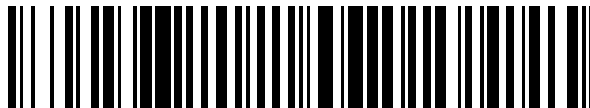


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 809**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6832** (2008.01)

**C12Q 1/6869** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2018 PCT/US2018/029420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2018 WO18200709**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2018 E 18724077 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3507386**

54 Título: **Métodos y aparatos que aumentan la eficacia de la secuenciación por unión**

30 Prioridad:

**25.04.2017 US 201762489610 P**

**29.06.2017 US 201762526514 P**

**22.09.2017 US 201715712632**

**15.03.2018 US 201815922787**

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

**21.01.2021**

73 Titular/es:

**OMNIOME, INC. (100.0%)**

**6965 Lusk Blvd.**

**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**STROMBERG, SEAN;**

**VIECELI, JOHN;**

**VIJAYAN, KANDASWAMY y**

**OLIPHANT, ARNOLD**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 802 809 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

Métodos y aparatos que aumentan la eficacia de la secuenciación por unión

5 **Antecedentes**

La presente divulgación se refiere generalmente al análisis molecular y al diagnóstico, y tiene aplicabilidad específica en la secuenciación de ácidos nucleicos.

10 El tiempo requerido para secuenciar un genoma humano se ha reducido rápidamente en la última década. El procedimiento, que solía llevar varios años y millones de dólares, ahora se puede completar en unos pocos días, por unos pocos miles de dólares. Aunque la tasa de mejora ha sido impresionante y, de hecho, ha superado el precedente de innovación rápida, la invención de semiconductores, los métodos comerciales disponibles en la actualidad siguen siendo insatisfactorios para muchas aplicaciones clínicas.

15 Una esperanza clínica clave para la secuenciación ha sido proporcionar información importante para desarrollar un diagnóstico fiable sobre si un paciente tiene una enfermedad mortal y, además, proporcionar orientación al elegir entre opciones de tratamiento costosas o que alteran la vida. Por ejemplo, la secuenciación puede desempeñar un papel clave para confirmar un diagnóstico preliminar de cáncer y ayudar al paciente a decidir sobre las opciones de tratamiento, tales como cirugía, quimioterapia o radioterapia. Aunque no es probable que unos pocos días de retraso en dicha confirmación afecten negativamente en el resultado clínico, existe un efecto negativo significativo en el estado emocional y psicológico del paciente que soporta el retraso.

25 En otras situaciones, el resultado clínico depende en gran medida de un diagnóstico rápido. En unos cuantos casos, la secuenciación se ha utilizado en unidades de cuidados intensivos neonatales para identificar enfermedades misteriosas en los recién nacidos y llevar a los médicos a opciones de tratamiento que de otro modo no se reconocerían y que salvarían vidas. No obstante, muchos recién nacidos mueren cada año por falta de un diagnóstico a tiempo.

30 Por lo tanto, existen necesidades de mejoras en la precisión, velocidad y coste de la secuenciación de ácidos nucleicos. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona también ventajas relacionadas.

**Breve resumen**

35 Los métodos de la invención son como se exponen en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona un método de detección de ácidos nucleicos, que incluye las etapas de (a) formar una mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la mezcla incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y análogos de nucleótido del primer, segundo y tercer tipo base en la  
40 plantilla; (b) examinar la mezcla para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b).

45 También se proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos dos mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde las al menos dos mezclas separadas incluyen cada una una polimerasa y un nucleótido, por lo que el contacto secuencial da como resultado que el ácido nucleico de plantilla  
50 cebado se ponga en contacto, en las condiciones de estabilización de complejos ternarios, con análogos de nucleótido para el primer, segundo y tercer tipo de base en la plantilla; (b) examinar las al menos dos mezclas separadas para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la  
55 ausencia de un complejo ternario en la etapa (b).

La presente divulgación proporciona además un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en  
60 condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) examinar los productos de las etapas (a) y (b) para  
65 detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son

- ambiguas para el primer y segundo tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base; (d) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (c) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto. Opcionalmente, para lograr la desambiguación (i) el primer tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b), (ii) el segundo tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la ausencia de señales para el producto de la etapa (b), y (iii) el tercer tipo de base se correlaciona con la ausencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b).
- 10 También se proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera mezcla que incluye una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la plantilla, en donde el contacto ocurre en una reacción de unión que (i) estabiliza complejos ternarios que incluyen el ácido nucleico de plantilla cebado, la polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, y (ii) evita la incorporación del siguiente nucleótido correcto en el cebador; (b) examinar la reacción de unión para determinar si se formó un complejo ternario; (c) someter el ácido nucleico de plantilla cebado a una repetición de las etapas (a) y (b), en donde la primera mezcla se reemplaza con una segunda mezcla, incluyendo la segunda mezcla una polimerasa, un análogo de nucleótido del primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base en la plantilla; y (d) identificar el siguiente nucleótido correcto para el ácido nucleico de plantilla cebado utilizando el examen de la reacción de unión, o el producto de la misma, en donde (i) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b), (ii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del segundo tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y no se detecta en la repetición de la etapa (b) y (iii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del tercer tipo de base si no se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b).

En realizaciones particulares, las etapas de un método de detección de ácido nucleico expuesto en el presente documento se pueden repetir para indagar varias posiciones diferentes en un ácido nucleico de plantilla. Por consiguiente, esta divulgación proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que incluye las etapas de (a) formar una mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la mezcla incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y análogos de nucleótido del primer, segundo y tercer tipo base en la plantilla; (b) examinar la mezcla para determinar si se formó un complejo ternario; (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b); (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

40 La presente divulgación también proporciona un método para determinar una secuencia de ácido nucleico que incluye las etapas de: (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una serie de mezclas para formar complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos tipos de base diferentes sospechosos de estar presentes en la siguiente posición del ácido nucleico de plantilla; (b) controlar la siguiente posición de plantilla para complejos ternarios formados por la serie de mezclas, en donde un estado de señal indica presencia o ausencia de complejo ternario formado en la siguiente posición de plantilla por cada mezcla individual, determinando así una serie de estados de señal que codifica una lectura de base para la siguiente posición de plantilla; y (c) decodificar la serie de estados de señal para distinguir una lectura de base correcta para la siguiente posición de plantilla de un error en la lectura de base.

50 En realizaciones particulares, las etapas de un método de detección de ácido nucleico expuesto en el presente documento se pueden repetir para indagar varias posiciones diferentes en un ácido nucleico de plantilla. Por consiguiente, esta divulgación proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que incluye las etapas de (a) formar una mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la mezcla incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y análogos de nucleótido del primer, segundo y tercer tipos base en la plantilla, en donde cada análogo de nucleótido del primer, segundo y tercer tipo de base en la plantilla es capaz de formar un complejo ternario que es detectable diferencialmente (es decir, un complejo ternario formado con un análogo de nucleótido del primer, segundo o tercer tipo de base, respectivamente, puede identificarse como tal y puede identificarse como diferente de un complejo ternario formado con un análogo de nucleótido del segundo o tercer, primer o tercer, o primer o segundo tipo de base, respectivamente); (b) examinar la mezcla para determinar si se formó un complejo ternario; (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b); (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

Esta divulgación también proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos dos mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde las al menos dos mezclas separadas incluyen cada una una polimerasa y un nucleótido, por lo que el contacto secuencial da como resultado que el ácido nucleico de plantilla cebado se ponga en contacto, en las condiciones de estabilización de complejos ternarios, con análogos de nucleótido para el primer, segundo y tercer tipo de base en la plantilla; (b) examinar las al menos dos mezclas separadas para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b); (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

En realizaciones adicionales, un método de secuenciación de ácido nucleico puede incluir las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) examinar los productos de las etapas (a) y (b) para detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y segundo tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base; (d) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (c) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto; (e) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (c), produciendo así un cebador extendido; y (f) repetir las etapas (a) a (e) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

Además, un método de secuenciación de ácido nucleico puede incluir las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera mezcla que incluye una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la plantilla, en donde el contacto ocurre en una reacción de unión que (i) estabiliza complejos ternarios que incluyen el ácido nucleico de plantilla cebado, la polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, y (ii) evita la incorporación del siguiente nucleótido correcto en el cebador; (b) examinar la reacción de unión para determinar si se formó un complejo ternario; (c) someter el ácido nucleico de plantilla cebado a una repetición de las etapas (a) y (b), en donde la primera mezcla se reemplaza con una segunda mezcla, incluyendo la segunda mezcla una polimerasa, un análogo de nucleótido del primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base en la plantilla; (d) identificar el siguiente nucleótido correcto para el ácido nucleico de plantilla cebado utilizando el examen de la reacción de unión, o el producto de la misma, en donde (i) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b), (ii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del segundo tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y no se detecta en la repetición de la etapa (b) y (iii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del tercer tipo de base si no se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b); (e) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (c), produciendo así un cebador extendido; y (f) repetir las etapas (a) a (e) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

En realizaciones, cuando un complejo ternario se detecta/no se detecta en la etapa (b) y se detecta/no se detecta en la repetición de la etapa (b), el complejo ternario se detecta/no se detecta en la primera variación de la etapa (b) y se detecta/no se detecta en la repetición (es decir, la segunda variación) de la etapa (b).

Esta divulgación proporciona además un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos cuatro mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado; (b) examinar las al menos cuatro mezclas separadas para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en al menos dos de las mezclas.

En realizaciones particulares, un método de detección de ácido nucleico, puede incluir (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera y segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado, en donde

las mezclas difieren en al menos un tipo de análogo de nucleótido; (b) examinar la primera y segunda mezcla de manera separada para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en las mezclas.

5 En realizaciones particulares, un método de detección de ácido nucleico, puede incluir (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera y segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado, en donde  
10 las mezclas difieren en al menos un tipo de análogo de nucleótido; (b) examinar la primera y segunda mezcla de manera separada para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en la primera mezcla pero no en la segunda mezcla.

15 En realizaciones particulares, un método de detección de ácido nucleico, puede incluir (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera y segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado, en donde  
20 las mezclas difieren en al menos un tipo de análogo de nucleótido; (b) examinar la primera y segunda mezcla de manera separada para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en la segunda mezcla pero no en la primera mezcla.

25 En realizaciones particulares, un método de detección de ácido nucleico, puede incluir (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera y segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado, en donde  
30 las mezclas difieren en al menos un tipo de análogo de nucleótido; (b) examinar la primera y segunda mezcla de manera separada para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si no se detecta complejo ternario en las dos mezclas.

35 También se proporciona un método de detección de ácido nucleico incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en una posición de nucleótido en la plantilla, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; b) poner en  
40 contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una tercera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la tercera mezcla incluye un análogo de nucleótido del segundo tipo de base y un análogo de nucleótido de un cuarto  
45 tipo de base; (d) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una cuarta mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la cuarta mezcla incluye un análogo de nucleótido del tercer tipo de base y un análogo de nucleótido del cuarto tipo de base; (e) examinar los productos de las etapas (a) a (d) para detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y segundo tipo de base,  
50 en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (c) son ambiguas para el segundo y cuarto tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (d) son ambiguas para el tercer y cuarto tipo de base; (f) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (e) para identificar un tipo de base que se une al  
55 siguiente nucleótido correcto.

### Descripción detallada

60 La presente divulgación proporciona métodos mejorados para identificar nucleótidos en un ácido nucleico. En algunas realizaciones, se identifican múltiples nucleótidos mediante una reacción de secuenciación repetitiva. Se pueden usar diversas técnicas de secuenciación para leer un ácido nucleico de plantilla, una posición a la vez, a medida que se alarga un cebador a lo largo de la plantilla mediante síntesis basada en polimerasa. Una de dichas técnicas, la metodología de secuenciación por unión (Sequencing By Binding™ (SBB™)), generalmente se basa en ciclos repetitivos de detección de un complejo estabilizado que se forma en cada posición a lo largo de la plantilla  
65 (por ejemplo, un complejo ternario que incluye la plantilla cebada, una polimerasa y un nucleótido análogo para la posición), en condiciones que evitan la incorporación covalente del nucleótido análogo en el cebador, y luego se

extiende el cebador para permitir la detección de la siguiente posición a lo largo de la plantilla. En los métodos SBB™, la detección del nucleótido en cada posición de la plantilla se produce antes de la extensión del cebador a la siguiente posición.

5 Generalmente, la metodología SBB™ se usa para distinguir cuatro tipos diferentes de nucleótidos que pueden estar presentes en las posiciones a lo largo de una plantilla de ácido nucleico. El tipo de nucleótido en cada posición se puede distinguir marcando de manera única cada tipo de complejo ternario (es decir, diferentes tipos de complejos ternarios que difieren en el tipo de nucleótido que contiene) o administrando por separado los reactivos necesarios para formar cada tipo de complejo ternario. Las dos configuraciones proporcionan diferentes ventajas cuando se comparan entre sí. Por ejemplo, la primera configuración tiene la desventaja relativa de requerir un equipo de detección complejo que tenga cuatro canales de detección separados (en lugar de un solo canal que se puede usar en la última configuración). La última configuración tiene la desventaja relativa de consumir más tiempo y reactivo para acomodar cuatro administraciones de reactivo diferentes (en lugar de la administración de reactivo único posible en la primera configuración).

15 La presente divulgación proporciona configuraciones de reacción alternativas y composiciones de reactivos que pueden minimizar o evitar las desventajas anteriores. En una realización particular, se lleva a cabo un ciclo de reacción SBB™ con solo un subconjunto de los posibles tipos de nucleótido que son capaces de servir como análogos para la diversidad de tipos de base que se espera que se produzcan en la plantilla que se está secuenciando. En esta realización, se puede imputar la identidad de un nucleótido omitido. Por ejemplo, una plantilla de ADN se puede someter a un ciclo de reacción SBB™ con solo tres tipos de nucleótido. La presencia de análogos para los tres tipos de nucleótidos se puede distinguir en posiciones individuales de la plantilla de acuerdo con la detección de un complejo ternario estabilizado que contiene el tipo respectivo de nucleótido, mientras que la presencia de un análogo del cuarto tipo de nucleótido en una posición particular se puede imputar en función de la ausencia de cualquier señal para la formación de complejos ternarios en la posición. Esta realización proporciona la ventaja de requerir menos administraciones de reactivos de las que serían necesarias si los cuatro tipos de nucleótido se administrasen por separado. Otra ventaja es que esta realización requiere menos canales de detección de los que se usarían si se distinguieran señales únicas para cada uno de los cuatro tipos de nucleótido. Las realizaciones a modo de ejemplo que utilizan imputación se exponen en la sección de Ejemplos a continuación en el contexto de las Tablas 1, 2 y 5.

En algunas realizaciones, se proporciona un método SBB™ que utiliza menos administraciones de reactivos y menos tipos de marcadores que el número de tipos de nucleótido que se distinguen. Por ejemplo, se pueden usar menos de tres administraciones de reactivos y menos de tres tipos de marcadores en un ciclo SBB™ que, no obstante, proporciona información para identificar de forma única tres tipos de base diferentes en un ácido nucleico de plantilla. Como ejemplo más específico, se pueden llevar a cabo dos administraciones de reactivos y dos exámenes en el siguiente orden: (1) la primera administración incluye reactivos capaces de formar un primer complejo ternario estabilizado con un primer tipo de nucleótido y un segundo complejo ternario estabilizado con un segundo tipo de nucleótido (por ejemplo, un complejo ternario-dGTP y un complejo ternario-dCTP); (2) el producto de la primera administración se somete a un primer examen; (3) la segunda administración incluye reactivos capaces de formar el primer complejo ternario estabilizado con el primer tipo de nucleótido y un tercer complejo ternario estabilizado con un tercer tipo de nucleótido (por ejemplo, un complejo ternario-dGTP y un complejo ternario-dTTP); y (4) el producto de la segunda administración se somete a un segundo examen. Los diferentes complejos ternarios se pueden marcar de varias maneras, pero los marcadores no necesitan distinguir un tipo de complejo ternario de otro. En otras palabras, cualquier señal detectada en las etapas de examen anteriores puede ser ambigua con respecto al tipo de nucleótido que participó en la formación del complejo ternario. Los resultados del segundo examen se pueden usar para desambiguar los resultados del primer examen y viceversa. Se puede lograr una desambiguación más específica mediante una comparación en donde: el dGTP se identifica a partir de la presencia de señal en el primer y el segundo examen, o el dCTP se lee a partir de la presencia de señal en el primer examen y la ausencia de señal en el segundo examen, o el dTTP se lee a partir de la ausencia de señal en el primer examen y la presencia de señal en el segundo examen. Asimismo, en este ejemplo, la ausencia de señal en ambos exámenes se puede leer como si un dATP hubiera estado presente, aunque no lo estuviera. Las realizaciones a modo de ejemplo que utilizan desambiguación se exponen en la sección de Ejemplos en el contexto de las Tablas 2-5.

55 Una realización SBB™ adicional puede emplear el cambio de marcador para uno o más tipos de nucleótido en etapas alternativas de administración de reactivo. Como tal, el cambio en la señal que se detecta para el mismo tipo de complejo ternario estabilizado se puede usar como base para desambiguar la identidad del nucleótido en el complejo ternario. De manera más específica, los diferentes tipos de complejos ternarios estabilizados pueden producir una combinación diferente de estados de señal cuando se comparan múltiples administraciones de reactivos diferentes. La combinación única de estados de señal a través de administraciones de reactivos múltiples proporciona una característica (también denominada en el presente documento como "palabra clave") que identifica de forma única diferentes tipos de base en un ácido nucleico de plantilla. Las realizaciones a modo de ejemplo que utilizan estados de señal alternantes como una característica única se exponen en la sección de Ejemplos en el contexto de las Tablas 3, 4, 5, 7 y 8.

65 Como será evidente a partir del ejemplo anterior, los métodos expuestos en el presente documento pueden

proporcionar la ventaja de reducir la complejidad y el coste del equipo de detección y también pueden proporcionar la ventaja de reducir el tiempo del ciclo y el coste de los reactivos en comparación con los métodos SBB™ anteriores.

- 5 Realizaciones particulares de la presente divulgación proporcionan una precisión mejorada. Usando los métodos expuestos en el presente documento, los complejos ternarios se pueden formar y examinar varias veces en una posición particular en una plantilla cebada. En un método de secuenciación, esto se puede lograr mediante la realización de un ciclo que incluye múltiples administraciones de reactivos y etapas de examen para una posición particular en una plantilla cebada antes de avanzar al siguiente ciclo mediante la extensión del cebador. Esto puede dar como resultado de manera eficaz exámenes en serie o repetitivos de un tipo de nucleótido análogo particular en una posición de plantilla dada. Estos exámenes en serie o repetitivos se pueden combinar para proporcionar una lectura de nucleótidos más precisa que la que estaría disponible a partir de un solo examen del tipo de nucleótido análogo particular en esa posición. Por otra parte, los exámenes en serie o repetitivos de este tipo pueden proporcionar análisis estadísticos o medidas de varianza para lecturas de nucleótidos en posiciones individuales en una plantilla cebada. Dicha información se puede utilizar a su vez para evaluar la precisión general de una determinación de secuencia.

Los exámenes repetitivos se pueden lograr simplemente mediante la repetición de las etapas dentro de un ciclo SBB™ normal. Por ejemplo, las etapas repetidas pueden implicar la administración de reactivos para formar cuatro tipos de complejos ternarios marcados de forma única y el examen de los complejos ternarios utilizando detectores que distinguen los diferentes tipos de complejos ternarios en una mezcla. Como otro ejemplo, las etapas repetidas pueden implicar la administración por separado de reactivos para formar cada uno de los cuatro tipos diferentes de complejos ternarios y la detección por separado del producto de cada administración. La primera configuración tiene una desventaja relativa de requerir un equipo de detección más complejo y la última configuración tiene una desventaja relativa de consumir relativamente más tiempo y reactivos. De acuerdo con los métodos de desambiguación expuestos en el presente documento, una posición en una plantilla cebada se puede tratar secuencialmente con diferentes mezclas de reactivos para formar complejos ternarios y se pueden examinar las mezclas resultantes. La selección adecuada de tipos de nucleótido a través de mezclas combinatorias puede permitir que la posición sea tratada y examinada menos veces y/o con menos tipos de marcadores de los que serían necesarios cuando se usa simplemente la administración repetitiva de los mismos reactivos. Las realizaciones a modo de ejemplo que utilizan desambiguación y proporcionan una precisión mejorada se exponen en la sección de Ejemplos en el contexto de las Tablas 3, 9 y 10.

Las realizaciones particulares de los métodos expuestos en el presente documento utilizan un esquema de codificación que proporciona detección de errores y corrección de errores. Los exámenes en serie producen una serie de estados de señal, respectivamente. Por ejemplo, diferentes tipos de complejos ternarios se pueden marcar con luminóforos de diferentes colores y la serie de colores emitidos a partir de la serie de exámenes puede codificar el tipo de nucleótido que está presente en la posición del ácido nucleico de plantilla donde se formó la serie de complejos ternarios. Cada tipo de nucleótido diferente está codificado por una serie única de estados de señal. En aras de la explicación, el código se puede representar como una serie de dígitos que forman una palabra clave de longitud  $n$ , en donde cada dígito representa un estado de señal (por ejemplo, un primer color o segundo color en el caso de un dígito binario basado en el color de luminiscencia) y la longitud de la palabra clave es la misma que el número de exámenes. La detección de errores es posible cuando el número de palabras clave posibles excede el número de tipos de nucleótido esperados. De manera más específica, se proporciona detección de errores ya que una lectura de base se puede identificar como válida cuando procede de una palabra clave que se espera para uno de los tipos de nucleótido o no válida cuando procede de una palabra clave que no está asignada a ningún tipo de nucleótido. Por otra parte, la corrección de errores se puede proporcionar mediante una selección adecuada de la complejidad del código y la distancia entre códigos para lecturas de base válidas. Por ejemplo, las palabras clave para cada lectura de base válida pueden diferir de las palabras clave para todas las demás lecturas de base válidas en al menos tres dígitos. Como consecuencia, se pueden detectar hasta dos errores por palabra clave mientras se puede corregir un solo error. Cualquiera de varios códigos de detección de errores o de corrección de errores utilizados en telecomunicaciones, teoría de la información o teoría de codificación se puede adaptar para su uso en un método expuesto en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, un código de repetición, código de paridad, código de detección de errores, código de corrección de errores, código lineal o código Hamming.

