
  - 15 e) dicho componente de control de luz comprende una interfaz de usuario que permite a un usuario activar dicha fuente de luz.

13. El sistema o método de la reivindicación 3, en donde:

- 20
- a) dicha guía de onda externa comprende una guía de onda plana; y/o
  - b) dichas primera y/o segunda ondas electromagnéticas comprenden una onda evanescente o una onda de campo itinerante.

14. El sistema de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o el método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:

- 25
- a) dicha pluralidad de ciclos de escaneo de desbloqueo es de por lo menos cinco ciclos de exploración de desbloqueo;
  - b) dicho período de tiempo de desbloqueo es un 25% más corto que dicho período de tiempo de exploración, en donde opcionalmente dicho período de tiempo de desbloqueo es un 75% más corto que dicho período de tiempo de exploración;
  - 30 y/o
  - c) dicho tiempo de exploración es de por lo menos 2 segundos.

15. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde:

- 35
- a) dicha detección proporciona información de secuencia para por lo menos una parte de dicho ácido nucleico plantilla en por lo menos algunos de dicha pluralidad de pocillos de detección óptica;
  - b) dicho componente de control de luz comprende una interfaz de usuario, y en donde dicha activación es realizada por un usuario a través de dicha interfaz de usuario; y/o
  - 40 c) dicha interfaz de usuario comprende un teclado de ordenador y/o un ratón de ordenador.