Realizaciones a modo de ejemplo que utilizan códigos de detección de errores se exponen en el Ejemplo 8 y realizaciones a modo de ejemplo que utilizan códigos de corrección de errores se exponen en el Ejemplo 9.

En realizaciones de secuenciación, puede ser beneficioso cambiar la técnica de examen para diferentes ciclos. Por ejemplo, en situaciones donde se espera que los ciclos de secuenciación posteriores sean más propensos a errores que los ciclos anteriores, puede ser beneficioso aumentar el número de etapas de examen por ciclo a medida que avanza la secuenciación. Puede ser beneficioso usar un número relativamente bajo de etapas de examen y/o menos marcadores durante los primeros ciclos de secuenciación, para minimizar los costes de reactivos y el tiempo de secuenciación, y luego el número de etapas de examen y/o marcadores se puede aumentar durante los ciclos posteriores para mejorar la precisión. Por consiguiente, los códigos de detección de errores o los códigos de corrección de errores se pueden usar en ciclos posteriores en un protocolo de secuenciación, incluso si no se usan en los primeros ciclos. Cualquiera de los múltiples esquemas de examen y/o codificación expuestos en el presente

documento se puede iniciar después de 10, 25, 50, 100, 200, 500 o más ciclos de una técnica de secuenciación.

Se puede modificar varias técnicas SBB™ de acuerdo con las enseñanzas expuestas en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, las descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/851.383, que reclama el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/440.624; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/873.343, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/450.397.

Asimismo, aunque los métodos que emplean la imputación y desambiguación se ejemplifican en el presente documento con respecto a las reacciones de secuenciación que emplean ciclos repetidos, los ciclos no necesitan repetirse. Por ejemplo, un método de genotipado que sondea una posición de nucleótido individual en un ácido nucleico de plantilla mediante la formación de un complejo ternario estabilizado puede llevarse a cabo con solo un subconjunto de los posibles tipos de nucleótido que se esperaría que formaran análogos con la plantilla que se está genotipando y la identidad del nucleótido omitido se puede imputar. En otro ejemplo, se pueden usar menos de tres administraciones de reactivos y menos de tres tipos de marcadores en una reacción de genotipado que, no obstante, proporciona información para identificar de forma única tres o cuatro tipos diferentes de nucleótido utilizando estados de señalización alternante y/o desambiguación. La posición que se está sondeando en una realización de genotipado se puede identificar usando un esquema de codificación que permite la detección o corrección de errores. Los ejemplos de técnicas de genotipado que se pueden modificar para emplear técnicas de imputación y/o desambiguación expuestas en el presente documento incluyen las expuestas en la solicitud de patente de Estados Unidos de propiedad común N.º de serie 15/701.373, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º 62/448.630.

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

Como se usa en el presente documento, el término "ambiguo", cuando se usa en referencia a una señal, significa que la señal aparentemente tiene más de un posible origen. Por ejemplo, una señal ambigua que se adquiere en un ciclo de una reacción de secuenciación puede no distinguir entre dos o más tipos de nucleótido que podrían participar en el ciclo para producir la señal. Cuando se usa en referencia a una representación de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico), el término "ambiguo" se refiere a una posición en la representación de ácido nucleico para la que dos o más tipos de nucleótido se identifican como ocupantes candidatos. Una posición ambigua puede tener, por ejemplo, al menos 2, 3 o 4 tipos de nucleótido como ocupantes candidatos. Como alternativa o de modo adicional, una posición ambigua puede tener como máximo 4, 3 o 2 tipos de nucleótido como ocupantes candidatos.

Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a una población de moléculas que están unidas a uno o más sustratos en fase sólida de modo que las moléculas en una casilla se pueden distinguir de las moléculas en otras casillas. Una matriz puede incluir diferentes moléculas que están ubicadas en diferentes casillas direccionables en un sustrato en fase sólida. Como alternativa, una matriz puede incluir sustratos en fase sólida separados, cada uno de los cuales funciona como una casilla que lleva una molécula diferente, en donde las diferentes moléculas se pueden identificar de acuerdo con la ubicación de los sustratos en fase sólida en una superficie en la que los sustratos en fase sólida están unidos, o de acuerdo con la ubicación de los sustratos en fase sólida en un líquido tal como una corriente líquida. Las moléculas de la matriz pueden ser, por ejemplo, nucleótidos, cebadores de ácido nucleico, plantillas de ácido nucleico, plantillas cebadas, plantillas de ácido nucleico cebadas, ácido nucleico de plantilla cebado o enzimas de ácido nucleico tales como polimerasas, ligasas, exonucleasas o combinaciones de las mismas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo binario" se refiere a una asociación intermolecular entre una polimerasa y un ácido nucleico de plantilla cebado, excluyendo una molécula de nucleótido tal como el siguiente nucleótido correcto del ácido nucleico de plantilla cebado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fracción de bloqueo", cuando se usa en referencia a un análogo de nucleótido, se refiere a una parte del análogo de nucleótido que inhibe o evita que el nucleótido forme un enlace covalente con el siguiente nucleótido correcto (por ejemplo, a través del oxígeno en 3' de un nucleótido cebador) durante la etapa de incorporación de una reacción de polimerización de ácido nucleico. La fracción de bloqueo de un nucleótido "de terminación reversible" se puede eliminar del análogo de nucleótido, o modificarse de otro modo, para permitir que el oxígeno en 3' del nucleótido se una covalentemente al siguiente nucleótido correcto. Dicha fracción de bloqueo se denomina en el presente documento "fracción de terminación reversible". Se exponen ejemplos de fracciones de terminación reversibles en las patentes de EE.UU. números 7.427.673; 7.414.116; 7.057.026; 7.544.794 u 8.034.923; o en las publicaciones PCT WO 91/06678 o WO 07/123744.

Como se usa en el presente documento, el término "lectura", cuando se usa en referencia a un nucleótido o base, se



refiere a una determinación del tipo de nucleótido o base que está presente en una posición particular en una secuencia de ácido nucleico. Una lectura se puede asociar con una medida de error o confianza. Una lectura de 'N', 'nulo', 'desconocido' o similar se puede usar para una posición particular en una secuencia cuando un error es aparente o cuando la confianza está por debajo de un umbral dado. Una lectura puede representar un tipo discreto de base o nucleótido (por ejemplo, A, C, G, T o U, utilizando el código de letra única IUPAC) o una lectura puede representar degeneración. Tomando los símbolos IUPAC como ejemplo, una sola posición se puede leer como R (es decir, A o G), M (es decir, A o C), W (es decir, A o T), S (es decir, C o G), Y (es decir, C o T), K (es decir, G o T), B (es decir, C o G o T), D (es decir, A o G o T), H (es decir, A o C o T), o V (es decir, A o C o G). Una lectura no necesita ser definitiva, por ejemplo, siendo una lectura propuesta basada en información incompleta o en desarrollo. En algunos casos, una lectura se puede considerar válida o inválida en función de la comparación de datos empíricos con una referencia. Por ejemplo, cuando se codifican datos de señal, una lectura, que es consistente con una palabra clave predeterminada para un tipo de base particular, se puede identificar como una lectura válida, mientras que una lectura que no es consistente con palabras clave para cualquier tipo de base se puede identificar como una lectura no válida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ion metálico catalítico" se refiere a un ion metálico que facilita la formación de enlaces fosfodiéster entre el oxígeno en 3' de un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador) y el fosfato en 5' de un nucleótido entrante mediante una polimerasa. Un "catión metálico catalítico divalente" es un ion metálico catalítico que tiene una valencia de dos. Los iones metálicos catalíticos pueden estar presentes en concentraciones que estabilizan la formación de un complejo entre una polimerasa, un nucleótido y un ácido nucleico de plantilla cebado, denominadas concentraciones no catalíticas de un ion metálico en la medida en que no se produce la formación de enlaces fosfodiéster. Las concentraciones catalíticas de un ion metálico se refieren a la cantidad de un ion metálico suficiente para que las polimerasas catalicen la reacción entre el grupo de oxígeno en 3' de un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador) y el grupo fosfato en 5' de un nucleótido entrante.

Como se usa en el presente documento, el término "código" significa un sistema de reglas para convertir información, tales como señales obtenidas a partir de un aparato de detección, en otra forma o representación, tal como una lectura de base o una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, las señales que se producen por uno o más complejos ternarios que tienen un tipo particular de nucleótido unido se pueden codificar por un dígito. El dígito puede tener diversos posibles valores, cada valor codifica un estado de señal diferente. Por ejemplo, un dígito binario tendrá un primer valor para un primer estado de señal y un segundo valor para un segundo estado de señal. Un dígito puede tener una raíz más alta que incluye, por ejemplo, un dígito ternario que tiene tres posibles valores, un dígito cuaternario que tiene cuatro posibles valores, etc. Una serie de dígitos puede formar una palabra clave. Por ejemplo, la serie de dígitos puede codificar una serie de estados de señal adquiridos de una serie de etapas de examen de complejos ternarios. La longitud de la palabra clave es la misma que el número de etapas de examen realizados. Los códigos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un código de repetición, código de paridad, código de detección de errores, código de corrección de errores, código lineal o código Hamming.

Como se usa en el presente documento, la expresión "comprendiendo/que comprende" está destinado a ser abierta, incluyendo no solo los elementos citados, sino que abarca además cualquier elemento adicional.

Como se usa en el presente documento, el término "desestabilizar" significa hacer que algo no pueda continuar existiendo o trabajando de una manera particular. "Desestabilizar" un complejo binario se refiere al proceso de promover la disolución o descomposición del complejo binario. "Desestabilizar" también incluye el proceso de inhibición o prevención de la formación del complejo binario.

Como se usa en el presente documento, el término "determinar" se puede usar para referirse al acto de comprobar, establecer o estimar. Una determinación puede ser probabilística. Por ejemplo, una determinación puede tener una probabilidad aparente de al menos un 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o más. En algunos casos, una determinación puede tener una probabilidad aparente del 100 %. Una determinación a modo de ejemplo es un análisis o informe de máxima probabilidad.

Como se usa en el presente documento, el término "desambiguación", cuando se usa en referencia a la identidad de nucleótidos, significa identificar un solo tipo de nucleótido a partir de una señal que es ambigua para al menos dos tipos de nucleótido candidatos, siendo el tipo de nucleótido único uno de los tipos de nucleótido candidatos.

Como se usa en el presente documento, 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 de la colección. Pueden ocurrir excepciones si la divulgación explícita o el contexto dictan claramente lo contrario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "código de corrección de errores" significa un código que identifica la información como válida o inválida y que además proporciona la recuperación de información válida. Por ejemplo, un código de corrección de errores puede tener información suficiente para recuperar señales válidas a partir de señales inválidas o para hacer una lectura de base válida a partir de señales inválidas o erróneas. Un código de corrección de errores puede funcionar como un código de detección de errores.

Como se usa en el presente documento, la expresión "código de detección de errores" significa un código que identifica la información como válida o inválida. Por ejemplo, un código de detección de errores puede tener información suficiente para distinguir señales válidas a partir de señales inválidas o para distinguir una lectura de base válida a partir de lecturas de base inválidas.

Como se usa en el presente documento, el término "exógeno", cuando se usa en referencia a una fracción de una molécula, significa una fracción química que no está presente en un análogo natural de la molécula. Por ejemplo, un marcador exógeno de un nucleótido es un marcador que no está presente en un nucleótido natural. De forma similar, un marcador exógeno que está presente en una polimerasa no se encuentra en la polimerasa en su medio nativo.

Como se usa en el presente documento, el término "extensión", cuando se usa en referencia a un ácido nucleico, se refiere a un proceso de adición de al menos un nucleótido al extremo 3' del ácido nucleico. Se dice que un nucleótido u oligonucleótido que se añade a un ácido nucleico por extensión se incorpora al ácido nucleico. Por consiguiente, el término "incorporar" se puede usar para referirse al proceso de unir un nucleótido u oligonucleótido al extremo 3' de un ácido nucleico mediante la formación de un enlace fosfodiéster.

Como se usa en el presente documento, el término "casilla", cuando se usa en referencia a una matriz, significa una ubicación en una matriz donde está presente una molécula particular. Una casilla puede contener solo una molécula o puede contener una población de varias moléculas de la misma especie (es decir, un conjunto de moléculas). Como alternativa, una casilla puede incluir una población de moléculas que son de especies diferentes (por ejemplo, una población de complejos ternarios que tienen diferentes secuencias de plantilla). Las casillas de una matriz son normalmente discretas. Las casillas discretas pueden ser contiguas o pueden tener espacios entre sí. Una matriz útil en el presente documento puede tener, por ejemplo, casillas que están separadas por menos de 100 micrómetros, 50 micrómetros, 10 micrómetros, 5 micrómetros, 1 micrómetro o 0,5 micrómetros. Como alternativa o de modo adicional, una matriz puede tener casillas que están separadas por más de 0,5 micrómetros, 1 micrómetro, 5 micrómetros, 10 micrómetros, 50 micrómetros o 100 micrómetros. Las casillas pueden tener un área de menos de 1 milímetro cuadrado, 500 micrómetros cuadrados, 100 micrómetros cuadrados, 25 micrómetros cuadrados, 1 micrómetro cuadrado o menos.

Como se usa en el presente documento, el término "identificar", cuando se usa en referencia a una cosa, se puede usar para referirse al reconocimiento de la cosa, la distinción de la cosa de al menos otra cosa o la categorización de la cosa con al menos otra cosa. El reconocimiento, distinción o categorización puede ser probabilístico. Por ejemplo, una cosa se puede identificar con una probabilidad aparente de al menos un 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o más. Se puede identificar una cosa en función del resultado de un análisis de máxima probabilidad. En algunos casos, una cosa se puede identificar con una probabilidad aparente del 100 %.

Como se usa en el presente documento, el término "imputar", cuando se usa en referencia a la identidad de nucleótidos, significa inferir la presencia de un tipo particular de nucleótido en una posición en el ácido nucleico en ausencia de observación de un evento detectable atribuible al nucleótido. Por ejemplo, la presencia de un primer tipo de nucleótido en una posición en un ácido nucleico se puede imputar basándose en la ausencia de una señal observada para el primer tipo de nucleótido. Opcionalmente, la imputación de la presencia del primer tipo de nucleótido en la posición puede verse influenciada por la observación de señal(es) para uno o más tipos de nucleótido en la posición.

Como se usa en el presente documento, el término "marcador" significa una molécula o fracción de la misma que proporciona una característica detectable. La característica detectable puede ser, por ejemplo, una señal óptica tal como absorbencia de radiación, emisión de fluorescencia, emisión de luminiscencia, duración de fluorescencia, polarización de fluorescencia o similares; Dispersión de Rayleigh y/o Mie; afinidad de unión por un ligando o receptor; propiedades magnéticas; propiedades eléctricas; carga; masa; radiactividad o similares. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, un fluoróforo, luminóforo, cromóforo, nanopartícula (por ejemplo, nanotubos de carbono, oro, plata), átomos pesados, isótopo radiactivo, marcador de masa, marcador de carga, marcador espín, receptor, ligando o similares.

Como se usa en el presente documento, el término "mezcla", cuando se usa en referencia a múltiples tipos de nucleótido, significa una combinación de dos o más tipos de nucleótido que están simultáneamente juntos, por ejemplo, en un líquido o en una superficie o como una combinación de los mismos. Una combinación a modo de ejemplo es un componente de reacción unido a la superficie que está en contacto con un componente en fase de solución. Una mezcla se puede distinguir de un compuesto químico en que las dos o más cosas diferentes no necesariamente tienen que estar en proporciones fijas, no necesitan perder sus características individuales y/o se pueden separar por medios físicos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "siguiente nucleótido correcto" se refiere al tipo de nucleótido que se unirá y/o incorporará en el extremo 3' de un cebador para complementar una base en una cadena de plantilla a la que se hibrida el cebador. La base en la cadena de plantilla se denomina "siguiente nucleótido de plantilla" y está inmediatamente en 5' de la base en la plantilla que se hibrida con el extremo 3' del cebador. El siguiente

nucleótido correcto se puede denominar como el "análogo" del siguiente nucleótido de plantilla y viceversa. Se dice que los nucleótidos análogos que interactúan entre sí en un complejo ternario o en un ácido nucleico bicatenario se "emparejan" entre sí. Un nucleótido que tiene una base que no es complementaria a la siguiente base de plantilla se denomina nucleótido "incorrecto", "erróneo" o "no análogo". Un "análogo de nucleótido" de un tipo de base específico (por ejemplo, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base, un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base, un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base o un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base) es un nucleótido que es complementario y/o capaz de emparejarse selectivamente con, el tipo de base específico (por ejemplo, emparejamiento preferentemente con un solo tipo de base específico sobre todos los otros tipos de base candidatos en una cadena de plantilla). Por ejemplo, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base (por ejemplo, de cuatro tipos posibles) es complementario a, y/o capaz de emparejarse con, un primer tipo de base y no con un tipo de base diferente (por ejemplo, un segundo, tercer o cuarto tipo de base). De manera análoga, por ejemplo, un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base (por ejemplo, de cuatro tipos posibles) es complementario a, y/o capaz de emparejarse con, un segundo tipo de base y no con un tipo de base diferente (por ejemplo, un primer, tercer o cuarto tipo de base). Un análogo de nucleótido puede o no ser el siguiente nucleótido correcto. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un análogo de nucleótido es el siguiente nucleótido correcto (es decir, el nucleótido es capaz de emparejarse con el tipo de base del siguiente nucleótido de plantilla). En realizaciones alternativas, un análogo de nucleótido no es el siguiente nucleótido correcto (es decir, el nucleótido no es capaz de emparejarse con el tipo de base del siguiente nucleótido de plantilla, sino que se empareja con otro tipo de nucleótido que no está presente en la siguiente posición de nucleótido de plantilla). En realizaciones, un análogo de nucleótido de un primer, segundo, tercer o cuarto tipo de base es capaz de emparejarse con un primer, segundo, tercer o cuarto tipo de base, respectivamente, y no con uno de los otros tres tipos de base. En realizaciones, los primeros, segundos, terceros o cuartos tipos de base son, respectivamente, A, C, G, T; A, C, T, G; A, G, C, T; A, G, T, C; A, T, C, G; A, T, G, C; C, G, T, A; C, G, A, T; C, T, G, A; C, T, A, G; C, A, G, C; C, A, C, G; G, T, A, C; G, T, C, A; G, A, C, T; G, A, T, C; G, C, T, A; G, C, A, T; C, G, T, A; C, G, A, T; C, T, G, A; C, T, A, G; C, A, G, T; o C, A, T, G, siendo todos marcadores de una sola letra comúnmente usadas para tipos de base de ADN. En realizaciones, los primeros, segundos, terceros o cuartos tipos de base son, respectivamente, A, C, G, U; A, C, U, G; A, G, C, U; A, G, U, C; A, U, C, G; A, U, G, C; C, G, U, A; C, G, A, U; C, U, G, A; C, U, A, G; C, A, G, C; C, A, C, G; G, U, A, C; G, U, C, A; G, A, C, U; G, A, U, C; G, C, U, A; G, C, A, U; C, G, U, A; C, G, A, U; C, U, G, A; C, U, A, G; C, A, G, U; o C, A, U, G.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ion metálico no catalítico" se refiere a un ion metálico que, cuando está en presencia de una enzima polimerasa, no facilita la formación de enlaces fosfodiéster necesarios para la incorporación covalente de un nucleótido en un cebador. Un ion metálico no catalítico puede interactuar con una polimerasa, por ejemplo, mediante unión competitiva en comparación con los iones metálicos catalíticos. Un "ion metálico no catalítico divalente" es un ion metálico no catalítico que tiene una valencia de dos. Los ejemplos de iones metálicos no catalíticos divalentes incluyen, pero sin limitación,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ . Los iones trivalentes  $\text{Eu}^{3+}$  y  $\text{Tb}^{3+}$  son iones metálicos no catalíticos que tienen una valencia de tres.

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se puede usar para referirse a un nucleótido nativo o análogo del mismo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, nucleótidos trifosfatos (NTP), tales como ribonucleótidos trifosfatos (rNTP), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP), o análogos no naturales de los mismos tales como didesoxirribonucleótidos trifosfatos (ddNTP) o nucleótidos trifosfatos de terminación reversiblemente (rtNTP).