45

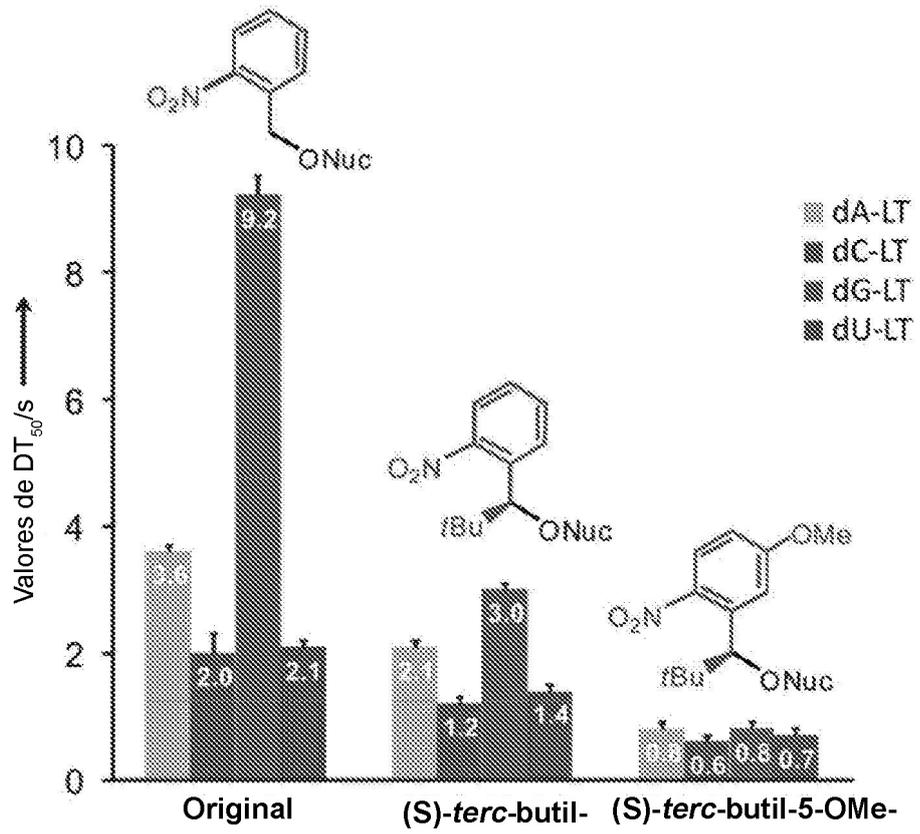
50

55

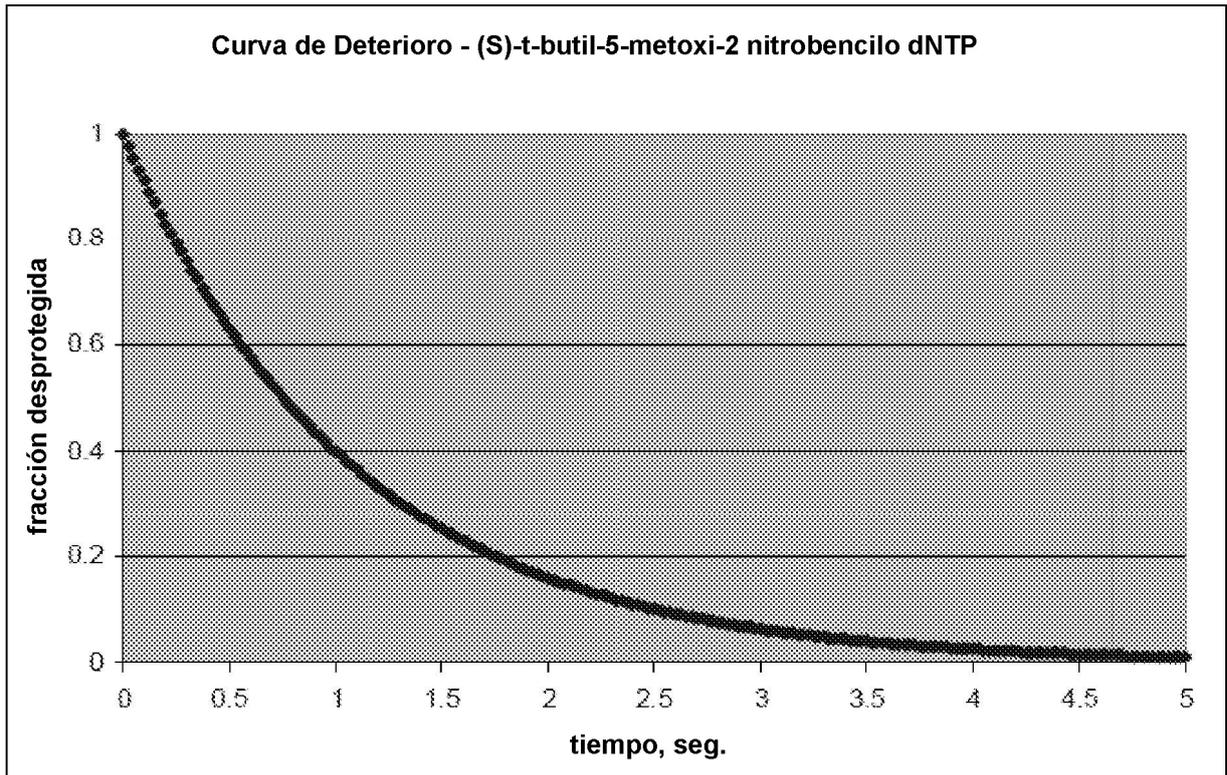
60

65

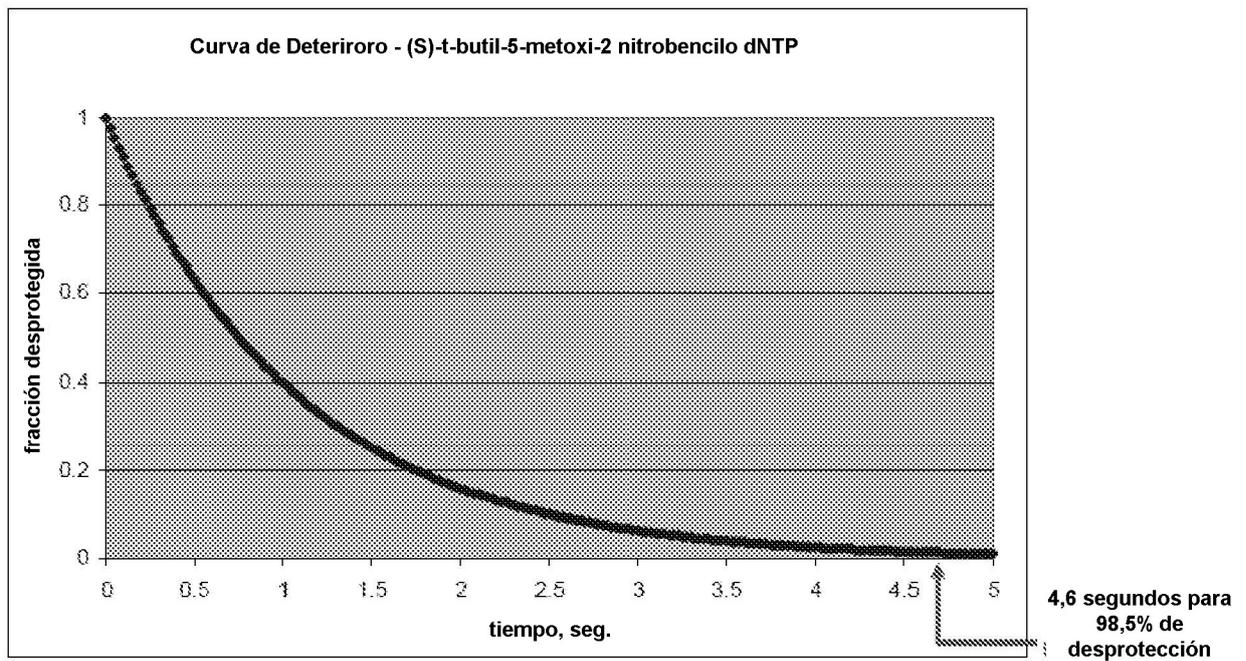
FIG. 1



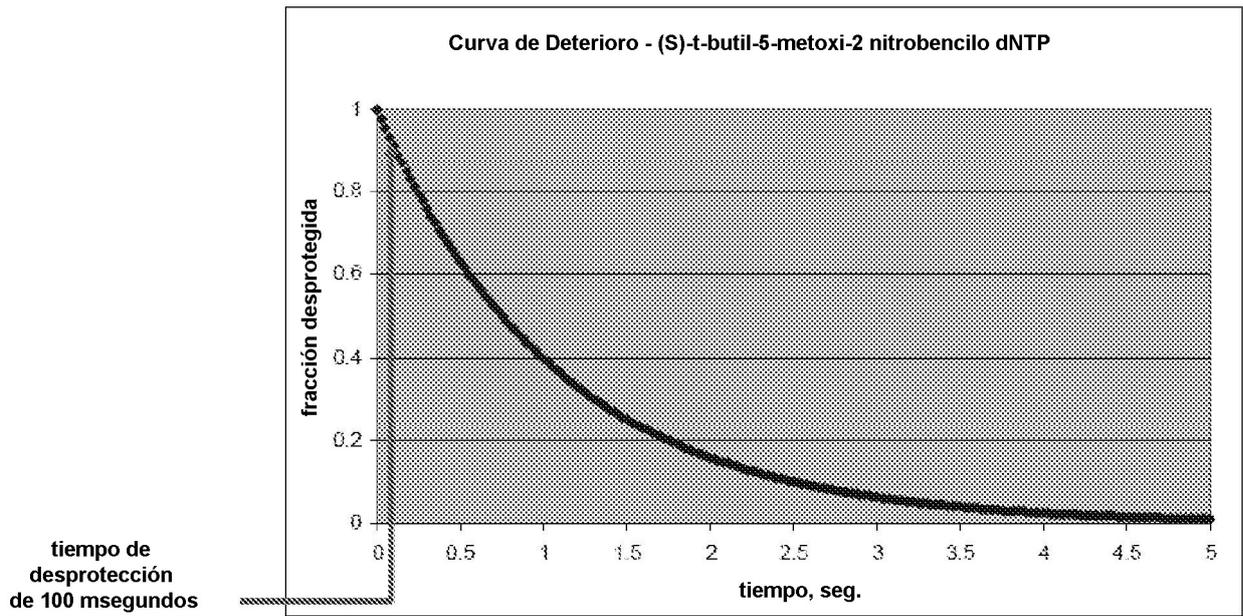
**FIG. 2**



**FIG. 3**

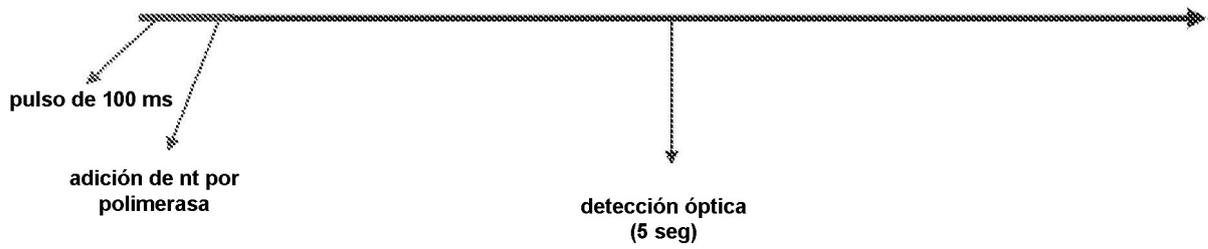