Como se usa en el presente documento, el término "polimerasa" se puede usar para referirse a una enzima sintetizadora de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitación, ADN polimerasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, primasa y transferasa. Normalmente, la polimerasa tiene uno o más sitios activos en los que puede ocurrir la unión de nucleótidos y/o la catálisis de la polimerización de nucleótidos. La polimerasa puede catalizar la polimerización de nucleótidos en el extremo 3' de la primera cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por ejemplo, una polimerasa cataliza la adición de un siguiente nucleótido correcto al grupo de oxígeno en 3' de la primera cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenario a través de un enlace fosfodiéster, incorporando así de manera covalente el nucleótido a la primera cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenario. Opcionalmente, una polimerasa no necesita ser capaz de incorporar nucleótidos en una o más condiciones usadas en un método expuesto en el presente documento. Por ejemplo, una polimerasa mutante puede ser capaz de formar un complejo ternario pero incapaz de catalizar la incorporación de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "plantilla cebada", "ácido nucleico de plantilla cebado", o "plantilla de ácido nucleico cebado" se refiere a un híbrido de ácido nucleico que tiene una región bicatenaria de manera que una de las cadenas tiene un extremo 3' que se puede extender mediante una polimerasa (por ejemplo, mediante la unión covalente de un siguiente nucleótido correcto al extremo 3' de la cadena), opcionalmente después del desbloqueo de la cadena que va a extenderse mediante la polimerasa. Las dos cadenas pueden ser partes de una molécula contigua de ácido nucleico (por ejemplo, una estructura de horquilla) o las dos cadenas pueden ser moléculas separables que no están unidas covalentemente entre sí.

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" significa un ácido nucleico que tiene una secuencia que se une (por ejemplo, es complementaria) a un ácido nucleico en o cerca de una secuencia de plantilla.

Generalmente, el cebador se une en una configuración que permite la replicación de la plantilla, por ejemplo, a través de la extensión de la polimerasa del cebador (por ejemplo, el cebador puede necesitar desbloquearse antes de la replicación). En realizaciones, cuando se hibrida con una secuencia de plantilla, el cebador es capaz de unirse a una polimerasa (por ejemplo, permitiendo así la extensión del cebador). El cebador puede ser de cualquier longitud apropiada. El cebador puede ser una primera parte de una molécula de ácido nucleico que se une a una segunda parte de la molécula de ácido nucleico, siendo la primera parte una secuencia de cebador y la segunda parte una secuencia de unión a cebador (por ejemplo, un cebador en horquilla). Como alternativa, el cebador puede ser una primera molécula de ácido nucleico que se une a una segunda molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de plantilla. Un cebador puede consistir en ADN, ARN o análogos de los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "señal" se refiere a energía o información codificada que se puede observar selectivamente sobre otra energía o información, tal como energía o información previa. Una señal puede tener una característica deseada o predefinida. Por ejemplo, una señal óptica se puede caracterizar u observar por uno o más de intensidad, longitud de onda, energía, frecuencia, potencia, luminancia o similares. Se pueden cuantificar otras señales de acuerdo con características tales como voltaje, corriente, intensidad del campo eléctrico, intensidad del campo magnético, frecuencia, potencia, temperatura, etc. Se puede detectar una señal óptica a una intensidad, longitud de onda o color particular; se puede detectar una señal eléctrica a una frecuencia, potencia o intensidad de campo particular; u otras señales se pueden detectar en función de las características conocidas en la técnica relacionadas con la espectroscopía y la detección analítica. Se entiende por ausencia de señal un nivel de señal cero o un nivel de señal que no se distingue significativamente del ruido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "estado de señal" se refiere a un modo o característica de una señal obtenida de un detector. Los modos o características a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, longitud de onda de absorción de energía, longitud de onda de excitación luminiscente, longitud de onda de emisión de luminiscencia, intensidad de absorción de energía, intensidad de excitación luminiscente, intensidad de emisión de luminiscencia, estado de polarización, duración de luminiscencia, color. Un estado de señal puede tener múltiples posibles valores. Por ejemplo, un estado de señal puede tener dos posibles estados (binario), tres posibles estados (ternario), cuatro posibles estados (cuaternario), etc. Un ejemplo de un estado de señal binario es la presencia o ausencia de señal detectada en una longitud de onda particular. Otro ejemplo de un estado de señal binario es la emisión de luminiscencia detectada en una primera longitud de onda o en una segunda longitud de onda.

Como se usa en el presente documento, la expresión "complejo ternario" se refiere a una asociación intermolecular entre una polimerasa, un ácido nucleico bicatenario y un nucleótido. Normalmente, la polimerasa facilita la interacción entre un siguiente nucleótido correcto y una cadena de plantilla del ácido nucleico cebado. El siguiente nucleótido correcto puede interactuar con la cadena de plantilla a través de un enlace de hidrógeno Watson-Crick. La expresión "complejo ternario estabilizado" significa un complejo ternario que ha promovido o prolongado la existencia o un complejo ternario para el cual se ha inhibido la interrupción. Generalmente, la estabilización del complejo ternario evita la incorporación covalente del componente nucleotídico del complejo ternario en el componente de ácido nucleico cebado del complejo ternario.

Como se usa en el presente documento, el término "tipo" se usa para identificar moléculas que comparten la misma estructura química. Por ejemplo, una mezcla de nucleótidos puede incluir varias moléculas de dCTP. Se entenderá que las moléculas de dCTP son del mismo tipo entre sí, pero un tipo diferente en comparación con dATP, dGTP, dTTP, etc. De forma similar, las moléculas de ADN individuales que tienen la misma secuencia de nucleótidos son del mismo tipo, mientras que las moléculas de ADN con diferentes secuencias son de diferentes tipos. El término "tipo" también puede identificar fracciones que comparten la misma estructura química. Por ejemplo, se entenderá que las bases de citosina en un ácido nucleico de plantilla son del mismo tipo de base que las demás independientemente de su posición en la secuencia de plantilla.

Las realizaciones expuestas a continuación y enumeradas en las reivindicaciones se pueden entender a la vista de las definiciones anteriores.

La presente divulgación proporciona métodos para identificar el tipo de base en una o más posiciones de un ácido nucleico. Se puede llevar a cabo una reacción para formar un complejo ternario estabilizado, entre un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde solo está presente o detectable un subconjunto de los posibles tipos de nucleótido que son candidatos para formar análogos con bases en la plantilla. Las identidades de los nucleótidos en el subconjunto de nucleótidos se pueden determinar a partir de las señales detectadas, mientras que un nucleótido que no participa en la reacción (o al menos no produce una señal detectada en la reacción) se puede identificar por imputación. Se entenderá que, de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick, la identidad de una base análoga en una posición en un ácido nucleico se puede determinar fácilmente a partir de la identidad del tipo de nucleótido que está presente en un complejo ternario estabilizado formado en la posición.

En algunas realizaciones, el subconjunto de posibles tipos de nucleótido puede estar presente simultáneamente en una reacción de formación de complejo ternario. Por consiguiente, la divulgación proporciona un método de detección de ácido nucleico, que incluye las etapas de (a) formar una mezcla en condiciones de estabilización de

complejos ternarios, en donde la mezcla incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y análogos de nucleótido del primer, segundo y tercer tipo base en la plantilla; (b) examinar la mezcla para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b).

Como alternativa, diferentes tipos de nucleótido en un subconjunto de candidatos se pueden hacer reaccionar en serie con un ácido nucleico de plantilla en condiciones para formar un complejo ternario con una polimerasa. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos dos mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde las al menos dos mezclas separadas incluyen cada una una polimerasa y un nucleótido, por lo que el contacto secuencial da como resultado que el ácido nucleico de plantilla cebado se ponga en contacto, en las condiciones de estabilización de complejos ternarios, con análogos de nucleótido para el primer, segundo y tercer tipo base en la plantilla; (b) examinar las al menos dos mezclas separadas para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b).

En el presente documento se describen métodos basados en polimerasa para detectar ácidos nucleicos. Las realizaciones de los métodos explotan la especificidad con la que una polimerasa puede formar un complejo ternario estabilizado con un ácido nucleico de plantilla cebado y un siguiente nucleótido correcto. En realizaciones particulares, el siguiente nucleótido correcto está unido no covalentemente al complejo ternario estabilizado, interactuando con los otros miembros del complejo únicamente a través de interacciones no covalentes. Métodos y composiciones útiles para formar un complejo ternario estabilizado se exponen con más detalle a continuación y en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/851.383, que reclama el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/440.624; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/873.343, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/450.397.

Si bien se puede formar un complejo ternario entre una polimerasa, un ácido nucleico de plantilla cebado y el siguiente nucleótido correcto en ausencia de determinados iones metálicos catalíticos (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ), la adición química del nucleótido se inhibe en ausencia de los iones metálicos catalíticos. Los niveles bajos o deficientes de iones metálicos catalíticos provocan el secuestro no covalente del siguiente nucleótido correcto en un complejo ternario estabilizado. Otros métodos desvelados en el presente documento también se pueden usar para producir un complejo ternario estabilizado.

Opcionalmente, se puede formar un complejo ternario estabilizado cuando el cebador del ácido nucleico de plantilla cebado incluye una fracción de bloqueo (por ejemplo, una fracción de terminación reversible) que impide la incorporación enzimática de un nucleótido entrante en el cebador. La interacción puede tener lugar en presencia de estabilizadores, por lo que la interacción polimerasa-ácido nucleico se estabiliza en presencia del siguiente nucleótido correcto (es decir, estabilizadores que estabilizan el complejo ternario). El cebador del ácido nucleico de plantilla cebado puede ser opcionalmente un cebador extensible o un cebador bloqueado de la extensión en su extremo 3' (por ejemplo, por la presencia de una fracción de terminación reversible). El ácido nucleico de plantilla cebado, la polimerasa y el nucleótido análogo son capaces de formar un complejo ternario estabilizado cuando la base del nucleótido análogo es complementaria a la siguiente base del ácido nucleico de plantilla cebado (por ejemplo, el siguiente nucleótido de plantilla).

Como se ha expuesto anteriormente, las condiciones que favorecen o estabilizan un complejo ternario se pueden proporcionar mediante la presencia de un grupo de bloqueo que impida la incorporación enzimática de un nucleótido entrante en el cebador (por ejemplo, una fracción de terminación reversible en el nucleótido en 3' del cebador) o la ausencia de un ion metálico catalítico. Otras condiciones útiles incluyen la presencia de un agente estabilizador del complejo ternario tal como un ion no catalítico (por ejemplo, un ion metálico no catalítico divalente o trivalente) que inhibe la incorporación de nucleótidos o polimerización. Los iones metálicos no catalíticos incluyen, pero sin limitación, calcio, estroncio, escandio, titanio, vanadio, cromo, hierro, cobalto, níquel, cobre, cinc, galio, germanio, arsénico, selenio, rodio, europio y terbio. Opcionalmente, las condiciones que desfavorecen o desestabilizan los complejos binarios (es decir, complejos entre la polimerasa y el ácido nucleico cebado pero que carecen de un nucleótido análogo (por ejemplo, el siguiente nucleótido correcto)) se proporcionan por la presencia de uno o más cationes monovalentes y/o aniones glutamato. Como una opción adicional, se puede usar una polimerasa genomanipulada para tener una actividad catalítica reducida o una propensión reducida para la formación de complejos binarios.

Como se ha expuesto anteriormente, las condiciones de estabilización de complejos ternarios pueden acentuar la

diferencia en la afinidad de la polimerasa hacia los ácidos nucleicos de plantilla cebados en presencia de diferentes nucleótidos, por ejemplo, desestabilizando complejos binarios. Opcionalmente, las condiciones provocan afinidad diferencial de la polimerasa por el ácido nucleico de plantilla cebado en presencia de diferentes nucleótidos. A modo de ejemplo, las condiciones incluyen, pero sin limitación, iones ricos en sal y glutamato. Por ejemplo, la sal puede disolverse en solución acuosa para producir un catión monovalente, tal como un catión metálico monovalente (por ejemplo, ion sodio o ion potasio). Opcionalmente, la sal que proporciona los cationes monovalentes (por ejemplo, cationes metálicos monovalentes) proporciona además iones glutamato. Opcionalmente, la fuente de iones glutamato puede ser glutamato de potasio. En algunos casos, las concentraciones de glutamato de potasio que se pueden usar para alterar la afinidad de la polimerasa del ácido nucleico de plantilla cebado se extienden de 10 mM a 1,6 M de glutamato de potasio, o cualquier cantidad entre 10 mM y 1,6 M. Como se indicó anteriormente, rico en sal se refiere a una concentración de sal de 50 a 1.500 mM de sal.

Se entenderá que las opciones expuestas en el presente documento para estabilizar un complejo ternario no necesitan ser mutuamente excluyentes y, en cambio, se pueden usar en diversas combinaciones. Por ejemplo, un complejo ternario se puede estabilizar mediante uno o una combinación de medios que incluyen, pero sin limitación, reticulación de los dominios de polimerasa, reticulación de la polimerasa al ácido nucleico, mutaciones de polimerasa que estabilizan el complejo ternario, inhibición alostérica mediante moléculas pequeñas, inhibidores poco competitivos, inhibidores competitivos, inhibidores no competitivos, presencia de una fracción de bloqueo en el cebador, y otros medios expuestos en el presente documento.

Un complejo ternario estabilizado puede incluir un nucleótido natural, un análogo de nucleótido o un nucleótido modificado según se desee para adaptarse a una aplicación o configuración particular de los métodos. Opcionalmente, un análogo de nucleótido tiene una base nitrogenada, azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato, en donde cualquier fracción del nucleótido puede modificarse, eliminarse y/o reemplazarse en comparación con un nucleótido natural. Los análogos de nucleótido pueden ser nucleótidos no incorporables (es decir, nucleótidos que son incapaces de reaccionar con el oxígeno en 3' de un cebador para formar un enlace covalente). Dichos nucleótidos que son incapaces de incorporación incluyen, por ejemplo, nucleótidos monofosfato y difosfato. En otro ejemplo, el nucleótido puede contener modificaciones en el grupo trifosfato que hacen que el nucleótido no sea incorporable. Se pueden encontrar ejemplos de nucleótidos no incorporables en la patente de EE.UU. N.º 7.482.120. En algunas realizaciones, los nucleótidos no incorporables pueden modificarse posteriormente para convertirse en incorporables. Los análogos de nucleótido no incorporables incluyen, pero sin limitación, nucleótidos modificados con fosfato alfa, análogos de nucleótido alfa-beta, nucleótidos modificados con fosfato beta, análogos de nucleótido beta-gamma, nucleótidos modificados con fosfato gamma o nucleótidos enjaulados. Se describen ejemplos de análogos de nucleótido en la patente de EE.UU. N.º 8.071.755.

Los análogos de nucleótido que participan en complejos ternarios estabilizados pueden incluir terminadores que evitan reversiblemente la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del cebador después de que se haya incorporado el análogo. Por ejemplo, los documentos U.S. 7.544.794 y U.S. 8.034.923 describen terminadores reversibles en los que el grupo OH en 3' se reemplaza por una fracción ONH<sub>2</sub> en 3'. Otro tipo de terminador reversible está unido a la base nitrogenada de un nucleótido como se expone, por ejemplo, en el documento U.S. 8.808.989. Otros terminadores reversibles que se pueden usar de manera similar en relación con los métodos descritos en el presente documento incluyen los descritos en las referencias citadas anteriormente en el presente documento o en los documentos U.S. 7.956.171, U.S. 8.071.755 y U.S. 9.399.798. En determinadas realizaciones, una fracción de bloqueo reversible se puede eliminar de un cebador, en un proceso conocido como "desbloqueo", que permite la posterior incorporación de nucleótidos. Las composiciones y métodos para el desbloqueo se exponen en las referencias citadas en el presente documento en el contexto de terminadores reversibles.

Como alternativa, los análogos de nucleótido evitan irreversiblemente la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del cebador al que se han incorporado. Los análogos de nucleótido irreversibles incluyen 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTP, tales como ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP). Los didesoxinucleótidos carecen del grupo OH en 3' de dNTP que de otro modo participaría en la extensión del cebador mediada por polimerasa. Los nucleótidos terminados irreversiblemente pueden ser particularmente útiles para aplicaciones de genotipado.

En algunas realizaciones, un nucleótido que participa en la formación de un complejo ternario puede incluir un marcador exógeno. Por ejemplo, un nucleótido marcado exógenamente puede incluir una fracción de terminación reversible o irreversible, un nucleótido marcado exógenamente puede ser no incorporable, un nucleótido marcado exógenamente puede carecer de fracciones de terminación, un nucleótido marcado exógenamente puede ser incorporable o un nucleótido marcado exógenamente puede ser incorporable y no de terminación. Los nucleótidos marcados exógenamente pueden ser particularmente útiles cuando se usan para formar un complejo ternario estabilizado con una polimerasa no marcada. Como alternativa, un marcador exógeno en un nucleótido puede proporcionar un compañero en un par de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, de sus siglas en inglés) y un marcador exógeno en una polimerasa puede proporcionar el segundo compañero del par. Como tal, la detección de FRET se puede utilizar para identificar un complejo ternario estabilizado que incluye ambos compañeros. Como alternativa, un nucleótido que participa en la formación de un complejo ternario puede carecer de marcadores exógenos (es decir, el nucleótido puede estar "no marcado"). Por ejemplo, un nucleótido no marcado puede incluir una fracción de terminación reversible o irreversible, un nucleótido no marcado puede ser no

incorporable, un nucleótido no marcado puede carecer de fracciones de terminación, un nucleótido no marcado puede ser incorporable o un nucleótido no marcado puede ser incorporable y no de terminación. Los nucleótidos no marcados pueden ser útiles cuando se usa un marcador en una polimerasa para detectar un complejo ternario estabilizado. Los nucleótidos no marcados también pueden ser útiles en una etapa de extensión de un método SBB™. Se entenderá que la ausencia de una fracción o función para un nucleótido se refiere al nucleótido que no tiene tal función o fracción. Sin embargo, también se entenderá que una o más de las funciones o fracciones expuestas en el presente documento para un nucleótido, o análogo del mismo, o conocido de otro modo en la técnica para un nucleótido, o análogo del mismo, se pueden omitir específicamente en un método o composición expuesto en el presente documento.

Opcionalmente, un nucleótido (por ejemplo, un nucleótido natural o un análogo de nucleótido) está presente en una mezcla durante la formación de un complejo ternario estabilizado. Por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4 o más tipos de nucleótido pueden estar presente. Como alternativa o de modo adicional, como máximo pueden estar presentes 4, 3, 2 o 1 tipos de nucleótido. De forma similar, uno o más tipos de nucleótido que están presentes pueden ser complementarios a al menos 1, 2, 3 o 4 tipos de base en un ácido nucleico de plantilla. Como alternativa o de modo adicional, uno o más tipos de nucleótido que están presentes pueden ser complementarios a como máximo 4, 3, 2 o 1 tipos de base en un ácido nucleico de plantilla.

Cualquier modificación de nucleótidos que estabilice una polimerasa en un complejo ternario puede usarse en los métodos divulgados en el presente documento. El nucleótido puede unirse de forma permanente o transitoria a una polimerasa. Opcionalmente, un análogo de nucleótido se fusiona a una polimerasa, por ejemplo, a través de un conector covalente. Opcionalmente, una pluralidad de análogos de nucleótido se fusiona a una pluralidad de polimerasas, en donde cada análogo de nucleótido se fusiona a una polimerasa diferente. Opcionalmente, un nucleótido que está presente en un complejo ternario estabilizado no es el medio por el cual el complejo ternario se estabiliza. Por consiguiente, cualquiera de otros varios métodos de estabilización de complejos ternarios se puede combinar en una reacción utilizando un análogo de nucleótido.

En realizaciones particulares, la cadena de cebador de una molécula de ácido nucleico de plantilla cebado que está presente en un complejo ternario estabilizado no se modifica químicamente por la polimerasa que está presente durante una o más etapas de un método expuesto en el presente documento. Por ejemplo, el cebador no necesita extenderse mediante la formación de un nuevo enlace fosfodiéster, ni acortarse mediante degradación nucleolítica durante una etapa para formar un complejo ternario estabilizado, ni durante una etapa para examinar el complejo ternario estabilizado.

Se puede usar cualquiera de varias polimerasas para formar un complejo ternario estabilizado en un método expuesto en el presente documento. Las polimerasas que pueden usarse incluyen polimerasas naturales y variaciones modificadas de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, mutantes, recombinantes, fusiones, modificaciones genéticas, modificaciones químicas, sintéticas y análogas. Las polimerasas naturales y las variaciones modificadas de las mismas no se limitan a las polimerasas que tienen la capacidad de catalizar una reacción de polimerización. Opcionalmente, las naturales y/o variaciones modificadas de las mismas tienen la capacidad de catalizar una reacción de polimerización en al menos una condición que no se usa durante la formación o el examen de un complejo ternario estabilizado. Opcionalmente, las naturales y/o variaciones modificadas que participan en complejos ternarios estabilizados tienen propiedades modificadas, por ejemplo, afinidad de unión a ácidos nucleicos mejorada, afinidad de unión a ácidos nucleicos reducida, afinidad de unión a nucleótidos mejorada, afinidad de unión a nucleótidos reducida, especificidad mejorada para los próximos nucleótidos correctos, especificidad reducida para los próximos nucleótidos correctos, tasas de catálisis reducidas, inactividad catalítica, etc. Las polimerasas mutantes incluyen, por ejemplo, polimerasas en donde uno o más aminoácidos se reemplazan con otros aminoácidos, o inserciones o deleciones de uno o más aminoácidos.