**FIG. 4**

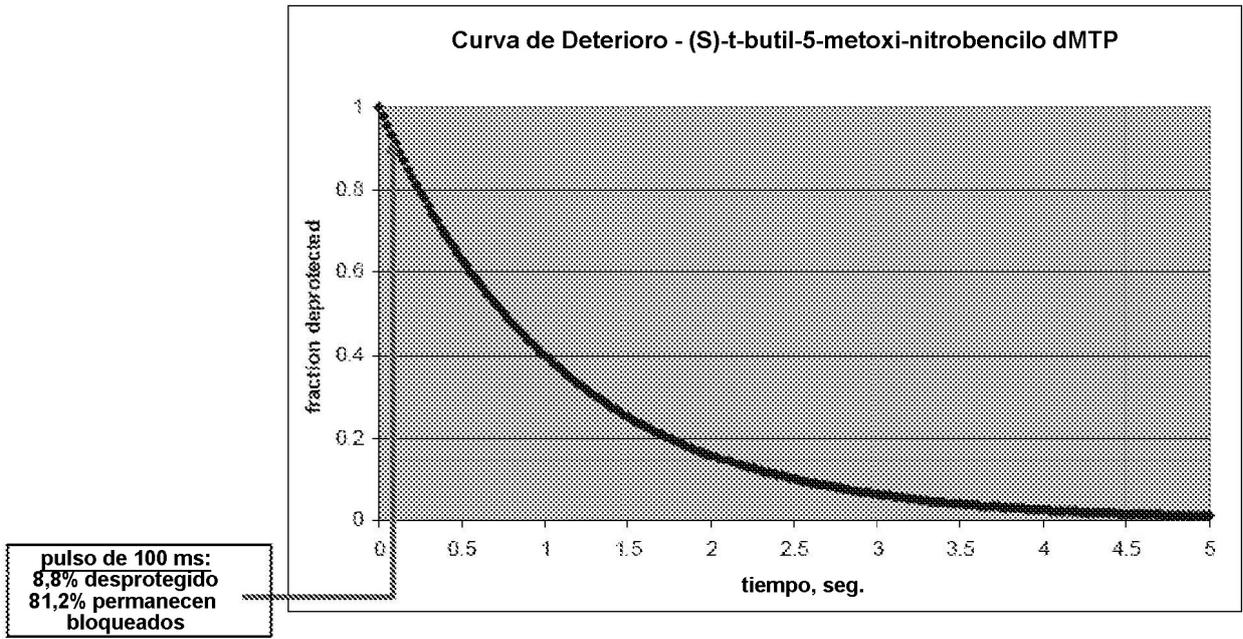


**FIG. 5**

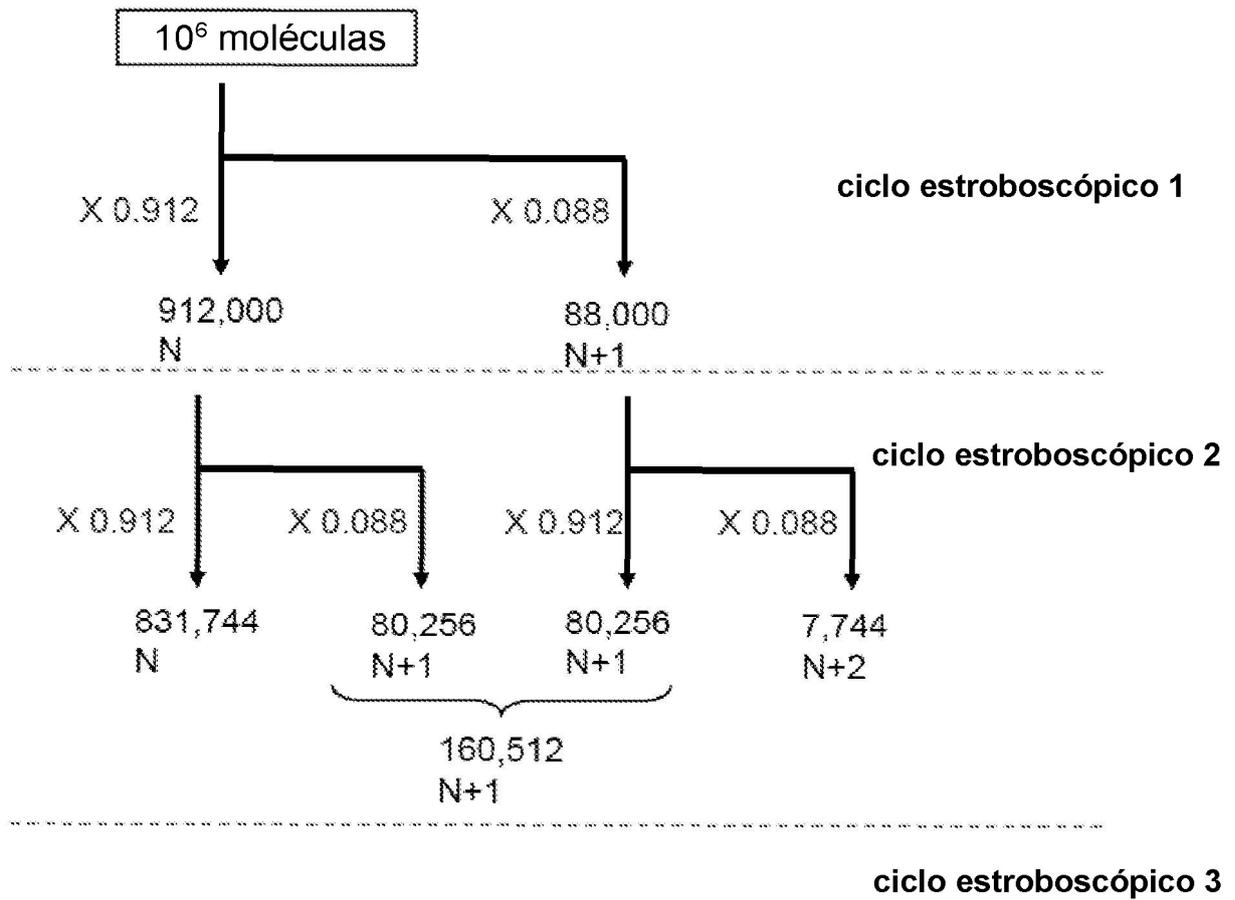
**Secuencia Temporal**



**FIG. 6**

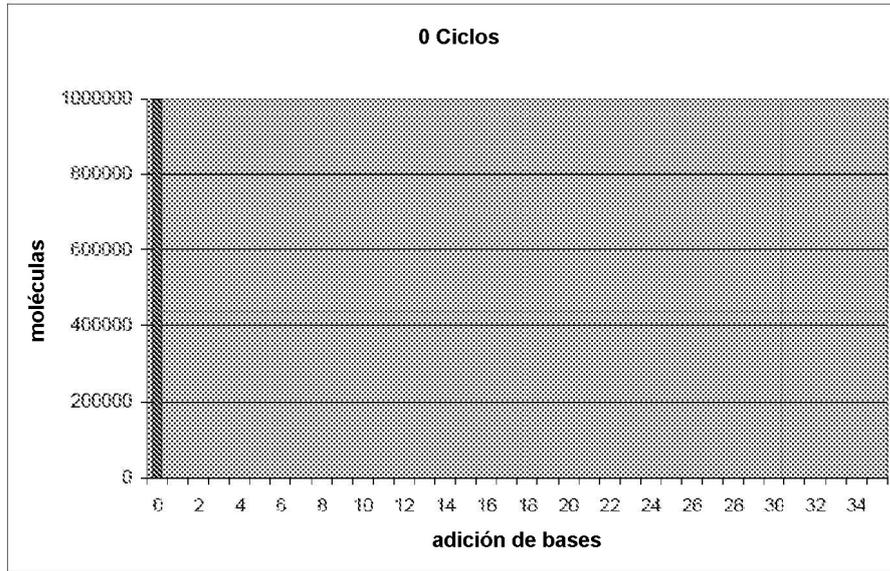


**FIG. 7**

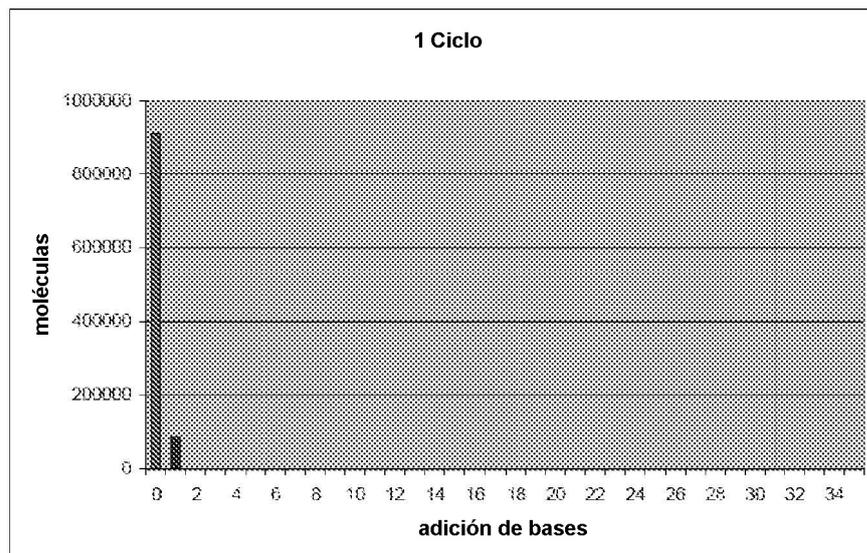


**FIG. 8**

**A.**

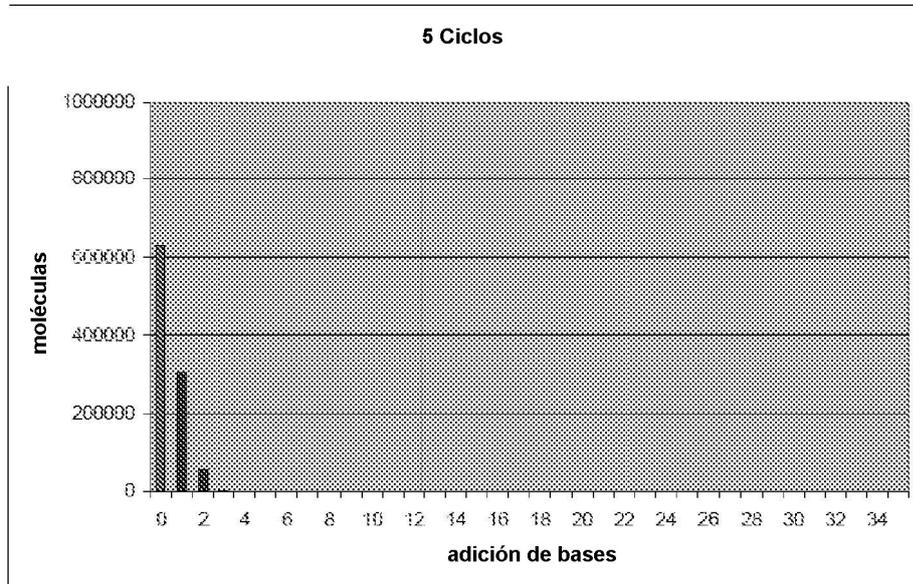


**B.**

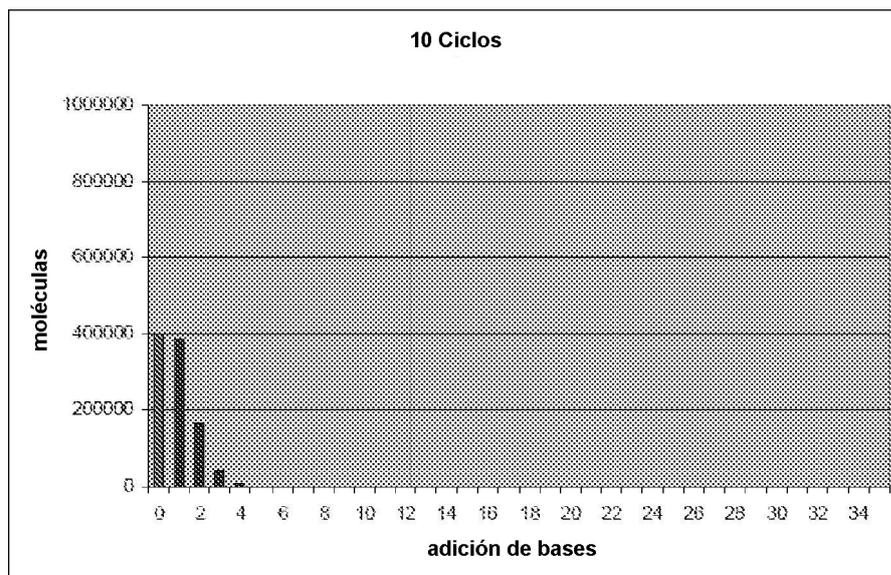


**FIG. 8 (cont.)**

**C.**

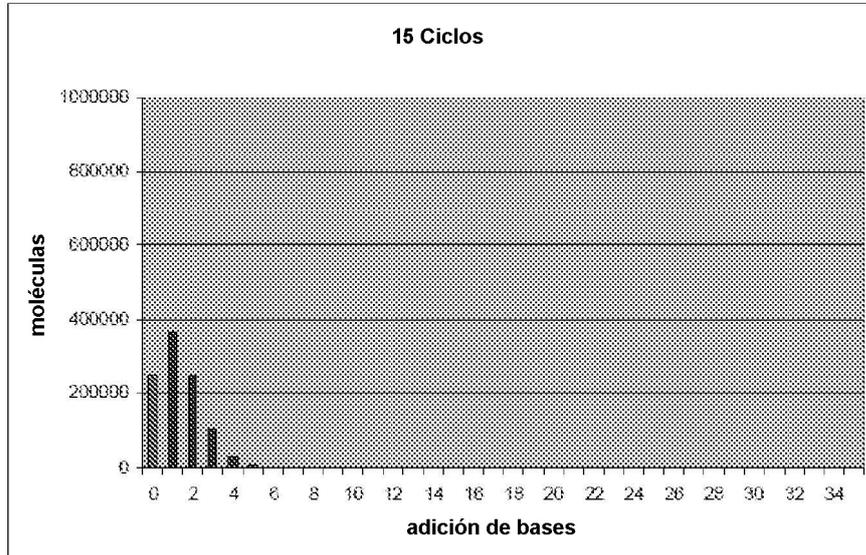


**D.**

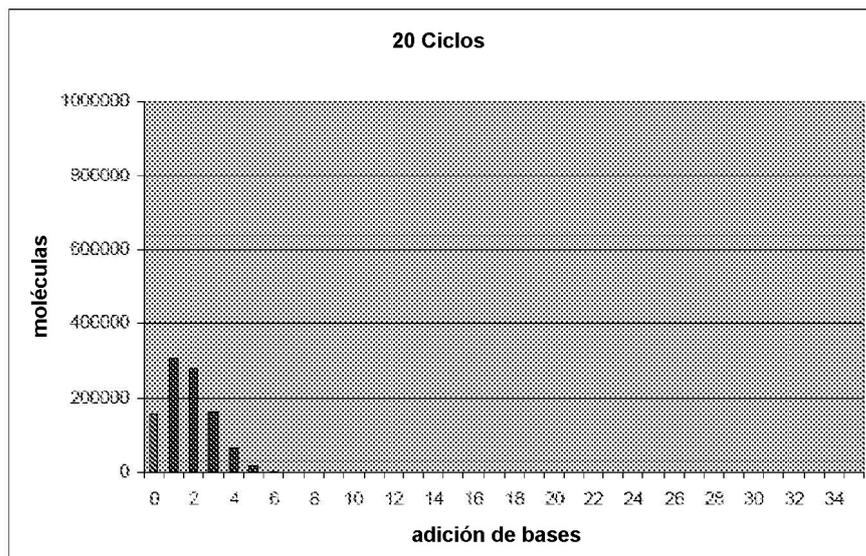