Las polimerasas modificadas incluyen polimerasas que contienen una fracción marcador exógeno (por ejemplo, un fluoróforo exógeno), que puede usarse para detectar la polimerasa. Opcionalmente, la fracción marcador se puede unir después de que la polimerasa se haya purificado al menos parcialmente usando técnicas de aislamiento de proteínas. Por ejemplo, la fracción marcador exógeno se puede unir químicamente a la polimerasa usando un sulfhidrilo libre o una fracción amina libre de la polimerasa. Esto puede implicar un enlace químico a la polimerasa a través de la cadena lateral de un resto de cisteína, o a través del grupo amino libre del extremo N. Una fracción marcador exógeno también se puede unir a una polimerasa mediante fusión de proteínas. Las fracciones marcador de ejemplo que se pueden unir mediante fusión de proteínas incluyen, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), fibobiliproteínas (por ejemplo, ficocianina y ficoeritrina) o variantes de GFP o fibobiliproteínas de longitud de onda desplazada. En algunas realizaciones, un marcador exógeno en una polimerasa puede funcionar como miembro de un par de FRET. El otro miembro del par de FRET puede ser un marcador exógeno que está unido a un nucleótido que se une a la polimerasa en un complejo ternario estabilizado. Como tal, el complejo ternario estabilizado se puede detectar o identificar mediante la FRET.

Como alternativa, una polimerasa que participa en un complejo ternario estabilizado no necesita unirse a un marcador exógeno. Por ejemplo, la polimerasa no necesita estar unida covalentemente a un marcador exógeno. En cambio, la polimerasa puede carecer de cualquier marcador hasta que se asocie con un nucleótido marcado y/o

ácido nucleico marcado (por ejemplo, cebador marcado y/o plantilla marcada).

Un complejo ternario que se hace o usa de acuerdo con la presente divulgación puede incluir opcionalmente uno o más marcadores exógenos. El marcador se puede unir a un componente del complejo ternario (por ejemplo, unirse a la polimerasa, ácido nucleico de plantilla, cebador y/o nucleótido análogo) antes de la formación del complejo ternario. Las uniones a modo de ejemplo incluyen uniones covalentes o uniones no covalentes tales como las expuestas en el presente documento, en referencias citadas en el presente documento o conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, un componente marcado se administra en solución a un soporte sólido que se une a un componente no marcado, por lo que el marcador se recluta en el soporte sólido en virtud de formar un complejo ternario estabilizado. Como tal, el componente unido al soporte se puede detectar o identificar basándose en la observación del marcador reclutado. Ya sea que se use en la fase de solución o en un soporte sólido, los marcadores exógenos pueden ser útiles para detectar un complejo ternario estabilizado o un componente individual del mismo, durante una etapa de examen. Un marcador exógeno puede permanecer unido a un componente después de que el componente se disocia de otros componentes que habían formado un complejo ternario estabilizado. Ejemplos de marcadores, métodos para unir marcadores y métodos para usar componentes marcados se exponen en la publicación de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/851.383, que reclama el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/440.624; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/873.343, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/450.397.

Los ejemplos de marcadores exógenos útiles incluyen, pero sin limitación, fracciones radiomarcadas, fracciones de luminóforo, fracciones fluoróforas, fracciones de puntos cuánticos, fracciones cromóforas, fracciones enzimáticas, fracciones marcadas de espín electromagnéticos, fracciones de dispersión de luz de nanopartículas, y cualquiera de otras varias fracciones generadoras de señal conocidas en la técnica. Las fracciones enzimáticas adecuadas incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Las fracciones fluoróforas a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato, rodamina, tetrametil rodamina, eosina, proteína fluorescente verde, eritrosina, cumarina, metil cumarina, pireno, verde malaquita, estilbeno, lucifer yellow™, Cascade Blue™, Texas Red™, cloruro de dansilo, ficoeritrina, ficocianina, complejos de lantánidos fluorescentes, tales como los que incluyen europio y terbio, Cy3, Cy5 y otros conocidos en la técnica, tales como los descritos en Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz (Editor), Plenum Pub Corp, 2ª edición (julio de 1999) y la 6ª edición de Edition of Molecular Probes Handbook de Richard P. Hoagland.

Se entenderá que en algunas realizaciones se puede detectar una característica de señal particular a partir de diferentes marcadores. En otras palabras, los marcadores que tienen diferentes estructuras químicas se pueden usar para producir un estado de señal similar. El uso de diferentes marcadores puede ser ventajoso para optimizar el comportamiento químico mientras se logra una acción de detección deseada. Por ejemplo, una etapa de examen puede observar un conjunto de complejos ternarios formados por una mezcla de análogos de nucleótido, en donde todos los análogos de nucleótido incluyen el mismo tipo de base pero los análogos individuales en la mezcla tienen diferentes marcadores. La mezcla de nucleótidos puede incluir marcadores que emiten luminiscencia a una longitud de onda deseada, pero la distribución de los marcadores en la mezcla se puede seleccionar para optimizar la afinidad de unión promedio de la mezcla por la polimerasa. Por lo tanto, un método expuesto en el presente documento puede detectar el mismo estado de señal a partir de diferentes marcadores que tienen una característica común de producción de señal.

Se puede usar un marcador secundario en un método de la presente divulgación. Un marcador secundario es una fracción de unión que puede unirse específicamente a una fracción marcada asociada. Por ejemplo, una fracción de ligando puede unirse a una polimerasa, ácido nucleico o nucleótido para permitir la detección por afinidad específica por el receptor marcado. Los ejemplos de pares de fracciones de unión que se pueden usar incluyen, sin limitación, antígeno e inmunoglobulina o fragmentos activos de la misma, tales como FAb; inmunoglobulina e inmunoglobulina (o fragmentos activos, respectivamente); avidina y biotina, o análogos de los mismos que tienen especificidad por avidina; estreptavidina y biotina, o análogos de los mismos que tienen especificidad por estreptavidina; o hidratos de carbono y lectinas.

En algunas realizaciones, el marcador secundario puede ser una fracción químicamente modificable. En esta realización, los marcadores que tienen grupos funcionales reactivos se pueden incorporar en un complejo ternario estabilizado. Posteriormente, el grupo funcional puede reaccionar covalentemente con una fracción marcador primario. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos amino, grupos carboxi, grupos de maleimida, grupos oxo y grupos tiol.

En realizaciones alternativas, un complejo ternario puede carecer de marcadores exógenos. Por ejemplo, un complejo ternario y todos los componentes que participan en el complejo ternario (por ejemplo, polimerasa, ácido nucleico de plantilla, cebador y/o nucleótido análogo) pueden carecer de uno, varios o todos los marcadores exógenos descritos en el presente documento o en las referencias incorporadas anteriormente. En dichas realizaciones, los complejos ternarios se pueden detectar basándose en las propiedades intrínsecas del complejo



ternario estabilizado, tales como masa, carga, propiedades ópticas intrínsecas o similares. Métodos a modo de ejemplo para detectar complejos ternarios no marcados se exponen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1, la solicitud PCT N.º de serie PCT/US16/68916 (publicada como el documento WO 2017/117243) o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/375.379.

Un método de la presente divulgación puede incluir una etapa de examen. Generalmente, la detección se puede lograr en una etapa de examen mediante métodos que perciben una propiedad que es intrínseca a un complejo ternario o a una fracción marcador unida al mismo. Las propiedades a modo de ejemplo en las que se puede basar la detección incluyen, pero sin limitación, masa, conductividad eléctrica, absorbencia de energía, luminiscencia (por ejemplo, fluorescencia) o similares. La detección de luminiscencia se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica relacionados con matrices de ácido nucleico. Se puede detectar un luminóforo en función de cualquiera de varias propiedades de luminiscencia que incluyen, por ejemplo, longitud de onda de emisión, longitud de onda de excitación, intensidad de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), enfriamiento, anisotropía o vida útil. Otras técnicas de detección que se pueden usar en un método expuesto en el presente documento incluyen, por ejemplo, espectrometría de masas que se puede usar para percibir masas; resonancia de plasmón superficial que se puede usar para percibir la unión a una superficie; absorbencia que se puede usar para percibir la longitud de onda de la energía que absorbe un marcador; calorimetría que se puede usar para percibir cambios en la temperatura debido a la presencia de un marcador; conductancia o impedancia eléctrica que se puede usar para percibir las propiedades eléctricas de un marcador u otras técnicas analíticas conocidas. Los ejemplos de reactivos y condiciones que se pueden usar para crear, manipular y detectar complejos ternarios estabilizados incluyen, por ejemplo, los expuestos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1; la solicitud PCT de n.º de serie PCT/US16/68916 (publicada como el documento WO 2017/117243); o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/851.383, que reclama el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/440.624; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/873.343, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/450.397.

En realizaciones particulares, no se detecta señal para el complejo ternario estabilizado formado con un tipo de nucleótido particular y se imputa la identidad del nucleótido. En dichas realizaciones, un ácido nucleico de plantilla cebado no necesita ponerse en contacto con ese nucleótido particular durante ninguno o todas las etapas de examen o detección del método. Como alternativa, el nucleótido particular puede estar presente durante una etapa de examen, pero no ser detectable en las condiciones empleadas. Por ejemplo, el nucleótido puede formar un complejo ternario estabilizado que no es detectable. La falta de detectabilidad puede proceder de la ausencia de un marcador exógeno en el nucleótido o en la polimerasa a la que se une en el complejo ternario estabilizado, o la falta de detectabilidad puede proceder del uso de una condición de detección que no está configurada para detectar un marcador que está presente en el nucleótido o en la polimerasa a la que se une en el complejo ternario estabilizado. Tal como se expone con más detalle a continuación, uno o más tipos de nucleótido que no están presentes durante una etapa de examen, sin embargo, pueden proporcionarse durante una etapa de extensión.

Puede ser ventajoso incluir los cuatro tipos diferentes de nucleótidos en una mezcla, aunque la mezcla se examinará solo para un subconjunto de tipos de complejos ternarios. Por ejemplo, la mezcla puede incluir nucleótidos que tienen los cuatro tipos de base, en donde un primer subconjunto de nucleótidos (por ejemplo, A y G) tiene un marcador que se detecta y un segundo subconjunto de nucleótidos (por ejemplo, C y T) no tiene el marcador que se detecta. La presencia de los cuatro tipos de nucleótido en una mezcla puede ayudar a evitar la formación de complejos ternarios que tienen nucleótidos no análogos porque los nucleótidos correctos estarán presentes para competir con los nucleótidos incorrectos en la mezcla de unión. Por lo tanto, la presencia de los cuatro tipos de nucleótido puede favorecer la formación de complejos ternarios que tienen nucleótidos análogos correctamente unidos para mejorar la precisión de los resultados de secuenciación.

Las realizaciones particulares de los métodos expuestos en el presente documento incluyen una etapa de formar una mezcla que incluye varios componentes. Por ejemplo, se puede formar una mezcla entre un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y uno o más tipos de nucleótido. Los componentes de la mezcla se pueden administrar a un recipiente en cualquier orden deseado o se pueden administrar simultáneamente. Asimismo, algunos de los componentes se pueden mezclar entre sí para formar una primera mezcla que posteriormente se pone en contacto con otros componentes para formar una mezcla más compleja. Tomando como ejemplo, una etapa para formar una mezcla que incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y una pluralidad de diferentes tipos de nucleótido, se entenderá que los diferentes tipos de nucleótido en la pluralidad se pueden poner en contacto entre sí antes de ponerse en contacto con el ácido nucleico de plantilla cebado. Como alternativa, dos o más de los tipos de nucleótido se pueden administrar por separado al ácido nucleico de plantilla cebado y/o a la polimerasa. Como tal, un primer tipo de nucleótido se puede poner en contacto con el ácido nucleico de plantilla cebado antes de ponerse en contacto con un segundo tipo de nucleótido. Como alternativa o de modo adicional, el primer tipo de nucleótido se puede poner en contacto con la polimerasa antes de ponerse en contacto con un segundo tipo de nucleótido.

Algunas realizaciones de los métodos expuestos en el presente documento utilizan dos o más señales distinguibles

para distinguir complejos ternarios estabilizados entre sí y/o para distinguir un tipo de base en un ácido nucleico de plantilla de otro tipo de base. Por ejemplo, dos o más luminóforos se pueden distinguir entre sí en función de propiedades ópticas únicas, tales como la longitud de onda única para la excitación o la longitud de onda única de emisión. En realizaciones particulares, un método puede distinguir diferentes complejos ternarios estabilizados basados en diferencias en la intensidad de luminiscencia. Por ejemplo, un primer complejo ternario se puede detectar en una condición en la que emite menos intensidad que un segundo complejo ternario. Dicha escala de intensidad (a veces llamada 'escala de grises') puede explotar cualquier diferencia de intensidad distinguible. La diferencia a modo de ejemplo incluye un complejo ternario estabilizado particular que tiene una intensidad que es un 10 %, 25 %, 33 %, 50 %, 66 % o 75 % en comparación con la intensidad de otro complejo ternario estabilizado que se va a detectar.

Las diferencias de intensidad se pueden lograr utilizando diferentes luminóforos, cada uno con un coeficiente de extinción diferente (es decir, dando como resultado diferentes propiedades de excitación) y/o un rendimiento cuántico de luminiscencia diferente (es decir, dando como resultado diferentes propiedades de emisión). Como alternativa, se puede usar el mismo tipo de luminóforo, pero puede estar presente en diferentes cantidades. Por ejemplo, todos los miembros de una primera población de complejos ternarios se pueden marcar con un luminóforo particular, mientras que una segunda población tiene solo la mitad de sus miembros marcados con el luminóforo. En este ejemplo, se esperaría que la segunda población produzca la mitad de la señal de la primera población. La segunda población se puede producir, por ejemplo, usando una mezcla de nucleótidos marcados y nucleótidos no marcados (en contraste con la primera población que contiene nucleótidos marcados principalmente). De forma similar, la segunda población se puede producir, por ejemplo, usando una mezcla de polimerasas marcadas y polimerasas no marcadas (en contraste con la primera población que contiene polimerasas marcadas principalmente). En un esquema de marcaje alternativo, una primera población de complejos ternarios puede incluir moléculas de polimerasa que tienen múltiples marcadores que producen una señal luminiscente particular y una segunda población de complejos ternarios puede incluir moléculas de polimerasa que tienen solo una de los marcadores que producen la señal luminiscente.

La presente divulgación proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) examinar los productos de las etapas (a) y (b) para detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y segundo tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base; (d) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (c) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto. Opcionalmente, para lograr la desambiguación (i) el primer tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b), (ii) el segundo tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la ausencia de señales para el producto de la etapa (b), y (iii) el tercer tipo de base se correlaciona con la ausencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b).

También se proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera mezcla que incluye una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la plantilla, en donde el contacto ocurre en una reacción de unión que (i) estabiliza complejos ternarios que incluyen el ácido nucleico de plantilla cebado, la polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, y (ii) evita la incorporación del siguiente nucleótido correcto en el cebador; (b) examinar la reacción de unión para determinar si se formó un complejo ternario; (c) someter el ácido nucleico de plantilla cebado a una repetición de las etapas (a) y (b), en donde la primera mezcla se reemplaza con una segunda mezcla, incluyendo la segunda mezcla una polimerasa, un análogo de nucleótido del primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base en la plantilla; y (d) identificar el siguiente nucleótido correcto para el ácido nucleico de plantilla cebado utilizando el examen de las reacciones de unión, o un producto de la misma, en donde (i) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b), (ii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del segundo tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y no se detecta en la repetición de la etapa (b) y (iii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del tercer tipo de base si no se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b).

En realizaciones particulares, un ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con dos o más mezclas en condiciones de estabilización de complejos ternarios. El ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto secuencialmente con las mezclas. Por ejemplo, un ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con una polimerasa y nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios y

luego la polimerasa se puede reemplazar con otra polimerasa en condiciones de estabilización de complejos ternarios. Como alternativa o de modo adicional, uno o más de los nucleótidos se pueden reemplazar con uno o más de otros nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios. En algunas realizaciones, la polimerasa y todos los nucleótidos de la primera mezcla se reemplazan con otra polimerasa y otros nucleótidos. En una realización alternativa, dos o más mezclas pueden estar en contacto simultáneo con un ácido nucleico de plantilla cebado en condiciones de estabilización de complejos ternarios.

En muchas realizaciones, un ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con dos o más mezclas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la primera mezcla se forma con el ácido nucleico de plantilla cebado y al menos un tipo de nucleótido que difiere de al menos un tipo de nucleótido presente en la segunda mezcla. En dichos casos, el mismo tipo de polimerasa puede estar presente tanto en la primera como en la segunda mezcla, ya sea porque la polimerasa no se elimina de la primera mezcla cuando se forma la segunda mezcla o porque la polimerasa se elimina de la primera mezcla y se reemplaza por una polimerasa del mismo tipo. También es posible reemplazar la polimerasa de una primera mezcla con una polimerasa de un tipo diferente cuando se forma la segunda mezcla. El reemplazo de polimerasa se puede usar, por ejemplo, para explotar diferentes propiedades o actividades. Por ejemplo, una primera mezcla puede incluir un primer tipo de nucleótido y una primera polimerasa que tiene una afinidad o especificidad relativamente alta por el primer tipo de nucleótido, y la segunda mezcla puede tener un segundo tipo de nucleótido y una segunda polimerasa que tiene una afinidad o especificidad relativamente alta por el segundo tipo de nucleótido. En este ejemplo, la primera polimerasa puede tener una mayor afinidad o especificidad por el primer nucleótido en comparación con el segundo tipo de nucleótido. Como alternativa o de modo adicional, la segunda polimerasa puede tener una mayor afinidad o especificidad por el segundo tipo de nucleótido en comparación con el primer tipo de nucleótido. En otro ejemplo, puede ser deseable que la segunda mezcla incluya una polimerasa que se convierta más convenientemente de un estado estabilizado de complejo ternario a un estado extensor de cebador (en comparación con la polimerasa utilizada para formar el primer complejo ternario).

En realizaciones donde un ácido nucleico de plantilla cebado se pone en contacto secuencialmente con dos o más mezclas de polimerasa-nucleótido en condiciones de estabilización de complejos ternarios, el examen se puede llevar a cabo después de cada contacto secuencial. Por ejemplo, el ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con una polimerasa y un nucleótido para formar una primera mezcla, luego la primera mezcla se puede examinar para determinar la formación del complejo ternario, luego el ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con una polimerasa y un nucleótido para formar una segunda mezcla, y luego la segunda mezcla se puede examinar para determinar la formación del complejo ternario. Como alternativa, se pueden formar dos o más mezclas antes de llevar a cabo una etapa de examen. Como tal, el examen no necesita intervenir dos o más etapas secuenciales de poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con reactivos para formar complejos ternarios estabilizados.

Una o más etapas de lavado pueden ser útiles para separar un ácido nucleico de plantilla cebado de otros reactivos que se pusieron en contacto con el ácido nucleico de plantilla cebado en condiciones de estabilización de complejos ternarios. Dicho lavado puede eliminar uno o más reactivos a partir de la interferencia con el examen de una mezcla o a partir de la contaminación de una segunda mezcla que se formará en un sustrato (o en un recipiente) que previamente había estado en contacto con la primera mezcla. Por ejemplo, un ácido nucleico de plantilla cebado puede ponerse en contacto con una polimerasa y al menos un tipo de nucleótido para formar una primera mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, y la primera mezcla se puede examinar. Opcionalmente, se puede llevar a cabo un lavado antes del examen para eliminar los reactivos que no participan en la formación de un complejo ternario estabilizado. Como alternativa o de modo adicional, se puede llevar a cabo un lavado después de la etapa de examen para eliminar uno o más componentes de la primera mezcla del ácido nucleico de plantilla cebado. Luego, el ácido nucleico de plantilla cebado se puede poner en contacto con una polimerasa y al menos otro nucleótido para formar una segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, y la segunda mezcla se puede examinar para determinar la formación de complejo ternario. Como antes, se puede llevar a cabo un lavado opcional antes del segundo examen para eliminar los reactivos que no participan en la formación de un complejo ternario estabilizado.

Un método expuesto en el presente documento, puede incluir una etapa de examen de una mezcla que incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la plantilla, en donde las señales adquiridas de la mezcla son ambiguas para el primer y segundo tipo de base. La ambigüedad puede surgir, por ejemplo, cuando se adquieren señales de un marcador exógeno unido a la polimerasa, de modo que las señales no distinguen qué tipo de nucleótido está presente en un complejo ternario estabilizado que se detecta a través del marcador. La ambigüedad puede surgir cuando los nucleótidos en la mezcla no tienen marcadores exógenos o cuando los diferentes nucleótidos no tienen marcadores únicos. Por ejemplo, cuando dos o más nucleótidos en una mezcla están unidos al mismo tipo de marcador exógeno (o a diferentes marcadores exógenos que producen una señal superpuesta), una señal que surge de la mezcla, aunque indica la presencia de un complejo ternario, puede no proporcionar información adecuada para distinguir un complejo ternario que tiene uno de los nucleótidos de un complejo ternario que tiene el otro nucleótido. Sin embargo, en algunas realizaciones que producen una señal ambigua, la identidad de los nucleótidos se puede desambiguar mediante el examen del mismo ácido nucleico de

plantilla cebado en presencia de una segunda mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios. Específicamente, la segunda mezcla puede carecer de uno de los tipos de nucleótido que estaba en la primera mezcla. El tipo de nucleótido que estaba presente en ambas mezclas se puede identificar en función del hecho de que se detectó señal en ambas mezclas, mientras que un tipo de nucleótido que estaba presente en una primera mezcla y no en la segunda mezcla se puede identificar en función de la presencia de señal en la primera mezcla y la falta de señal en la segunda mezcla. Varios ejemplos específicos, que utilizan desambiguación se exponen en los Ejemplos a continuación (véanse las Tablas 2-5). Un método de desambiguación particularmente útil utiliza un esquema de codificación, mediante el cual la serie de señales detectadas a partir de la serie de mezclas produce una palabra clave, y la palabra clave se decodifica para hacer una lectura de base. Las realizaciones a modo de ejemplo que usan una palabra clave para la desambiguación se exponen a continuación en los Ejemplos 8 y 9.