**FIG. 8 (cont.)**

**E.**

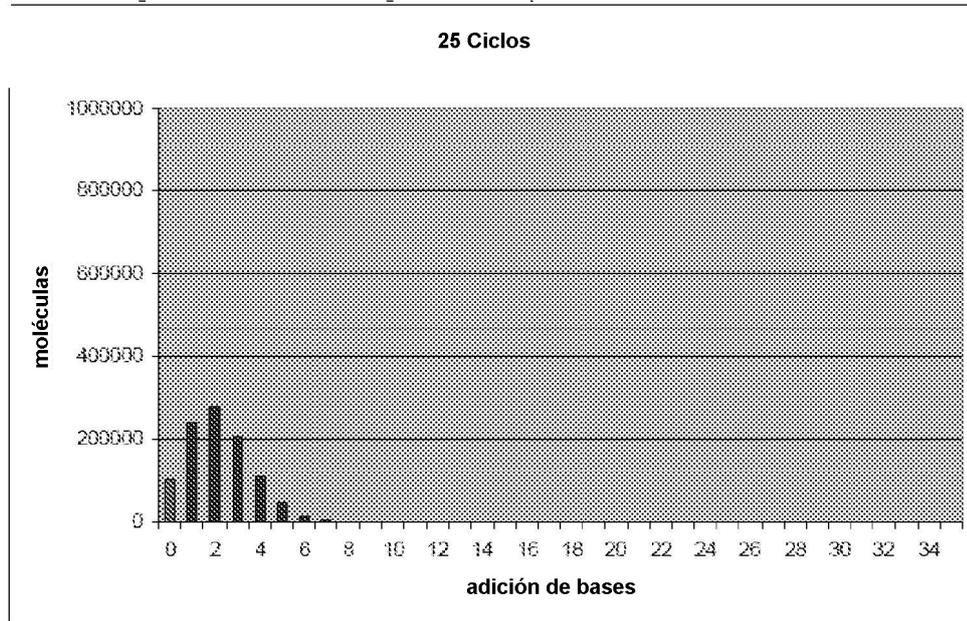


**F.**

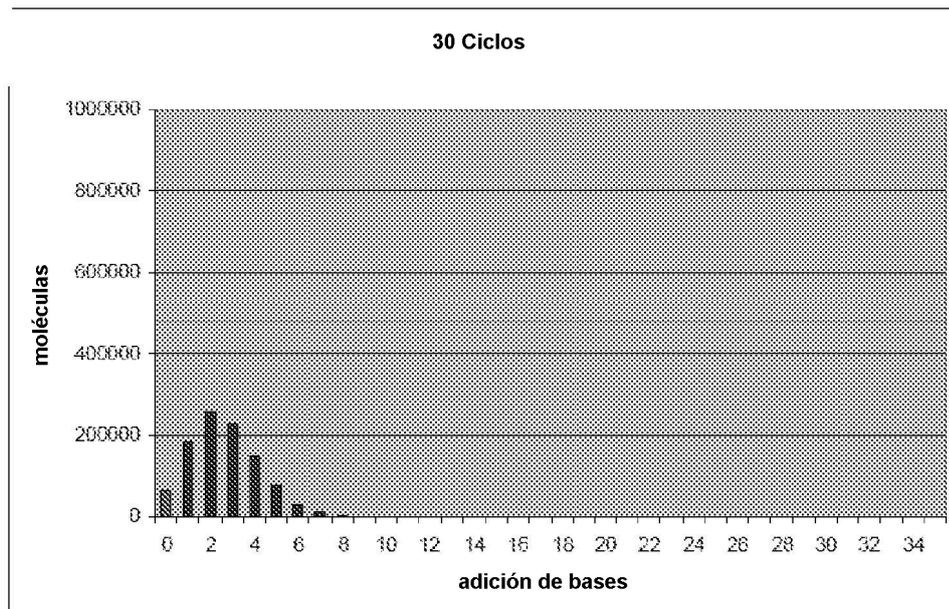


**FIG. 8 (cont.)**

**G.**

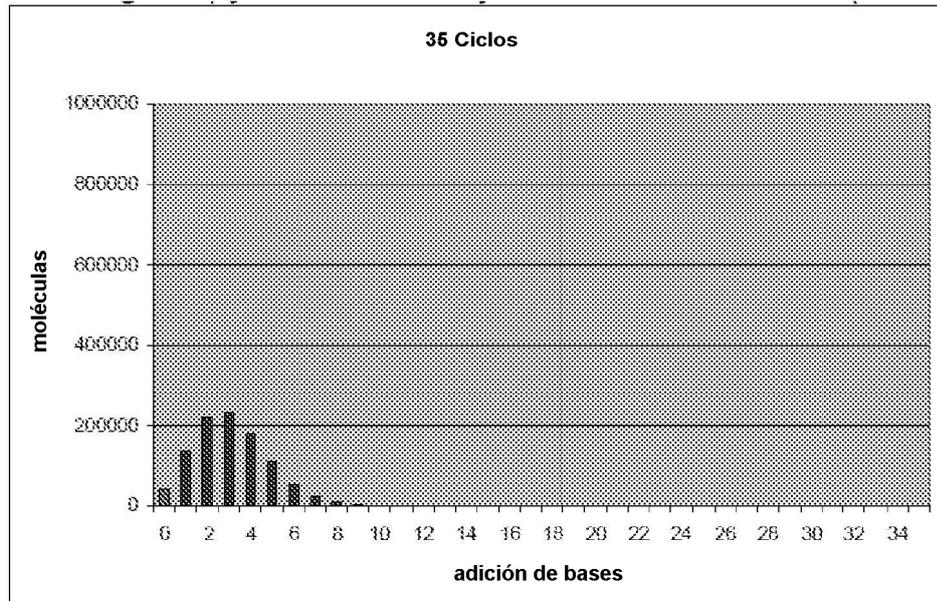


**H.**

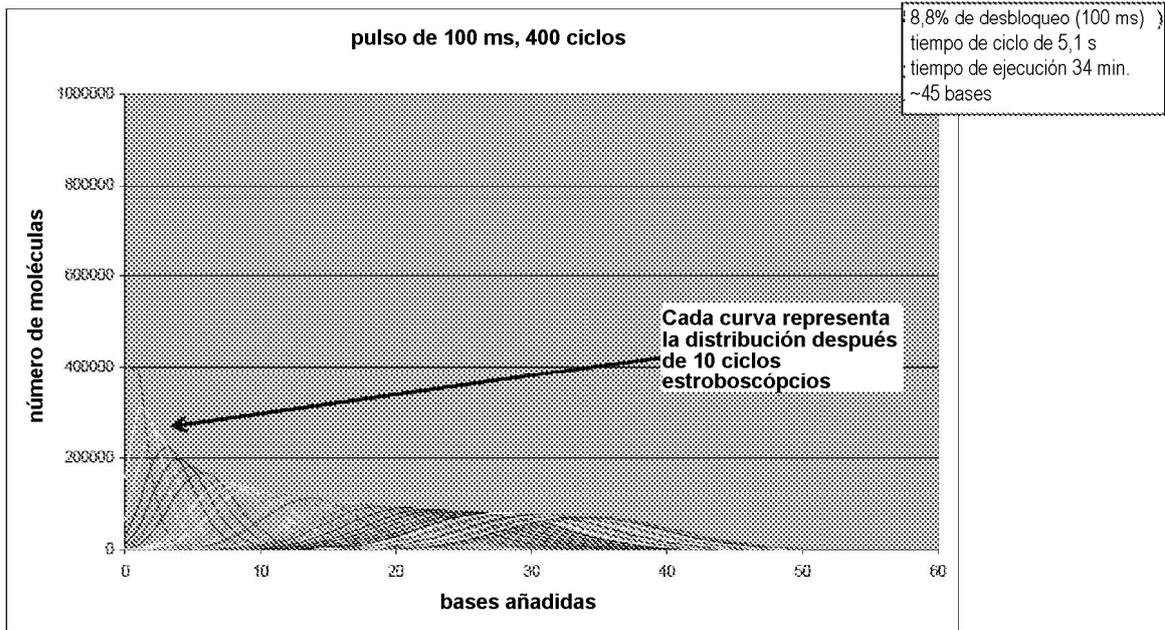


**FIG. 8 (cont.)**

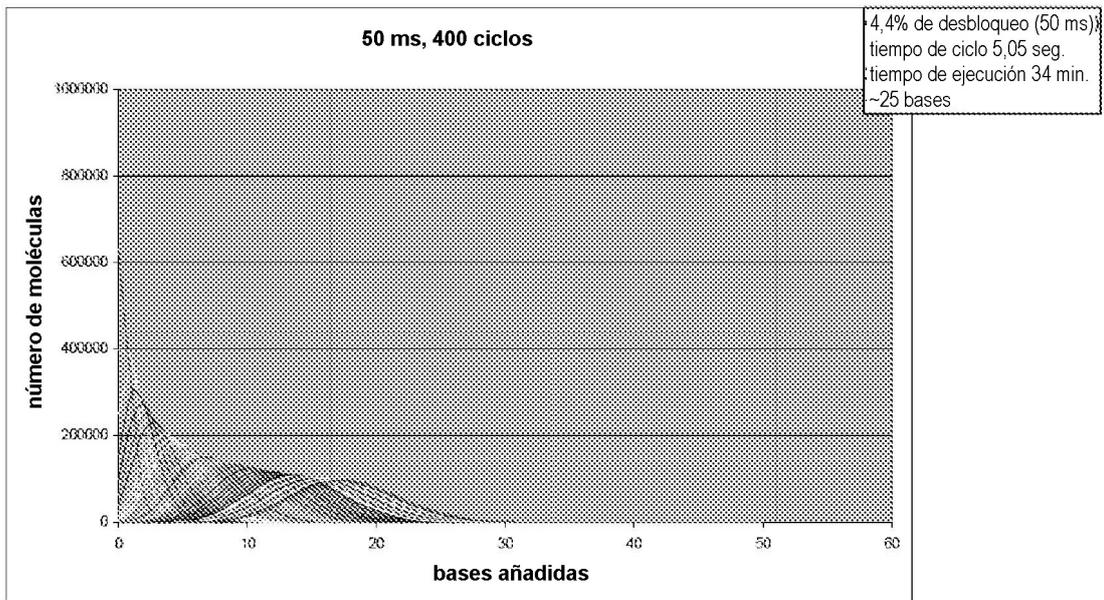
I.



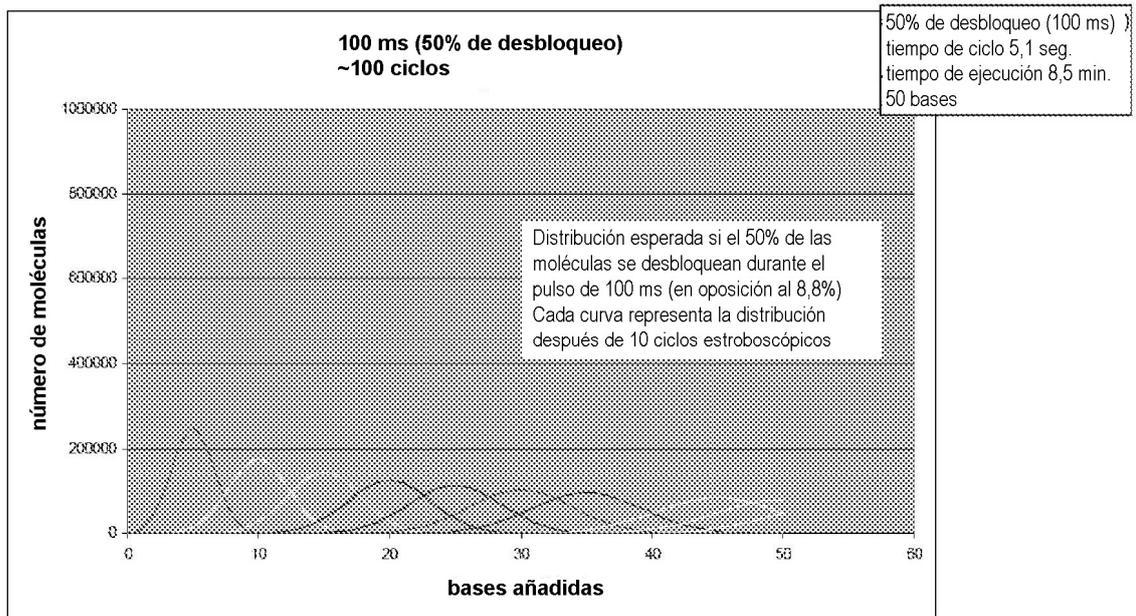
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



## FIG. 12

Ideal

Esperado = 0,08789 (fracción de moléculas que experimentan un cambio de color durante cada ciclo, si no hay homopolímeros)

Media = 0,08789

DE = 0

20 moléculas/400 ciclos

Esperado = 0,08789

Media = 0,087375

DE = 0,064185

40 moléculas/400 ciclos

Esperado = 0,08789

Media = 0,090813

DE = 0,047079

80 moléculas/400 ciclos

Esperado = 0,08789

Media = 0,090781

DE = 0,032064



Como se esperaba, la desviación estándar se hace más pequeña a medida que el número de moléculas muestreadas se hace más grande