Una ventaja de los métodos de desambiguación expuestos en el presente documento es que el número de diferentes tipos de nucleótido que se identifican de forma única puede superar el número de señales únicas detectadas (o el número de marcadores utilizados). Por ejemplo, se pueden distinguir dos o más tipos de nucleótido en un método expuesto en el presente documento basado en la detección de una señal que es común a ambos. A modo de ejemplo adicional, las señales de una primera mezcla que tiene un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y dos o más nucleótidos pueden ser adquiridas por un detector que también se utiliza para detectar señales de una segunda mezcla que tiene el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y dos o más nucleótidos. En este ejemplo, la primera mezcla puede incluir un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base, mientras que la segunda mezcla puede incluir un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base. Como una opción adicional en este ejemplo, las señales adquiridas para la primera mezcla pueden ser ambiguas para el primer y segundo tipo de base, y las señales adquiridas para la segunda mezcla pueden ser ambiguas para el primer y el tercer tipo de base.

Como se ejemplifica en varias realizaciones expuestas en el presente documento, se pueden distinguir tres tipos de base en una posición particular de un ácido nucleico de plantilla cebado usando tan solo dos reacciones de unión y tan solo un tipo de marcador. En dichas realizaciones, la primera reacción de unión incluye un primer y segundo tipo de nucleótido, y la segunda reacción de unión incluye el primer tipo de nucleótido y un tercer tipo de nucleótido. El resultado final es que el primer tipo de nucleótido se determina cuando se observa la señal de los complejos ternarios estabilizados formados en ambas reacciones, el segundo tipo de nucleótido se determina cuando se observa la señal para un complejo ternario formado en la primera reacción solamente, y el tercer tipo de nucleótido se determina cuando se observa la señal para un complejo ternario formado en la segunda reacción solamente. En este ejemplo, el cuarto tipo de nucleótido no necesita participar en una reacción de unión con la plantilla cebada o, incluso si el cuarto nucleótido está presente, no necesita ser detectado. Más bien, el cuarto nucleótido se puede identificar por imputación. De manera más específica, en el caso donde la plantilla es un ácido nucleico natural (por ejemplo, ADN genómico o ARNm), se sabe que solo cuatro tipos de nucleótido estarán presentes en la plantilla y la ausencia de señal en ambas reacciones de unión se puede usar para imputar que el cuarto tipo de base estaba presente en la posición de plantilla bajo examen.

Como alternativa a la imputación del cuarto tipo de nucleótido en el ejemplo anterior, se puede realizar una tercera reacción de unión usando el cuarto tipo de base y se puede detectar un complejo ternario estabilizado que incluye el cuarto tipo de base. Esta alternativa proporciona la ventaja de confirmar los resultados de las dos primeras reacciones de unión basadas en observaciones de resultados consistentes (por ejemplo, el cuarto tipo de nucleótido se observa solo en la tercera reacción de unión) o identificar un posible error cuando se obtienen resultados inconsistentes (por ejemplo, el cuarto tipo de nucleótido se observa en la tercera reacción de unión y en la primera o segunda reacción de unión). Esta alternativa aún puede proporcionar la ventaja de requerir menos etapas de administración de reactivos que el número de tipos de nucleótido distinguidos (es decir, cuatro tipos de nucleótido se distinguen a partir de 3 etapas de administración de reactivos) utilizando tan solo un tipo de marcador.

Como se demuestra mediante los ejemplos expuestos en el presente documento, se pueden distinguir cuatro tipos de base en una posición particular de un ácido nucleico de plantilla cebado mediante el examen de productos de una primera reacción de unión que incluye complejos ternarios detectables que tienen el primer y segundo tipo de nucleótido pero carece de complejos ternarios detectables que tengan el tercer y cuarto tipo de nucleótido, y el examen de productos de una segunda reacción de unión que incluye complejos ternarios detectables que tienen el primer tipo de nucleótido y el tercer tipo de nucleótido pero carece de complejos ternarios detectables que tienen el segundo y cuarto tipo de nucleótido. No es necesario realizar ni examinar una tercera reacción de unión. En este caso, se puede mejorar la velocidad y/o reducir los costes empleando la imputación para identificar el cuarto tipo de nucleótido. Sin embargo, si se desea, por ejemplo, mejorar la precisión de la secuenciación, se puede llevar a cabo un examen para una tercera reacción de unión que incluye complejos ternarios detectables que tienen solo el cuarto tipo de nucleótido, o que incluye complejos ternarios detectables que tienen el cuarto tipo de nucleótido junto con complejos ternarios detectables que tienen otro tipo de nucleótido (pero no más de otro tipo de nucleótido).

Generalmente, la precisión se puede mejorar mediante la repetición de las etapas de administración y examen de reactivo de un método expuesto en el presente documento cuando se evalúa una posición particular en un ácido nucleico de plantilla cebado. De esta manera, la posición se puede probar varias veces por su capacidad para formar

un complejo ternario con un tipo particular de nucleótido. De hecho, los cuatro tipos de nucleótido se pueden evaluar en serie o de forma repetitiva para determinar la capacidad de formar complejos ternarios en una posición particular en una plantilla cebada. En una realización de secuenciación por unión (Sequencing By Binding™), la evaluación puede proceder en una posición posterior de la plantilla cebada mediante la realización de una etapa de extensión de cebador siguiendo las etapas de examen en serie o repetidos.

Por consiguiente, esta divulgación proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos cuatro mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado; (b) examinar las al menos cuatro mezclas separadas para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en al menos dos de las mezclas.

En un aspecto, se proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos cuatro mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado y cada una de las mezclas incluye una combinación diferente de un análogo de nucleótido para al menos dos de cuatro tipos de base diferentes en el ácido nucleico de plantilla cebado; (b) examinar las al menos cuatro mezclas separadas para detectar complejos ternarios; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo de uno de los cuatro tipos de base diferentes si se detecta complejo ternario en al menos dos de las mezclas.

También se proporciona un método de detección de ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en una posición de nucleótido en la plantilla, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; (b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una tercera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la tercera mezcla incluye un análogo de nucleótido del segundo tipo de base y un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base; (d) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una cuarta mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la cuarta mezcla incluye un análogo de nucleótido del tercer tipo de base y un análogo de nucleótido del cuarto tipo de base; (e) examinar los productos de las etapas (a) a (d) para detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y segundo tipo de base, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (c) son ambiguas para el segundo y cuarto tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (d) son ambiguas para el tercer y cuarto tipo de base; (f) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (e) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto.

Las realizaciones particulares de los métodos expuestos en el presente documento utilizan un esquema de codificación que puede proporcionar lectura de base, detección de errores e incluso corrección de errores. Los diferentes tipos de base se pueden codificar mediante series de estados de señal en varios exámenes, de modo que la decodificación de la serie permite no solo leer la base, sino que también permite identificar una lectura de base no válida de modo que se pueda detectar un error. La corrección de errores es posible para un esquema de codificación suficientemente complejo.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para determinar una secuencia de ácido nucleico que incluye las etapas de: (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una serie de mezclas para formar complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos tipos de base diferentes sospechosos de estar presentes en la siguiente posición del ácido nucleico de plantilla; (b) controlar la siguiente posición de plantilla para complejos ternarios formados por la serie de mezclas, en donde un estado de señal indica presencia o ausencia de complejo ternario formado en la siguiente posición de plantilla por cada mezcla individual, determinando así una serie de estados de señal que codifica una lectura de base para la siguiente posición de plantilla; y (c) decodificar la serie de estados de señal para distinguir una lectura de base correcta para la siguiente posición de plantilla de un error en la lectura de base.

En realizaciones particulares, se usa un esquema de codificación que identifica lecturas de base válidas y las distingue de las lecturas de base no válidas. Como tal, el esquema de codificación proporciona un código de

detección de errores. Los esquemas de codificación útiles incluyen los desarrollados para las telecomunicaciones, la teoría de la codificación y la teoría de la información, tal como los expuestos en Hamming, Coding and Information Theory, 2ª Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ (1986).

5 Un código de detección de errores relativamente sencillo es un código de repetición. En este esquema, se realizan una serie de exámenes en una posición particular de un ácido nucleico de plantilla de manera que se espera que el estado de señal adquirido de cada examen sea discreto para cada tipo de complejo ternario. Por ejemplo, el complejo ternario formado por cada tipo diferente de nucleótido análogo puede tener un marcador único y el mismo marcador se puede usar para el respectivo tipo de complejo ternario en cada examen. Los estados de señal detectados de la serie de exámenes se pueden representar como una serie de dígitos que forman una palabra clave. Una lectura de base se identifica como válida cuando la palabra clave contiene solo dígitos repetidos, mientras que la presencia de diferencias entre los dígitos en la palabra clave indica un error.

15 Un esquema de codificación útil puede utilizar un código de paridad. En este esquema, los estados de señal adquiridos de cada examen se representan por un dígito binario, por ejemplo, '1' para una señal que indica la presencia de un complejo ternario y '0' para la ausencia de la señal. Los estados de señal detectados de una serie de exámenes se pueden representar como una serie de los dígitos para formar una palabra clave, teniendo la palabra clave una longitud equivalente al número de exámenes. Las palabras clave se pueden asignar de modo que el número total de dígitos '1' en las palabras clave para lecturas de base válidas sea par o impar. Por consiguiente, las palabras clave que tienen la paridad seleccionada se identificarán como lecturas válidas, mientras que las palabras clave que tienen la otra paridad se identificarán como lecturas no válidas.

25 Los esquemas de codificación que usan un código repetitivo o de paridad, aunque son capaces de detectar errores, tienen acciones limitadas cuando se trata de corregir errores. Por ejemplo, cuando se usa un código repetitivo que tiene tres o más dígitos binarios, se puede corregir un error por mayoría de votos, en donde un valor anómalo para un dígito se revierte al mismo valor que la mayoría de dígitos en la palabra clave. Esto funciona de manera muy similar a la redundancia modular triple en informática en la que tres sistemas realizan un proceso y ese resultado es procesado por un sistema de votación mayoritaria para producir una única salida. En algunas realizaciones, la información de un esquema de codificación se puede combinar con otras observaciones empíricas o expectativas teóricas para corregir un error. Por ejemplo, la presencia de un valor incorrecto para un dígito en una palabra clave se puede correlacionar con una anomalía en un procedimiento, reactivo o aparato utilizado para producir el dígito, y el valor del dígito se puede cambiar para compensar la anomalía. Las anomalías a modo de ejemplo que se pueden corregir incluyen, pero sin limitación, una relación señal a ruido por debajo de un umbral predeterminado, intensidad de señal por debajo de un umbral predeterminado, intensidad de señal por encima de un umbral predeterminado, ruido por encima de un umbral predeterminado, mal funcionamiento del detector, mal funcionamiento de la administración de líquidos, mal funcionamiento del control de temperatura o calidad del reactivo por debajo de un umbral predeterminado.

40 Un esquema de codificación particularmente útil utiliza un código de Hamming. Un código de Hamming puede proporcionar detección de errores y, en varias realizaciones, también proporciona corrección de errores. En este esquema, los estados de señal detectados de una serie de exámenes se pueden representar como una serie de los dígitos para formar una palabra clave, teniendo la palabra clave una longitud equivalente al número de exámenes. Los dígitos pueden ser binarios (por ejemplo, tener un valor de 1 para presencia de señal y un valor de 0 para ausencia de señal) o los dígitos pueden tener una raíz más alta (por ejemplo, un dígito ternario que tiene un valor de 1 para luminiscencia en una primera longitud de onda, un valor de 2 para luminiscencia en una segunda longitud de onda y un valor de 0 para ninguna luminiscencia en esas longitudes de onda). Las acciones de corrección de errores se proporcionan cuando los códigos inválidos se pueden cambiar sin ambigüedad a un código válido particular debido a una distancia de Hamming apropiada entre códigos válidos. En el ejemplo 9 a continuación se proporcionan ejemplos de códigos de Hamming y su uso para la corrección de errores.

50 Un esquema de codificación de la presente divulgación puede usar dígitos binarios para representar dos estados de señal. Los estados de señal se pueden basar en cualquiera de varias características distinguibles para señales obtenidas para complejos ternarios. Por ejemplo, a un dígito binario se le pueden asignar valores (por ejemplo, representados por símbolos tales como números, letras o similares) para (i) presencia y ausencia de una señal; (ii) señales emitidas a dos longitudes de onda diferentes; (iii) señales que tienen dos intensidades diferentes; o (iv) señales resultantes de la excitación a dos longitudes de onda diferentes. Como alternativa, un esquema de codificación puede usar dígitos ternarios para representar tres estados de señal. Los ejemplos de estados de señal que se pueden representar mediante dígitos ternarios incluyen, pero sin limitación, (i) señales emitidas a tres longitudes de onda diferentes; (ii) señales emitidas a dos longitudes de onda diferentes y ausencia de señal en ambas longitudes de onda; (iii) señales que tienen tres intensidades diferentes (una de las cuales puede ser intensidad 0); o (iv) señales resultantes de la excitación a tres longitudes de onda diferentes.

65 En realizaciones particulares, una serie de estados de señal que se obtiene de una serie de exámenes en una posición particular de una plantilla se puede codificar para incluir un código de corrección de errores. Por ejemplo, la serie de mezclas que se examinan puede consistir en tres mezclas y la serie de estados de señal se puede representar con tres dígitos, representando cada dígito un estado de señal obtenido de una mezcla. Como se ha

expuesto anteriormente, cada uno de los estados de señal se puede representar mediante un dígito binario, y el código de corrección de errores puede ser un código de repetición. En este caso, se puede identificar una lectura base no válida debido a un código no válido y la lectura no válida se puede corregir por un voto mayoritario entre los tres dígitos.

5 En un segundo ejemplo de un código de corrección de errores, la serie de mezclas consta de cuatro mezclas y la serie de estados de señal está representada por cuatro dígitos, representando cada dígito un estado de señal obtenido de una mezcla. Asimismo, cada uno de los estados de señal se puede representar mediante un dígito ternario. El código de corrección de errores puede ser un código de Hamming y la distancia de Hamming entre lecturas de base válidas puede ser tres. La base no válida se puede corregir a una lectura de base válida que tenga un código con la distancia de Hamming más cercana al código para la lectura de base no válida.

15 En un tercer ejemplo de un código de corrección de errores, la serie de mezclas consta de cinco mezclas y la serie de estados de señal está representada por cinco dígitos, representando cada dígito un estado de señal obtenido de una mezcla. Cada uno de los estados de señal se representa mediante un dígito binario, en donde el código de corrección de errores incluye un código de Hamming y cada lectura de base válida difiere de otras tres lecturas de base válidas por tres dígitos. De nuevo, la base no válida se puede corregir a una lectura de base válida que tenga un código con la distancia de Hamming más cercana al código para la lectura de base no válida.

20 En realizaciones particulares, las etapas de un método de detección de ácido nucleico expuesto en el presente documento se pueden repetir para indagar varias posiciones diferentes en un ácido nucleico de plantilla. En algunos casos, se puede indagar una serie de posiciones secuenciales a lo largo de la plantilla. Por consiguiente, esta divulgación proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que incluye las etapas de (a) formar una mezcla en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la mezcla incluye un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y análogos de nucleótido del primer, segundo y tercer tipo base en la plantilla; (b) examinar la mezcla para determinar si se formó un complejo ternario; (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b); (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

35 Esta divulgación también proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que incluye las etapas de (a) poner en contacto secuencialmente un ácido nucleico de plantilla cebado con al menos dos mezclas separadas en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde las al menos dos mezclas separadas incluyen cada una una polimerasa y un nucleótido, por lo que el contacto secuencial da como resultado que el ácido nucleico de plantilla cebado se ponga en contacto, en las condiciones de estabilización de complejos ternarios, con análogos de nucleótido para el primer, segundo y tercer tipo base en la plantilla; (b) examinar las al menos dos mezclas separadas para determinar si se formó un complejo ternario; y (c) identificar el siguiente nucleótido correcto para la molécula de ácido nucleico de plantilla cebado, en donde el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer, segundo o tercer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b), y en donde el siguiente nucleótido correcto se imputa a ser un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base basado en la ausencia de un complejo ternario en la etapa (b); (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

50 En una realización adicional, un método de secuenciación de ácido nucleico puede incluir las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la primera mezcla incluye un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base; b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones de estabilización de complejos ternarios, en donde la segunda mezcla incluye un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base; (c) examinar los productos de las etapas (a) y (b) para detectar señales producidas por un complejo ternario que incluye el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y segundo tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y tercer tipo de base; (d) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (c) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto; (e) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (c), produciendo así un cebador extendido; y (f) repetir las etapas (a) a (e) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

65 Además, un método de secuenciación de ácido nucleico puede incluir las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una primera mezcla que incluye una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la plantilla, en donde el contacto ocurre en una reacción de unión que (i) estabiliza complejos ternarios que incluyen el ácido nucleico de

plantilla cebado, la polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, y (ii) evita la incorporación del siguiente nucleótido correcto en el cebador; (b) examinar la reacción de unión para determinar si se formó un complejo ternario; (c) someter el ácido nucleico de plantilla cebado a una repetición de las etapas (a) y (b), en donde la primera mezcla se reemplaza con una segunda mezcla, incluyendo la segunda mezcla una polimerasa, un análogo de nucleótido del primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base en la plantilla; (d) identificar el siguiente nucleótido correcto para el ácido nucleico de plantilla cebado utilizando el examen de la reacción de unión, o el producto de la misma, en donde (i) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del primer tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b), (ii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del segundo tipo de base si se detecta complejo ternario en la etapa (b) y no se detecta en la repetición de la etapa (b) y (iii) el siguiente nucleótido correcto se identifica como un análogo del tercer tipo de base si no se detecta complejo ternario en la etapa (b) y se detecta en la repetición de la etapa (b); (e) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (c), produciendo así un cebador extendido; y (f) repetir las etapas (a) a (e) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

En algunas realizaciones, un método de secuenciación de ácido nucleico puede incluir las etapas de (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una serie de mezclas para formar complejos ternarios, en donde cada una de las mezclas incluye una polimerasa y análogos de nucleótido para al menos dos tipos de base diferentes sospechosos de estar presentes en la siguiente posición del ácido nucleico de plantilla; (b) controlar la siguiente posición de plantilla para complejos ternarios formados por la serie de mezclas, en donde un estado de señal indica presencia o ausencia de complejo ternario formado en la siguiente posición de plantilla por cada mezcla individual, determinando así una serie de estados de señal que codifica una lectura de base para la siguiente posición de plantilla; (c) decodificar la serie de estados de señal para distinguir una lectura de nucleótidos correcta para la siguiente posición de plantilla de un error en la lectura de nucleótidos; (d) añadir un siguiente nucleótido correcto al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de la etapa (b), produciendo así un cebador extendido; y (e) repetir las etapas (a) a (d) para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido.

El siguiente nucleótido correcto que se añade al cebador en un método de secuenciación se puede terminar de manera reversible, para producir un cebador extendido, terminado de manera reversible. Añadir un nucleótido terminado de manera reversible al extremo 3' del cebador proporciona un medio para evitar que se añada más de un nucleótido al cebador durante la etapa de extensión y además evita la extensión no deseada del cebador en una etapa de examen posterior. Por lo tanto, cada posición en la plantilla se puede examinar secuencialmente. Asimismo, se puede formar un complejo ternario estabilizado en cada posición y examinarlo para detectar el siguiente nucleótido correcto para la plantilla que se hibrida con el cebador extendido, terminado de manera reversible. El método se puede repetir de manera gradual mediante la eliminación o modificación de la fracción de terminación reversible del cebador extendido y terminado de manera reversible para producir un cebador extensible.

Normalmente, un nucleótido terminado de manera reversible que se añade a un cebador en un método expuesto en el presente documento no tiene un marcador exógeno. Esto se debe a que el cebador extendido no necesita ser detectado en un método expuesto en el presente documento. Sin embargo, si se desea, se pueden detectar uno o más tipos de nucleótido terminados de manera reversible usados en un método expuesto en el presente documento, por ejemplo, a través de marcadores exógenos unidos a los nucleótidos. Los ejemplos de fracciones de terminación reversibles, métodos para incorporarlas en cebadores y métodos para modificar los cebadores para una extensión adicional (a menudo denominada "desbloqueo") se exponen en las patentes de EE.UU. N.º 7.544.794; 7.956.171; 8.034.923; 8.071.755; 8.808.989; o 9.399.798. Otros ejemplos se exponen en Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008), el documento WO 04/018497; la patente de EE.UU. N.º 7.057.026; el documento WO 91/06678; el documento WO 07/123744; la patente de EE.UU. N.º 7.329.492; la patente de EE.UU. N.º 7.211.414; la patente de EE.UU. N.º 7.315.019; la patente de los EE.UU. N.º 7.405.281 y el documento US 2008/0108082.

Otras técnicas para facilitar la repetición de etapas en un método de secuenciación expuesto en el presente documento incluyen, por ejemplo, formar un complejo ternario estabilizado que se puede modificar a una forma competente de extensión. Por ejemplo, un cebador extensible puede estar presente en un complejo ternario estabilizado, pero la composición de la mezcla de reacción puede evitar la extensión. En este caso, la extensión se puede facilitar poniendo en contacto el complejo ternario estabilizado con un agente desestabilizador de complejo ternario para permitir la incorporación del nucleótido en el complejo ternario, eliminando un agente estabilizador de complejo ternario para permitir la incorporación del nucleótido en el complejo ternario, o eliminando el nucleótido y/o polimerasa del complejo ternario estabilizado e introduciendo otra polimerasa y/o nucleótido en condiciones que faciliten la extensión del cebador.

Se puede llevar a cabo una etapa de extensión del cebador poniendo en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una mezcla de reacción de extensión. En algunos casos, el líquido que estaba presente en la etapa de examen se elimina y se reemplaza con la mezcla de reacción de extensión. Como alternativa, la mezcla de reacción de extensión se puede formar mediante la adición de uno o más reactivos al líquido que estaba presente en la etapa de examen. Opcionalmente, la mezcla de reacción de incorporación incluye una composición diferente de nucleótidos que una etapa de examen. Por ejemplo, una etapa de examen puede incluir uno o más tipos de



nucleótido que no están presentes en la reacción de incorporación y *viceversa*. A modo de ejemplo más específico, una etapa de examen puede omitir al menos un tipo de nucleótido y una etapa de extensión de cebador puede emplear al menos cuatro tipos de nucleótido. Opcionalmente, se añaden uno o más tipos de nucleótido a una mezcla de examen para una etapa de extensión del cebador.

5 Los nucleótidos presentes en una etapa de examen pueden causar la incorporación de nucleótidos no deseados si se transfieren a una etapa de extensión. Por lo tanto, se puede emplear una etapa de lavado antes de una etapa de extensión del cebador para eliminar nucleótidos. Opcionalmente, los nucleótidos libres pueden eliminarse mediante enzimas tales como fosfatasa, mediante modificación química o mediante técnicas de separación física.

10 Opcionalmente, un nucleótido encerrado dentro de un complejo ternario estabilizado de una etapa de examen se incorpora en el extremo 3' de un cebador durante una etapa posterior de extensión del cebador. Como alternativa, una etapa de extensión del cebador incluye reemplazar un nucleótido de una etapa de examen previo e incorporar otro nucleótido (del mismo tipo o diferente) en el extremo 3' del cebador.

15 Opcionalmente, una polimerasa presente durante una etapa de examen se elimina y se reemplaza con una polimerasa diferente para una etapa posterior de extensión del cebador. Como alternativa, la polimerasa presente durante la etapa de examen se retiene y modifica para una etapa posterior de incorporación. Opcionalmente, uno o más nucleótidos presentes durante una etapa de examen se modifican para una etapa posterior de extensión del cebador. Un líquido, reactivo o condición que está presente durante una etapa de examen puede alterarse por cualquiera de varias técnicas para su uso en una etapa posterior de extensión del cebador. Las técnicas a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, eliminación de reactivos, quelación de reactivos, dilución de reactivos, adición de reactivos, alteración de las condiciones de reacción tales como la temperatura, fuerza iónica, conductividad o pH, o cualquier combinación de las mismas. Los reactivos en una mezcla de reacción que incluye cualquier combinación de polimerasa, ácido nucleico de plantilla cebado y nucleótido pueden modificarse durante una etapa de examen y/o etapa de extensión del cebador.

20 Normalmente, una etapa de extensión empleada en un método expuesto en el presente documento dará como resultado la adición de un análogo de nucleótido para cualquier tipo de base que se espera que esté presente en un ácido nucleico de plantilla. Por ejemplo, la extensión del cebador se puede llevar a cabo en condiciones que den como resultado la incorporación de nucleótidos análogos para los cuatro tipos de base que están presentes en el ADN (por ejemplo, adenina, timina, guanina y citosina) o ARN (por ejemplo, adenina, uracilo, guanina y citosina). Los diferentes tipos de nucleótido pueden estar presentes simultáneamente en una reacción de extensión, o pueden participar en reacciones de extensión en serie. Por ejemplo, algunos o todos los tipos de nucleótido se pueden administrar simultáneamente en una única reacción de extensión. Como alternativa, se pueden administrar en serie diferentes tipos de nucleótido (individualmente o en subconjuntos) de modo que se combinen en una sola reacción de extensión o de manera que ocurran reacciones de extensión en serie.

30 Aunque la extensión se ha ejemplificado anteriormente con respecto al uso de análogos para cuatro tipos de base en una plantilla, se entenderá que se puede usar un repertorio más grande de nucleótidos. El número de tipos de nucleótido puede aumentar, por ejemplo, cuando se usan plantillas que tienen uno o ambos miembros de un par de bases no naturales. En algunas realizaciones, puede ser deseable extender un cebador con análogos solo para un subconjunto de tipos de base que se espera que estén presentes en una plantilla. Por lo tanto, es posible incluir análogos para menos de 6, 5, 4, 3 o 2 tipos de base. Como alternativa o de modo adicional, un método expuesto en el presente documento se puede usar para extender un cebador con análogos para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más tipos de base.

45 Un método de secuenciación puede incluir múltiples repeticiones de etapas expuestas en el presente documento. Por ejemplo, las etapas de examen y extensión se pueden repetir varias veces, al igual que las etapas opcionales de desbloqueo de cebadores o lavado de reactivos o productos no deseados entre varias etapas. Por consiguiente, un ácido nucleico de plantilla cebado se puede someter al menos a 2, 5, 10, 25, 50, 100 o más etapas de un método expuesto en el presente documento. No todas las etapas deben repetirse ni deben repetirse en el mismo orden en cada repetición. Por ejemplo, los siguientes nucleótidos correctos en cada posición de una plantilla se pueden identificar mediante análisis en tiempo real (es decir, en paralelo con las etapas líquidas y de detección de un método de secuenciación). Sin embargo, el análisis en tiempo real no es necesario y en su lugar se pueden identificar los siguientes nucleótidos correctos después de que se hayan completado algunos o todas las etapas de detección y líquidas. Por consiguiente, las señales de al menos algunos ciclos de secuenciación por unión (Sequencing By Binding™) se pueden desambiguar y/o la identidad de los tipos de nucleótido durante al menos algunos ciclos se puede imputar mientras se producen las etapas líquidas. Opcionalmente, las señales se pueden desambiguar y/o la identidad de los tipos de nucleótido no detectados se puede imputar después de que se hayan completado algunos o todos los ciclos de detección y líquidos.

60 Una etapa de extensión de cebador no necesita usar una polimerasa marcada. Por ejemplo, una polimerasa que se usa para una etapa de extensión no necesita estar unida a un marcador exógeno (por ejemplo, de forma covalente o de otro modo). Sin embargo, una polimerasa que se usa para la extensión del cebador puede incluir un marcador exógeno, por ejemplo, un marcador que se usó en una etapa de examen previa.

Como se ha expuesto anteriormente, se pueden explotar diferentes actividades de las polimerasas en un método expuesto en el presente documento. Las diferentes actividades pueden seguir a partir de diferencias en la estructura (por ejemplo, a través de actividades naturales, mutaciones o modificaciones químicas). No obstante, la polimerasa se puede obtener de varias fuentes conocidas y aplicarse de acuerdo con las enseñanzas expuestas en el presente documento y las actividades reconocidas de las polimerasas. Las ADN polimerasas útiles incluyen, pero sin limitación, ADN polimerasas bacterianas, ADN polimerasas eucariotas, ADN polimerasas de arqueas, ADN polimerasas víricas y ADN polimerasas de fagos. Las ADN polimerasas bacterianas incluyen ADN polimerasas de *E. coli* I, II y III, IV y V, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*, ADN polimerasa de *Clostridium stercorarium* (Cst), ADN polimerasa de *Clostridium thermocellum* (Cth) y ADN polimerasa de *Sulfolobus solfataricus* (Sso). Las ADN polimerasas eucariotas incluyen ADN polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\sigma$ ,  $\mu$  y  $\kappa$ , así como la polimerasa Rev1 (desoxicitidil transferasa terminal) y la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Las ADN polimerasas víricas incluyen ADN polimerasa de T4, ADN polimerasa de phi-29, GA-1, ADN polimerasas similares a phi-29, ADN polimerasa de PZA, ADN polimerasa de phi-15, ADN polimerasa de Cpl, ADN polimerasa de Cp7, ADN polimerasa de T7 y polimerasa de T4. Otras ADN polimerasas útiles incluyen ADN polimerasas termoestables y/o termófilas tales como ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi), ADN polimerasa de *Thermococcus zilligi* (Tzi), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl), ADN polimerasa de *Pyrococcus woesei* (Pwo), ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) y ADN polimerasa Pfu Turbo, ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli), GB-D polimerasa de *Pyrococcus sp.*, ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma), ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), ADN polimerasa de *Pyrococcus kodakaraensis* (KOD, ADN polimerasa de Pfx, ADN polimerasa de JDF-3 de *Thermococcus sp.* (JDF-3), ADN polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo), ADN polimerasa de *Thermococcus acidophilum*; ADN polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius*; ADN polimerasa de goN-7 de *Thermococcus sp.*; ADN polimerasa de *Pyrodictium occultum*; ADN polimerasa de *Methanococcus voltae*; ADN polimerasa de *Methanococcus thermoautotrophicum*; ADN polimerasa de *Methanococcus jannaschii*; ADN polimerasa de la cepa TOK de *Desulfurococcus* (D. Tok Pol); ADN polimerasa de *Pyrococcus abyssi*; ADN polimerasa de *Pyrococcus horikoshii*; ADN polimerasa de *Pyrococcus islandicum*; ADN polimerasa de *Thermococcus fumicolans*; ADN polimerasa de *Aeropyrum pernix*; y la ADN polimerasa heterodímera DP1/DP2. Las polimerasas genomanipuladas y modificadas también son útiles en relación con las técnicas divulgadas. Por ejemplo, versiones modificadas de las especies extremadamente termófilas de arqueas marinas *Thermococcus 9°N* (por ejemplo, Terminator DNA polymerase de New England BioLabs Inc.; Ipswich, MA) se pueden usar. Todavía se divulgan otras ADN polimerasas útiles, incluida la polimerasa 3PDX en el documento U.S. 8.703.461.

Las ARN polimerasas útiles incluyen, pero sin limitación, ARN polimerasas víricas tales como ARN polimerasa de T7, polimerasa de T3, polimerasa de SP6 y polimerasa de K11; ARN polimerasas eucariotas tales como ARN polimerasa I, ARN polimerasa II, ARN polimerasa III, ARN polimerasa IV y ARN polimerasa V; y ARN polimerasa de Archaea.

Otro tipo útil de polimerasa es una transcriptasa inversa. Los ejemplos de transcriptasas inversas incluyen, pero sin limitación, transcriptasa inversa VIH-1 del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (PDB 1HMV), transcriptasa inversa VIH-2 del virus de inmunodeficiencia humana tipo 2, transcriptasa inversa M-MLV del virus de la leucemia murina Moloney, transcriptasa inversa AMV del virus de la mieloblastosis aviar y transcriptasa inversa de telomerasa que mantiene los telómeros de los cromosomas eucariotas.

Una polimerasa que tiene una actividad exonucleasa de corrección de errores intrínseca 3'-5' puede ser útil para algunas realizaciones. Las polimerasas que carecen sustancialmente de actividad de exonucleasa de corrección de errores 3'-5' también son útiles en algunas realizaciones, por ejemplo, en la mayoría de las realizaciones de genotipado y secuenciación. La ausencia de actividad de exonucleasa puede ser una característica de tipo silvestre o una característica impartida por una variante o estructura de polimerasa genomanipulada. Por ejemplo, el fragmento exo minus Klenow es una versión mutada del fragmento Klenow que carece de actividad de exonucleasa de corrección de errores 3'-5'. El fragmento Klenow y su variante exo minus pueden ser útiles en un método o composición expuestos en el presente documento.

Los ejemplos de reactivos y condiciones que se pueden usar para una etapa de extensión de cebador basada en polimerasa incluyen, por ejemplo, los expuestos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común N.º 2017/0022553 A1 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2018/0044727 A1, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/851.383, que reclama el beneficio de la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/440.624; o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 15/873.343, que reclama prioridad a la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/450.397, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Otros reactivos y condiciones útiles para la extensión del cebador basado en polimerasa se exponen en Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008), el documento WO 04/018497; el documento WO 91/06678; el documento WO 07/123744; la patente de EE.UU. N.º 7.057.026; 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019 o 7.405.281 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2008/0108082 A1.

Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen además una o más etapas de lavado. Una etapa de lavado se

puede producir antes o después de cualquier otra etapa en el método. Por ejemplo, un método expuesto en el presente documento puede incluir opcionalmente una etapa de lavado de un soporte sólido después de formar uno o más complejos ternarios estabilizados. El lavado puede proporcionar la ventaja de eliminar contaminantes tales como componentes de una mezcla de la que se procedieron uno o más componentes del complejo ternario estabilizado. En realizaciones particulares, la etapa de lavado se produce en condiciones que estabilizan el complejo ternario. Por ejemplo, una o más de las condiciones de estabilización o agentes estabilizadores expuestos en otro lugar en el presente documento se pueden emplear durante una etapa de lavado. Opcionalmente, la solución de lavado incluye nucleótidos del mismo tipo que los siguientes nucleótidos correctos utilizados durante la formación del complejo ternario estabilizado. Incluir los siguientes nucleótidos correctos a una concentración suficiente puede proporcionar la ventaja de estabilizar complejos ternarios formados previamente a partir de una disociación no deseada. Esto a su vez evita la reducción no deseada de la sensibilidad de detección debido al lavado de complejos ternarios formados previamente. Opcionalmente, el complejo ternario tiene una semivida y la etapa de lavado se realiza durante un período más corto que la semivida del complejo ternario. Las etapas de lavado también se pueden llevar a cabo después del examen o las etapas de extensión del cebador.

Un complejo ternario estabilizado, o un componente que es capaz de formar (es decir, participar en la formación de) un complejo ternario, se puede unir a un soporte sólido. El soporte sólido puede estar hecho de cualquiera de varios materiales expuestos en el presente documento. Los materiales adecuados pueden incluir vidrio, materiales poliméricos, silicio, cuarzo (sílice fundida), vidrio borofloat, sílice, materiales a base de sílice, carbono, metales, una fibra óptica o haz de fibras ópticas, zafiro o materiales plásticos. El material particular se puede seleccionar en función de las propiedades deseadas para un uso particular. Por ejemplo, los materiales que son transparentes a una longitud de onda de radiación deseada son útiles para técnicas analíticas que utilizarán radiación de esa longitud de onda. En cambio, puede ser deseable seleccionar un material que no pase radiación de una determinada longitud de onda (por ejemplo, que sea opaco, absorbente o reflectante). Otras propiedades de un material que se pueden explotar son la inercia o la reactividad a determinados reactivos utilizados en un proceso posterior, tales como los expuestos en el presente documento, o la facilidad de manipulación o el bajo coste de fabricación.

Un soporte sólido particularmente útil es una partícula tal como una perla o microesfera. Las poblaciones de perlas se pueden usar para la unión de poblaciones de complejos ternarios estabilizados o componentes capaces de formar los complejos (por ejemplo, polimerasas, plantillas, cebadores o nucleótidos). En algunas realizaciones, puede ser útil usar una configuración mediante la cual cada perla tiene un solo tipo de complejo ternario estabilizado o un solo tipo de componente capaz de formar el complejo. Por ejemplo, una perla individual se puede unir a un solo tipo de complejo ternario, un solo tipo de alelo de plantilla, un solo tipo de cebador específico de alelo, un solo tipo de cebador específico de locus o un solo tipo de nucleótido. Como alternativa, no es necesario separar los diferentes tipos de componentes en cada una de las perlas. Como tal, una sola perla puede soportar múltiples tipos diferentes de complejos ternarios, ácidos nucleicos de plantilla, cebadores, ácidos nucleicos de plantilla cebados y/o nucleótidos. La composición de una perla puede variar, dependiendo, por ejemplo, del formato, la química y/o el método de unión a utilizar. Las composiciones de perlas a modo de ejemplo incluyen soportes sólidos y funcionalidades químicas impartidas a los mismos, utilizadas en métodos de captura de proteínas y ácidos nucleicos. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, melamina, metilmetacrilato, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de thoria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sepharose™, celulosa, nylon, micelas reticuladas y Teflon™, así como otros materiales expuestos en "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers Ind.

La geometría de una partícula, perla o microesfera puede corresponder a una amplia variedad de formas y figuras diferentes. Por ejemplo, pueden tener forma simétrica (por ejemplo, esférica o cilíndrica) o forma irregular (por ejemplo, vidrio de poro controlado). Además, las perlas pueden ser porosas, aumentando así el área de superficie disponible para la captura de complejos ternarios o componentes de los mismos. Los tamaños a modo de ejemplo para las perlas usadas en el presente documento pueden variar de nanómetros a milímetros o de aproximadamente 10 nm-1 mm.

En realizaciones particulares, las perlas se pueden ordenar o distinguir espacialmente. Las matrices a modo de ejemplo basadas en perlas que se pueden usar incluyen, sin limitación, una matriz BeadChip™ disponible de Illumina, Inc. (San Diego, CA) o matrices tales como las descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; o 7.622.294; o la publicación PCT N.º WO 00/63437). Las perlas se pueden ubicar en ubicaciones discretas, tales como pocillos, en un soporte en fase sólida, por lo que cada ubicación acomoda una sola cuenta. Como alternativa, las ubicaciones discretas donde residen las perlas pueden incluir cada una una pluralidad de perlas como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0263923 A1, 2004/0233485 A1, 2004/0132205 A1 o 2004/0125424 A1.

Como se reconocerá a partir de las realizaciones de matriz de perlas anteriores, un método de la presente divulgación se puede llevar a cabo en un formato multiplex mediante el cual se detectan múltiples tipos diferentes de ácidos nucleicos en paralelo en un método expuesto en el presente documento. Aunque también es posible procesar en serie diferentes tipos de ácidos nucleicos usando una o más etapas de los métodos expuestos en el presente documento, el procesamiento paralelo puede proporcionar ahorro de costes, ahorro de tiempo y uniformidad de condiciones. Un aparato o método de la presente divulgación puede incluir al menos 2, 10, 100,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$

10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>9</sup> o más ácidos nucleicos diferentes. Como alternativa o de modo adicional, un aparato o método de la presente divulgación puede incluir como máximo 1 x 10<sup>9</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>4</sup>, 1 x 10<sup>3</sup>, 100, 10, 2 o menos, ácidos nucleicos diferentes. Por consiguiente, varios reactivos o productos expuestos en el presente documento como útiles en el aparato o métodos (por ejemplo, ácidos nucleicos de plantilla cebados o complejos ternarios estabilizados) se pueden multiplexar para tener diferentes tipos o especies en estos intervalos.

Otros ejemplos de matrices disponibles en el mercado que se pueden usar incluyen, por ejemplo, una matriz Affymetrix Gene-Chip™. Una matriz manchada también se puede usar de acuerdo con algunas realizaciones. Una matriz manchada a modo de ejemplo es una matriz CodeLink™ disponible de Amersham Biosciences. Otra matriz útil es la que se fabrica utilizando métodos de impresión por inyección de tinta, tal como la tecnología SurePrint™ disponible en Agilent Technologies.

Otras matrices útiles incluyen aquellas que se usan en aplicaciones de secuenciación de ácido nucleico. Por ejemplo, las matrices que se usan para unir amplicones de fragmentos genómicos (a menudo denominadas agrupaciones) pueden ser particularmente útiles. Los ejemplos de matrices de secuenciación de ácido nucleico que se pueden usar en el presente documento incluyen los descritos en Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008), la publicación PCT N.º WO 91/06678; los documentos WO 04/018497 o WO 07/123744; las patentes de EE.UU. N.º 7.057.026; 7.211.414; 7.315.019; 7.329.492 u 7.405.281; o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2008/0108082.

Un ácido nucleico se puede unir a un soporte de una manera que proporciona detección a nivel de una sola molécula o a nivel de conjunto. Por ejemplo, se puede unir una pluralidad de ácidos nucleicos diferentes a un soporte sólido de manera que un complejo ternario estabilizado individual que se forma en una molécula de ácido nucleico en el soporte se pueda distinguir de todos los complejos ternarios vecinos que se forman en las moléculas de ácido nucleico del soporte. Como tal, se pueden unir una o más plantillas diferentes a un soporte sólido en un formato donde cada plantilla de molécula individual se aísla físicamente y se detecta de manera que la molécula individual se resuelva a partir de todas las demás moléculas en el soporte sólido.

Como alternativa, se puede llevar a cabo un método de la presente divulgación para uno o más conjuntos de ácido nucleico, siendo un conjunto una población de ácidos nucleicos que tiene una secuencia de plantilla común. Los métodos de agrupamiento se pueden usar para unir uno o más conjuntos a un soporte sólido. Como tal, una matriz puede tener una pluralidad de conjuntos, cada uno de los conjuntos se conoce como una agrupación o característica de matriz en ese formato. Las agrupaciones se pueden formar usando métodos conocidos en la técnica, tales como amplificación en puente o PCR en emulsión. Se describen métodos útiles de amplificación en puente, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.641.658 o 7.115.400; o en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 2002/0055100 A1; 2004/0002090 A1; 2004/0096853 A1; 2007/0128624 A1; o 2008/0009420 A1. Los métodos de PCR en emulsión incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8817-8822 (2003), el documento WO 05/010145 y en las publicaciones de Patente de EE.UU. N.º 2005/0130173 A1 o 2005/0064460 A1. Otro método útil para amplificar ácidos nucleicos en una superficie es la amplificación de círculo rodante (RCA, de sus siglas en inglés), por ejemplo, como se describe en Lizardi et al., Nat. Genet. 19:225-232 (1998) o el documento US 2007/0099208 A1.

En realizaciones particulares, un complejo ternario estabilizado, una polimerasa, un ácido nucleico o un nucleótido está unido a una superficie de una cubeta de lectura o a un soporte sólido en una cubeta de lectura. Una cubeta de lectura permite una manipulación conveniente de líquidos mediante la etapa de soluciones dentro y fuera de una cámara para líquidos que contacta con el complejo ternario unido al soporte. La cubeta de lectura también proporciona la detección de los componentes manipulados de forma fluida. Por ejemplo, se puede colocar un detector para detectar señales a partir del soporte sólido, tales como las señales de un marcador que se recluta en el soporte sólido debido a la formación de un complejo ternario estabilizado. Se describen cubetas de lectura a modo de ejemplo que se pueden usar, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2010/0111768 A1, el documento WO 05/065814 o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2012/0270305 A1.

Se pueden obtener una o más imágenes de una matriz. Por ejemplo, se puede obtener una serie de imágenes para una serie de exámenes llevados a cabo durante un ciclo de secuenciación particular. Cada imagen se puede registrar para determinar la ubicación de las características, las intensidades de señal se pueden extraer de las imágenes y las intensidades de señal se pueden normalizar, si se desea. En cada imagen, las intensidades se pueden separar en intensidades de encendido y apagado usando un método de segmentación binaria, tal como el método de Otsu. En algunas realizaciones, se detectan múltiples colores de emisión y se adquiere una imagen diferente para cada color. Las intensidades de emisión de cada imagen se pueden analizar utilizando un algoritmo de agrupamiento tal como k medias o un modelo de mezcla gaussiana para determinar a cuál de varios estados (por ejemplo, emisión azul, emisión roja u oscura) pertenece una característica. Para cada característica, estas técnicas de procesamiento de señal producirán una serie de estados de señal de las imágenes de la serie. Cada característica se puede representar como una palabra clave que consiste en una serie de dígitos que representan los estados de señal de la serie de imágenes. Si la palabra clave coincide con una de las cuatro palabras clave permitidas para una base válida, se realiza la lectura de base adecuada. De lo contrario, se puede realizar una lectura de base nula. Sin embargo, si se utiliza un código de corrección de errores, una palabra clave inválida para

una característica particular se puede cambiar a una palabra clave válida para corregir la lectura de base.

5 Los ácidos nucleicos que se usan en un método o composición en el presente documento pueden ser ADN, tal como ADN genómico, ADN sintético, ADN amplificado, ADN complementario (ADNc) o similares. El ARN también se puede usar como ARNm, ARN ribosómico, ARNt o similares. Los análogos de ácido nucleico también se pueden usar como plantillas en el presente documento. Por lo tanto, los ácidos nucleicos de plantilla utilizados en el presente documento pueden proceder de una fuente biológica, fuente sintética o producto de amplificación. Los cebadores usados en el presente documento pueden ser ADN, ARN o análogos de los mismos.

10 Las plantillas de ácido nucleico particularmente útiles son fragmentos de genoma que incluyen secuencias idénticas a una porción de un genoma. Una población de fragmentos de genoma puede incluir al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de un genoma. Un fragmento de genoma puede tener, por ejemplo, una secuencia que sea sustancialmente idéntica a al menos aproximadamente 25, 50, 70, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 o más nucleótidos de un genoma. Un fragmento del genoma puede ser ADN, ARN o un análogo de los mismos.

15 Los organismos a modo de ejemplo de los que pueden proceder los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, los de un mamífero tal como un roedor, ratón, rata, conejo, cobaya, ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate, primate humano o no humano; una planta tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, colza o soja; un alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de la fruta, abeja melífera o araña; un pez tal como el pez cebra; un reptil; un anfibio tal como una rana o *Xenopus laevis*; un *dictyostelium discoideum*; un hongo tal como *pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*; o un *Plasmodium falciparum*. Los ácidos nucleicos también pueden proceder de un procarionta tal como una bacteria, *Escherichia coli*, *staphylococci* o *mycoplasma pneumoniae*; una arquea; un virus tal como el virus de la hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana; o un viroide. Los ácidos nucleicos pueden proceder de un cultivo o una población homogénea de los organismos anteriores o, como alternativa, de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema. Los ácidos nucleicos se pueden aislar usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los descritos en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001) o en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998).

20 Se puede obtener un ácido nucleico de plantilla a partir de un método preparatorio tal como aislamiento del genoma, fragmentación del genoma, clonación de genes y/o amplificación. La plantilla se puede obtener a partir de una técnica de amplificación tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación de desplazamiento múltiple (MDA, de sus siglas en inglés) o similares. Métodos a modo de ejemplo para aislar, amplificar y fragmentar ácidos nucleicos para producir plantillas para análisis en una matriz se exponen en la patente de EE.UU. N.º 6.355.431 o 9.045.796. La amplificación también se puede llevar a cabo utilizando un método expuesto en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001) o en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998).

25 La presente divulgación proporciona sistemas para detectar ácidos nucleicos, por ejemplo, usando métodos expuestos en el presente documento. Por ejemplo, un sistema se puede configurar para reacciones de genotipado o reacciones de secuenciación por unión (Sequencing By Binding™) que implican el examen de la interacción entre una polimerasa y un ácido nucleico de plantilla cebado en presencia de nucleótidos para identificar la siguiente base en la secuencia de ácido nucleico de plantilla. Opcionalmente, un sistema incluye componentes y reactivos para realizar una o más etapas expuestas en el presente documento que incluyen, pero sin limitación, formar al menos un complejo ternario estabilizado entre un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y el siguiente nucleótido correcto, detectar el complejo(s) ternario estabilizado, extender el cebador de cada plantilla cebada con el siguiente nucleótido correcto, y/o identificar un nucleótido o secuencia de nucleótidos presentes en la plantilla.

30 Un sistema de la presente divulgación puede incluir un recipiente o soporte sólido para llevar a cabo un método de detección de ácido nucleico. Por ejemplo, el sistema puede incluir una matriz, cubeta de lectura, placa multipocillo u otro aparato conveniente. El recipiente o soporte sólido puede ser desmontable, lo que permite colocarlo o extraerlo del sistema. Como tal, un sistema se puede configurar para procesar secuencialmente una pluralidad de recipientes o soportes sólidos. El sistema puede incluir un sistema de líquidos que tiene depósitos para contener uno o más de los reactivos expuestos en el presente documento (por ejemplo, polimerasa, cebador, ácido nucleico de plantilla, nucleótido(s) para la formación de complejo ternario, nucleótidos para la extensión de cebador, reactivos de desbloqueo o mezclas de dichos componentes). El sistema de líquidos se puede configurar para administrar reactivos a un recipiente o soporte sólido, por ejemplo, a través de canales o aparatos de transferencia de gotas (por ejemplo, aparatos de electrohumectación). Se puede configurar cualquiera de varios aparatos de detección para detectar el recipiente o soporte sólido donde interactúan los reactivos. Los ejemplos incluyen detectores de luminiscencia, detectores de resonancia de plasmón superficial y otros conocidos en la técnica. Los sistemas a modo de ejemplo que tienen componentes líquidos y de detección que se pueden modificar fácilmente para su uso en un sistema en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los expuestos en la solicitud de patente de EE.UU.

N.º de serie 62/481.289 o 62/545.606; las patentes de EE.UU. N.º 8.241.573; 7.329.860 u 8.039.817; o la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2009/0272914 A1 o 2012/0270305 A1.

5 Opcionalmente, un sistema de la presente divulgación incluye además una unidad de procesamiento informático (CPU, de sus siglas en inglés) que está configurada para operar componentes del sistema. La misma o diferente CPU puede interactuar con el sistema para adquirir, almacenar y procesar señales (por ejemplo, señales detectadas en un método expuesto en el presente documento). En realizaciones particulares, se puede usar una CPU para determinar, a partir de las señales, la identidad del nucleótido que está presente en una ubicación particular en un ácido nucleico de plantilla. En algunos casos, la CPU identificará una secuencia de nucleótidos para la plantilla a partir de las señales que se detectan. En realizaciones particulares, la CPU está programada para comparar señales obtenidas de diferentes reacciones de unión para desambiguar señales, identificando así nucleótidos en una o más posiciones en un ácido nucleico de plantilla. Como alternativa o de modo adicional, se puede programar una CPU para comparar señales obtenidas de diferentes reacciones de unión para identificar un nucleótido en una o más posiciones en un ácido nucleico de plantilla mediante imputación. Por consiguiente, una CPU se puede programar para decodificar un código de detección de errores, para decodificar un código de corrección de errores o para corregir un error en una palabra clave obtenida de un método expuesto en el presente documento.

20 Una CPU útil puede incluir uno o más de un sistema informático personal, sistema informático servidor, cliente ligero, cliente pesado, dispositivo de mano o portátil, sistema multiprocesador, sistema basado en microprocesador, decodificador, electrónica de consumo programable, PC de red, sistema de miniordenador, sistema informático central, teléfono inteligente y entornos informáticos distribuidos en la nube que incluyen cualquiera de los sistemas o dispositivos anteriores, y similares. La CPU puede incluir uno o más procesadores o unidades de procesamiento, una arquitectura de memoria que puede incluir memoria RAM y no volátil. La arquitectura de memoria puede incluir además medios de almacenamiento del sistema informático extraíbles/no extraíbles, volátiles/no volátiles. Además, la arquitectura de la memoria puede incluir uno o más lectores para leer y escribir en un medio magnético no volátil y no extraíble, tal como un disco duro, una unidad de disco magnético para leer y escribir en un disco magnético extraíble y no volátil, y/o una unidad de disco óptico para leer o escribir en un disco extraíble y no volátil, tal como un CD-ROM o DVD-ROM. La CPU también puede incluir varios medios legibles del sistema informático. Dichos medios pueden ser cualquier medio disponible al que pueda acceder un entorno informático en la nube, tal como medios volátiles y no volátiles, y medios extraíbles y no extraíbles.

35 La arquitectura de memoria puede incluir al menos un producto de programa que tiene al menos un módulo de programa implementado como instrucciones ejecutables que están configuradas para llevar a cabo una o más etapas de un método expuesto en el presente documento. Por ejemplo, las instrucciones ejecutables pueden incluir un sistema operativo, uno o más programas de aplicación, otros módulos de programa y datos de programa. Generalmente, los módulos de programa pueden incluir rutinas, programas, objetos, componentes, lógica, estructuras de datos, etc., que realizan tareas particulares, tales como el procesamiento de señales detectadas en un método expuesto en el presente documento, desambiguación de señales para identificar nucleótidos o imputación de la identidad de nucleótidos donde se detectan señales de otros tipos de nucleótido.

40 Los componentes de una CPU pueden estar acoplados por un bus interno que puede implementarse como uno o más de cualquiera de varios tipos de estructuras de bus, incluido un bus de memoria o controlador de memoria, un bus periférico, un puerto de gráficos acelerado y un procesador o bus local utilizando cualquiera de varias arquitecturas de bus. A modo de ejemplo, y sin limitación, dichas arquitecturas incluyen un bus de arquitectura normalizada de la industria (ISA, de sus siglas en inglés), un bus de arquitectura Micro Canal (MCA, de sus siglas en inglés), un bus ISA mejorado (EISA, de sus siglas en inglés), un bus local de asociación normalizada de vídeo electrónico (VESA, de sus siglas en inglés) y un bus de interconexiones de componentes periféricos (PCI, de sus siglas en inglés).

50 Una CPU se puede comunicar opcionalmente con uno o más dispositivos externos, tales como un teclado, un dispositivo señalador (por ejemplo, un ratón), una pantalla, tal como una interfaz de usuario gráfica (GUI, de sus siglas en inglés) u otro dispositivo que facilite la interacción de un uso con el sistema de detección de ácido nucleico. De forma similar, la CPU se puede comunicar con otros dispositivos (por ejemplo, a través de una tarjeta de red, módem, etc.). Dicha comunicación puede ocurrir a través de interfaces de E/S. Aún así, una CPU de un sistema en el presente documento puede comunicarse con una o más redes tales como una red de área local (LAN, de sus siglas en inglés), una red de área amplia general (WAN, de sus siglas en inglés) y/o una red pública (por ejemplo, Internet) a través de un adaptador de red adecuado.

60 Esta divulgación proporciona además un kit para distinguir nucleótidos en una plantilla de ácido nucleico. El kit puede incluir reactivos para llevar a cabo uno o más de los métodos expuestos en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede incluir reactivos para producir un complejo ternario estabilizado cuando se mezcla con uno o más ácidos nucleicos de plantilla cebados. De manera más específica, un kit puede incluir una o más de las mezclas de nucleótidos usadas en un método expuesto en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, los métodos expuestos en la sección de Ejemplos a continuación. Además de las mezclas de nucleótidos, el kit puede incluir una polimerasa que sea capaz de formar un complejo ternario estabilizado. Los nucleótidos, la polimerasa o ambos pueden incluir un marcador exógeno, por ejemplo, como se expone en el presente documento en el contexto de

diversos métodos.

En algunas realizaciones, el kit se puede configurar para admitir un método repetitivo tal como un método de secuenciación por unión (Sequencing By Binding™). Por consiguiente, un kit puede incluir además reactivos para llevar a cabo la extensión del cebador. Los reactivos a modo de ejemplo para la extensión del cebador pueden incluir una polimerasa y una mezcla de cuatro tipos de nucleótido. Los tipos de nucleótido utilizados para la extensión pueden incluir opcionalmente grupos de terminación reversibles. En esta opción, el kit puede incluir además reactivos para desbloquear un cebador que ha incorporado los nucleótidos terminados reversiblemente.

Por consiguiente, cualquiera de los componentes o artículos utilizados para realizar los métodos expuestos en el presente documento se pueden empaquetar útilmente en un kit. Por ejemplo, los kits se pueden empaquetar para incluir algunos, muchos o todos los componentes o artículos utilizados para realizar los métodos expuestos en el presente documento. Los componentes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, nucleótidos, polimerasas, fracciones de terminación, reactivos de desbloqueo y similares como se expone en el presente documento y en las referencias citadas en el presente documento. Cualquiera de dichos reactivos puede incluir, por ejemplo, algunos, muchos o todos los tampones, componentes y/o artículos usados para realizar una o más de las etapas posteriores para el análisis de un ácido nucleico de plantilla cebado. Un kit no necesita incluir un cebador o ácido nucleico de plantilla. Más bien, un uso del kit puede proporcionar un ácido nucleico de plantilla cebado que se combinará con los componentes del kit.

Uno o más reactivos complementarios también se pueden incluir en un kit. Dichos reactivos complementarios pueden incluir cualquiera de los reactivos ejemplificados anteriormente y/u otros tipos de reactivos útiles para realizar los métodos expuestos en el presente documento. Se pueden incluir además instrucciones en un kit. Las instrucciones pueden incluir, por ejemplo, procedimientos para fabricar cualquier componente o artículo utilizado en los métodos expuestos en el presente documento, realizar una o más etapas de cualquier realización de los métodos expuestos en el presente documento y/o instrucciones para realizar cualquiera de las etapas de análisis posteriores que emplean una plantilla de ácido nucleico cebado.

En realizaciones particulares, un kit incluye un cartucho que tiene depósitos para contener los reactivos y además tiene componentes líquidos para transferir reactivos desde los depósitos a un instrumento de detección. Por ejemplo, los componentes líquidos se pueden configurar para transferir reactivos a una cubeta de lectura donde se detectan complejos ternarios estabilizados. Un ejemplo de cartucho de líquidos que se puede incluir en un kit (o sistema) de la presente divulgación se describe en la solicitud patente de EE.UU. N.º de serie 62/481.289.

### Ejemplos

Los siguientes Ejemplos describen varias configuraciones diferentes que utilizan desambiguación y/o imputación para identificar nucleótidos en posiciones individuales de ácidos nucleicos. Varias realizaciones utilizan un esquema de codificación que proporciona detección de errores de lecturas de base o corrección de lecturas de base no válidas.

Una ácido nucleico de plantilla cebado se une a un soporte sólido en una cubeta de lectura. Los reactivos se administran a la cubeta de lectura en condiciones para estabilizar la formación de un complejo ternario entre la plantilla cebada, la polimerasa y el siguiente nucleótido correcto. Las siguientes tablas se refieren a la administración de reactivos como un "flujo". El número de flujos de reactivos y la composición de cada flujo de reactivo pueden variar según lo especificado para cada configuración a continuación. Asimismo, los reactivos enumerados para cada flujo se pueden administrar de forma simultánea o secuencial.

Un complejo ternario estabilizado que se forma en el soporte sólido puede incluir un marcador fluorescente tanto en la polimerasa como en el nucleótido, como se especifica en las configuraciones individuales a continuación. Se llevan a cabo exámenes para detectar señales fluorescentes en el soporte sólido. La cubeta de lectura se puede lavar opcionalmente entre cada flujo y examen para eliminar el marcador de fondo y permitir una mejor señal al ruido en la detección del complejo ternario estabilizado formado en el soporte sólido. Los complejos ternarios se estabilizan y examinan usando técnicas y aparatos expuestos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2017/0022553 A1 o la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 62/447.319; 62/440.624 o 62/450.397.

Las ventajas a modo de ejemplo para cada configuración se exponen a continuación. Se entenderá que reducir el número de canales de detección generalmente permite el uso de aparatos de detección más asequibles, un tiempo de adquisición de imágenes más rápido y, en algunos casos, una resolución más alta. La reducción del número de flujos puede proporcionar un tiempo de ciclo general más rápido (es decir, el tiempo acumulado de detección y de líquidos para indagar cada posición en el ejemplo actual), un coste general menor de reactivos y un volumen reducido de desechos de líquidos. La reducción de la cantidad de nucleótidos diferentes puede proporcionar un coste menor para completar un ciclo, un volumen general reducido de reactivos durante el envío y el almacenamiento, y un volumen reducido de desechos de líquidos.

### Ejemplo de referencia 1: Un color, tres tipos de nucleótido, tres administraciones

Como se muestra en la primera columna de la Tabla 1, se pueden llevar a cabo tres flujos, cada uno para administrar una polimerasa y un tipo de nucleótido a la plantilla cebada. En cada caso, la polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. El marcador fluorescente puede ser el mismo para todos los flujos. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado con los respectivos tipos de nucleótido, A, G, C y T, se indica en las últimas cuatro columnas. Un signo positivo indica que se detecta una señal fluorescente y un signo negativo indica ausencia de señal significativa. Como es evidente en la Tabla 1, la presencia de un complejo ternario donde el siguiente nucleótido correcto es A, G o C se puede determinar a partir de una señal detectada después del flujo donde se administró el nucleótido respectivo. El nucleótido que no se administró (es decir, el nucleótido T en este ejemplo) se imputa por la ausencia de señal significativa detectada en las tres etapas de examen. Hay que tener en cuenta que la ausencia de señal para T o cualquier otro nucleótido puede deberse a la ausencia del nucleótido en el flujo. Como alternativa, el nucleótido no detectado puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios, aunque no se detecten los complejos ternarios (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con ese nucleótido).

Tabla 1

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(-)	(-)	(-)
Flujo de pol + G				
2 <sup>o</sup> examen	(-)	(+)	(-)	(-)
Flujo de pol + C				
3 <sup>er</sup> examen	(-)	(-)	(+)	(-)

Una ventaja de la configuración en la Tabla 1 es que se pueden distinguir cuatro nucleótidos usando solo un marcador, un solo canal de detección (es decir, obtención de excitación y emisión a la misma longitud de onda para los productos de todos los flujos), solo tres etapas de administración de reactivos, solo tres etapas de examen y solo tres tipos de nucleótido.

**Ejemplo 2: Un color, tres tipos de nucleótido, dos administraciones**

Como se muestra en la primera columna de la Tabla 2, se pueden llevar a cabo dos flujos para administrar un total de tres tipos de nucleótido a la plantilla cebada. La polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. El marcador fluorescente puede ser el mismo para ambos flujos. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una A o G como el siguiente nucleótido correcto. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el segundo flujo (y detectado en el 2<sup>o</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una A o C como el siguiente nucleótido correcto. Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 2 para los dos exámenes, la presencia de un complejo ternario donde el siguiente nucleótido correcto es A, G o C se puede determinar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante señal en ambos exámenes, G se indica mediante señal en el 1<sup>er</sup> examen y ausencia de señal significativa en el 2<sup>o</sup> examen, y C se indica mediante ausencia de señal significativa en el 1<sup>er</sup> examen y detección de señal en el 2<sup>o</sup> examen. El nucleótido que no se administró (es decir, el nucleótido T en este ejemplo) se imputa por la ausencia de señal significativa en ambos exámenes. Hay que tener en cuenta que la ausencia de señal para T o cualquier otro nucleótido puede deberse a la ausencia del nucleótido en el flujo. Como alternativa, el nucleótido no detectado puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios, aunque no se detecten los complejos ternarios (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con ese nucleótido).

Tabla 2

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A + G				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(+)	(-)	(-)
Flujo de pol + A + C				
2 <sup>o</sup> examen	(+)	(-)	(+)	(-)



Una ventaja de la configuración en la Tabla 2 es que se pueden distinguir cuatro nucleótidos usando solo un marcador, un solo canal de detección, solo dos etapas de administración de reactivos, solo dos etapas de examen y solo tres nucleótidos diferentes.

5

**Ejemplo 3: Dos colores, seis tipos de nucleótido, dos administraciones**

La Tabla 3 muestra una configuración en la que se llevan a cabo dos flujos para administrar tipos de nucleótido que tienen cuatro bases diferentes. Sin embargo, los complejos ternarios que se forman con dos de las bases tienen marcadores alternativos en cualquier flujo. Específicamente, los complejos ternarios que se forman con el nucleótido G serán rojos en el primer flujo y azules en el segundo flujo. Los complejos ternarios que se forman con el nucleótido T serán azules en el primer flujo y rojos en el segundo flujo. Como tal, esta configuración se lleva a cabo utilizando seis tipos diferentes de nucleótidos. Los nucleótidos se pueden unir a los diferentes marcadores fluorescentes en las mezclas ejemplificadas en la primera columna de la Tabla 3. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero una señal detectada en el canal rojo será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A o G como el siguiente nucleótido correcto y una señal detectada en el canal azul será ambigua con respecto a si el complejo contiene una C o T como el siguiente nucleótido correcto. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el segundo flujo (y detectado en el 2<sup>o</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero una señal detectada en el canal rojo será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A o T como el siguiente nucleótido correcto y una señal detectada en el canal azul será ambigua con respecto a si el complejo contiene un nucleótido G o C. Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 3 para los dos exámenes, el siguiente nucleótido correcto se puede identificar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante una señal roja en ambos exámenes, G se indica mediante una señal roja en el 1<sup>er</sup> examen y una señal azul en el 2<sup>o</sup> examen, C se indica mediante una señal azul en el 1<sup>er</sup> examen y una señal azul en el 2<sup>o</sup> examen, y T se indica mediante una señal azul en el 1<sup>er</sup> examen y una señal roja en el 2<sup>o</sup> examen.

10

15

20

25

Tabla 3

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>rojo</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>azul</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	rojo	rojo	azul	azul
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>azul</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	rojo	azul	azul	rojo

30

Una ventaja de la configuración en la Tabla 3 es que se pueden distinguir cuatro nucleótidos usando solo dos marcadores, solo dos canales de detección, solo dos etapas de administración de reactivos, y solo dos etapas de examen. Aunque se usan seis nucleótidos diferentes en esta configuración, un beneficio adicional es la mejora de la verificación de errores para todos los tipos de nucleótido en la plantilla debido al hecho de que se detectan dos señales positivas diferentes para cada tipo de nucleótido correcto siguiente en una posición particular en la plantilla.

35

La configuración en la Tabla 3 se puede modificar para usar la escala de intensidad, en lugar de las diferencias de longitud de onda, para distinguir los complejos ternarios estabilizados. Por ejemplo, los marcadores rojos se pueden retener y los marcadores azules se pueden reemplazar con marcadores rojos que tienen una fracción de la intensidad de los marcadores rojos que se retienen. Una ventaja de esta modificación es que la detección de dos canales se puede reemplazar por una detección de canal único más simple y más barata (siempre y cuando las intensidades de señal se puedan distinguir en el canal único).

40

**Ejemplo 4: Dos colores, cuatro tipos de nucleótido, dos administraciones**

45

La Tabla 4 muestra una configuración en la que se llevan a cabo dos flujos para administrar un total de cuatro tipos de nucleótido a la plantilla cebada. Los nucleótidos se pueden unir a los diferentes marcadores fluorescentes en las mezclas ejemplificadas en la primera columna de la Tabla 4. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero una señal detectada en el canal rojo será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A o G como el siguiente nucleótido correcto y una señal detectada en el canal azul será ambigua con respecto a si el complejo contiene una C o T como el siguiente nucleótido correcto. Una señal roja detectada en el 2<sup>o</sup> examen indicará que A es el siguiente nucleótido correcto en el complejo ternario y una señal azul indicará que C es el siguiente nucleótido correcto en el complejo ternario. Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 4 para los dos exámenes, el siguiente nucleótido correcto se puede identificar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante una señal roja en ambos exámenes, G se indica mediante una señal roja en el 1<sup>er</sup> examen y ausencia de señal significativa en el 2<sup>o</sup> examen, C se indica mediante

50

55

una señal azul en ambos exámenes, y T se indica mediante una señal azul en el 1<sup>er</sup> examen y ausencia de señal significativa en el 2<sup>o</sup> examen.

Tabla 4

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>rojo</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>azul</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	rojo	rojo	azul	azul
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + C <sub>azul</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	rojo	(-)	azul	(-)

5 Una ventaja de la configuración en la Tabla 4 es que se pueden distinguir cuatro nucleótidos usando solo dos marcadores, solo dos canales de detección, solo dos etapas de administración de reactivos, y solo dos etapas de examen. Se usan cuatro tipos de nucleótido en esta configuración, pero se proporciona una verificación de errores para dos de los tipos de nucleótido en la plantilla debido al hecho de que se detectan dos señales positivas diferentes para los dos siguientes tipos de nucleótido correcto en una posición particular en la plantilla.

10 La configuración en la Tabla 4 se puede modificar para usar la escala de intensidad, en lugar de las diferencias de longitud de onda, para distinguir los complejos ternarios estabilizados. Por ejemplo, los marcadores rojos se pueden retener y los marcadores azules se pueden reemplazar con marcadores rojos que tienen una fracción de la intensidad de los marcadores rojos que se retienen. Una ventaja de esta modificación es que la detección de dos canales se puede reemplazar por una detección de canal único más simple y más barata (siempre y cuando las intensidades de señal se puedan distinguir en el canal único).

20 **Ejemplo 5: Dos colores, tres tipos de nucleótido, dos administraciones**

La Tabla 5 muestra una configuración en la que se llevan a cabo dos flujos, para administrar un total de tres tipos de nucleótido a la plantilla cebada. Los nucleótidos se pueden unir a los diferentes marcadores fluorescentes en las mezclas ejemplificadas en la primera columna de la Tabla 5. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero una señal detectada en el canal rojo será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A o G como el siguiente nucleótido correcto. Una señal azul en el 1<sup>er</sup> examen indicará que C es el siguiente nucleótido correcto. Una señal roja detectada en el 2<sup>o</sup> examen indicará que A es el siguiente nucleótido correcto en el complejo ternario y una señal azul indicará que C es el siguiente nucleótido correcto en el complejo ternario. Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 4 para los dos exámenes, el siguiente nucleótido correcto se puede identificar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante una señal roja en ambos exámenes, G se indica mediante una señal roja en el 1<sup>er</sup> examen y ausencia de señal significativa en el 2<sup>o</sup> examen, y C se indica mediante una señal azul en ambos exámenes. El nucleótido que no se administró (es decir, el nucleótido T en este ejemplo) se imputa por la ausencia de señal significativa en ambos exámenes. Hay que tener en cuenta que la ausencia de señal para T o cualquier otro nucleótido puede deberse a la ausencia del nucleótido en el flujo. Como alternativa, el nucleótido no detectado puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios, aunque no se detecten los complejos ternarios (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con ese nucleótido).

Tabla 5

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>rojo</sub> + C <sub>azul</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	rojo	rojo	azul	(-)
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + C <sub>azul</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	rojo	(-)	azul	(-)

40 Una ventaja de la configuración en la Tabla 5 es que se pueden distinguir cuatro nucleótidos usando solo dos marcadores, solo dos canales de detección, solo dos etapas de administración de reactivos, solo dos etapas de examen y solo tres tipos de nucleótido. Se proporciona una verificación de errores para dos de los tipos de nucleótido en la plantilla debido al hecho de que se detectan dos señales positivas diferentes para los dos siguientes tipos de nucleótido correcto en una posición particular en la plantilla.

45 La configuración en la Tabla 5 se puede modificar para usar la escala de intensidad, en lugar de las diferencias de longitud de onda, para distinguir los complejos ternarios estabilizados. Por ejemplo, los marcadores rojos se pueden retener y los marcadores azules se pueden reemplazar con marcadores rojos que tienen una fracción de la

intensidad de los marcadores rojos que se retienen. Una ventaja de esta modificación es que la detección de dos canales se puede reemplazar por una detección de canal único más simple y más barata (siempre y cuando las intensidades de señal se puedan distinguir en el canal único).

5 **Ejemplo 6: Tres esquemas de detección de color**

Las tablas 6 a 8 muestran determinadas configuraciones que explotan tres marcadores diferentes detectados en tres canales diferentes. La configuración en la Tabla 6 usa solo tres tipos de nucleótido, solo tres marcadores y imputación de un tipo de nucleótido no utilizado, proporcionando así las ventajas de requerir no más de un flujo y menos marcadores (y canales de detección) que el número de nucleótidos distinguidos. Hay que tener en cuenta que la ausencia de señal para T puede deberse a la ausencia del nucleótido T en el flujo. Como alternativa, el nucleótido T puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios que no son detectables (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con el nucleótido T).

Tabla 6

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>amarillo</sub> + C <sub>azul</sub>				
Examen	rojo	amarillo	azul	(-)

La configuración en la Tabla 7 usa cuatro tipos de nucleótido, dos flujos y solo tres marcadores, proporcionando así una ventaja de requerir menos marcadores (y canales de detección) que el número de nucleótidos distinguidos. Como ventaja adicional, se proporciona una verificación de errores para tres de los tipos de nucleótido en la plantilla debido al hecho de que se detectan tres señales positivas diferentes para cualquier posición en la plantilla.

Tabla 7

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>amarillo</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	rojo	amarillo	azul	rojo
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>amarillo</sub> + C <sub>azul</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	rojo	amarillo	azul	(-)

La Tabla 8 muestra una configuración que usa dos flujos y solo tres marcadores, proporcionando así una ventaja de requerir menos etiquetas (y canales de detección) que los nucleótidos distinguidos. Aunque se utilizan cinco tipos de nucleótido, se proporciona una verificación de errores para los cuatro tipos de nucleótido en la plantilla debido al hecho de que se pueden detectar cuatro señales positivas diferentes en cualquier posición de la plantilla.

Tabla 8

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>amarillo</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	rojo	amarillo	azul	rojo
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + G <sub>amarillo</sub> + C <sub>azul</sub> + T <sub>azul</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	rojo	amarillo	azul	azul

Las configuraciones en la Tabla 6 a la 8 se puede modificar para usar la escala de intensidad, en lugar de las diferencias de longitud de onda, para distinguir los complejos ternarios estabilizados. Por ejemplo, los marcadores rojos se pueden retener y los marcadores azules y amarillos se pueden reemplazar con marcadores rojos que tienen un tercio y 2 tercios, respectivamente, de la intensidad de los marcadores rojos retenidos. Una ventaja de esta modificación es que la detección de tres canales se puede reemplazar por una detección de canal único más simple y más barata (siempre y cuando las intensidades de señal se puedan distinguir en el canal único).

**Ejemplo 7: Examen repetitivo de nucleótidos análogos**

Los flujos y exámenes que se muestran en las Tablas 1 a 8 se pueden repetir antes de realizar una etapa de extensión. Las repeticiones pueden llevar a que los flujos y extensiones se lleven a cabo al menos 2, 3, 4, 5 o más veces por ciclo. Por consiguiente, una posición particular en una plantilla se puede probar repetidamente para determinar la capacidad de formar complejos ternarios con un tipo de nucleótido particular. Esta repetición puede

producir una identificación de nucleótido más precisa que la que puede resultar en ausencia de la repetición. La repetición también puede proporcionar una base para el análisis estadístico de los resultados y el informe de la varianza estadística o la confianza estadística en las lecturas de nucleótido realizadas en posiciones individuales en un ácido nucleico de plantilla.

5 Tal como se muestra en la Tabla 9, se pueden llevar a cabo cuatro flujos, cada uno con una combinación diferente de dos tipos diferentes de nucleótido, y el resultado de este enfoque combinatorio es evaluar cada uno de los cuatro tipos de nucleótido dos veces. La polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente. Los exámenes se llevan a cabo después de cada flujo. El marcador fluorescente puede ser el mismo para ambos flujos. 10 La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una A o G como el siguiente nucleótido correcto. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado detectado en el 2<sup>o</sup> examen será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una A o C como el siguiente nucleótido correcto. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado detectado en el 3<sup>er</sup> examen será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una G o T como el siguiente nucleótido correcto. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado detectado en el 4<sup>o</sup> examen será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una C o T como el siguiente nucleótido correcto. 15

Tabla 9

<b>Etapa</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>T</b>
Flujo de pol + A + G				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(+)	(-)	(-)
Flujo de pol + A + C				
2 <sup>o</sup> examen	(+)	(-)	(+)	(-)
Flujo de pol + G + T				
3 <sup>er</sup> examen	(-)	(+)	(-)	(+)
Flujo de pol + C + T				
4 <sup>o</sup> examen	(-)	(-)	(+)	(+)

20 Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 9 para los cuatro exámenes, la presencia de un complejo ternario donde el siguiente nucleótido correcto es A, G, C o T se puede determinar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante señal en el 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> examen, G se indica mediante una señal en el 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> examen, C se indica mediante una señal en el 2<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> examen, y T se indica mediante una señal en el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> examen. 25

Una ventaja de esta configuración es que cada tipo de nucleótido se observa dos veces por posición de plantilla (es decir, dos veces por ciclo de secuenciación). Esto a su vez mejora la precisión en comparación con una configuración donde se realiza una sola observación para cada tipo de nucleótido por ciclo. El flujo de dos nucleótidos a la vez mejora la velocidad y reduce el coste del reactivo en comparación con una configuración donde se llevan a cabo 8 flujos y 8 exámenes para lograr la detección discreta de los 8 complejos ternarios individuales por ciclo. 30

Tal como se muestra en la Tabla 10, se pueden llevar a cabo cuatro flujos, cada uno administrando una mezcla de tres tipos de nucleótido, de modo que los cuatro tipos de nucleótido se evalúan tres veces cada uno. De nuevo, la polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente y se llevan a cabo exámenes después de cada flujo. El marcador fluorescente puede ser el mismo para ambos flujos. La señal esperada para un complejo ternario estabilizado formado en el primer flujo (y detectado en el 1<sup>er</sup> examen) indicará que se ha formado un complejo ternario, pero será ambiguo con respecto a si el complejo contiene una A, G o C como el siguiente nucleótido correcto. La señal detectada en el 2<sup>o</sup> examen será ambigua con respecto a si el complejo contiene una G, C o T como el siguiente nucleótido correcto. La señal detectada en el 3<sup>er</sup> examen será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A, C o T como el siguiente nucleótido correcto. La señal detectada en el 4<sup>o</sup> examen será ambigua con respecto a si el complejo contiene una A, G o T como el siguiente nucleótido correcto. 35 40

Tabla 10

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A + G + C				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(+)	(+)	(-)
Flujo de pol + G + C + T				
2 <sup>o</sup> examen	(-)	(+)	(+)	(+)
Flujo de pol + A + C + T				
3 <sup>er</sup> examen	(+)	(-)	(+)	(+)
Flujo de pol + A + G + T				
4 <sup>o</sup> examen	(+)	(+)	(-)	(+)

5 Como es evidente a partir de la comparación de señales en la Tabla 10 para los cuatro exámenes, la presencia de un complejo ternario donde el siguiente nucleótido correcto es A, G, C o T se puede determinar por desambiguación mediante la cual A se indica mediante una señal en el 1<sup>er</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> examen, G se indica mediante una señal en el 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> examen, C se indica mediante una señal en el 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> examen y T se indica mediante una señal en el 2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> examen.

10 Una ventaja de esta configuración es que cada tipo de nucleótido se observa tres veces por posición de plantilla (es decir, dos veces por ciclo de secuenciación). Esto a su vez mejora la precisión en comparación con una configuración donde solo se realiza una sola observación simple o doble para cada tipo de nucleótido por ciclo. El flujo de tres nucleótidos a la vez mejora la velocidad y reduce el coste del reactivo en comparación con una configuración donde se llevan a cabo 12 flujos y 12 exámenes para lograr la detección discreta de los 12 complejos ternarios individuales por ciclo.

15 En una variación de los ejemplos mostrados en las Tablas 9 y 10, los complejos ternarios que se detectan se pueden distinguir en cada examen en función del tipo de nucleótido que está presente en el complejo. Tomando como ejemplo la Tabla 9, los nucleótidos A y T pueden formar complejos ternarios que tienen un marcador rojo, mientras que los nucleótidos G y C pueden formar complejos ternarios que tienen marcadores azules. El uso de dos marcadores de esta manera permitirá que los dos complejos ternarios que resultan de cada flujo se distingan entre sí en cada examen. De forma similar, la escala de intensidad se puede utilizar para distinguir diferentes tipos de complejos ternarios en cada examen. Como tal, la desambiguación no es necesaria y, en cambio, se puede distinguir un tipo de complejo ternario del otro en cada examen para mejorar la precisión y la facilidad del análisis de datos.

20 Hay que tener en cuenta que la ausencia de señal para los nucleótidos no detectados durante cada examen (por ejemplo, C y T en el 1<sup>er</sup> examen de la Tabla 9) puede deberse a la ausencia de esos nucleótidos en el flujo. Como alternativa, los nucleótidos no detectados pueden estar presentes en el flujo y ser capaces de formar complejos ternarios que no son detectables (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con esos nucleótidos).

### Ejemplo 8: Códigos de detección de errores

35 Este ejemplo explota una capacidad única de los métodos SBB™ con el fin de detectar errores. Esto es posible porque la metodología SBB™ no requiere una incorporación irreversible cuando se determina el siguiente nucleótido en la secuencia. Dado que el examen es reversible, se puede hacer varias veces con combinaciones únicas de nucleótidos y marcadores fluorescentes en los nucleótidos para detectar cuándo se ha producido un error.

40 La detección de errores se demostrará para un método SBB™ que utiliza una serie de tres exámenes y dos estados de señal para cada ciclo. En este ejemplo, fluyen dos nucleótidos en cada examen y se usan tres combinaciones únicas de nucleótidos, donde nunca se introduce un nucleótido. La Tabla 11A muestra un orden de examen de ejemplo y los estados de señal esperados para los complejos ternarios formados con cada tipo de nucleótido. Aquí los estados de señal son (+) para la presencia de una señal y (-) para la ausencia de una señal. La Tabla 11B muestra la palabra clave (también conocida como corriente de dígitos) esperada para cada nucleótido.

45 Se puede realizar una lectura de base para cada ciclo en función del reconocimiento de una palabra clave válida que se muestra en la Tabla 11B. Si un ciclo de secuenciación para una plantilla da como resultado una palabra clave inválida (es decir, una que no se muestra en la Tabla 11B), entonces se sabe que se ha cometido un error. Sin embargo, el código no es suficientemente complejo para la corrección de errores.

Tabla 11A

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A + C				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(-)	(+)	(-)
Flujo de pol + A + G				
2 <sup>o</sup> examen	(+)	(+)	(-)	(-)
Flujo de pol + C + G				
3 <sup>er</sup> examen	(-)	(+)	(+)	(-)

Tabla 11B

Lectura de base	Palabra clave
A	110
G	011
C	101
T	000

- 5 En el ejemplo mostrado para las Tablas 11A y 11B, el nucleótido T se omite de todos los flujos (o, si está presente, no es detectable) y, por tanto, funciona como un 'nucleótido oscuro' cuya presencia se imputa. El nucleótido que se omite, en este ejemplo o en otras realizaciones en el presente documento que utilizan una base oscura, se puede seleccionar en función de las características de los nucleótidos. Por ejemplo, el nucleótido que se omite puede ser el
- 10 nucleótido más caro o el nucleótido que demuestra el peor desempeño en la formación o detección de complejos ternarios. En relación con los cuatro exámenes de implementación estándar de la SBB™, cada uno fluyendo un nucleótido a la vez, este esquema de codificación proporciona las ventajas de eliminar un flujo/examen, ahorrar tiempo y costes de reactivos, y proporcionar detección de errores mediante decodificación de señal.
- 15 Otra opción es realizar cuatro exámenes, incluidos dos nucleótidos por examen, con un estado de señal binaria. Una ventaja de esta configuración es que no hay nucleótidos oscuros en todo el ciclo. Esta configuración se describe en el Ejemplo 7 y se resume en la Tabla 9. Las palabras clave para cada tipo de base válido que surgen de la configuración de la Tabla 9 se muestran en la Tabla 12.

20

Tabla 12

Lectura de base	Palabra clave
A	1100
G	1010
C	0101
T	0011

25

La corrección parcial del error, o la recuperación del error, es posible bajo el esquema de las Tablas 9 y 12 cuando se sospecha, o se sabe, que uno, y solo uno de los exámenes, es erróneo. Un examen se puede considerar sospechoso por muchas razones, por ejemplo, la intensidad no es definitivamente alta o baja, imagen desenfocada, etc. La Tabla 13 muestra las palabras clave que resultarían para cada lectura de base en el caso de un solo examen sospechoso del ciclo que se muestra en la Tabla 9. Un signo de interrogación en cada palabra clave denota el resultado de un ciclo sospechoso. De la Tabla 13 se desprende que las cuatro bases se pueden leer de forma única en el caso de un solo ciclo sospechoso.

30

Tabla 13

Lectura de base	Palabra clave
A	?10
A	1?0

(continuación)

Lectura de base	Palabra clave
A	11?
C	?01
C	1?1
C	10?
G	?11
G	0?1
G	01?
T	?00
T	0?0
T	00?

5 En las configuraciones a modo de ejemplo de este Ejemplo, la polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente. La ausencia de señal para cualquier nucleótido puede deberse a la ausencia del nucleótido en el flujo. Como alternativa, el nucleótido no detectado puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios, aunque no se detecten los complejos ternarios (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con ese nucleótido).

10 Las configuraciones a modo de ejemplo de las Tablas 11A, 11B, 12 y 13 usan un estado de señal detectable (+) y un estado oscuro (-), lo que proporciona una ventaja de distinguir cuatro tipos de base usando un solo canal de detección. Una variación es usar dos estados de señal detectables, por ejemplo, dos longitudes de onda de luminiscencia. Aunque un segundo canal de detección añadiría complejidad a un aparato de detección, la identificación positiva de cada nucleótido en cada flujo puede proporcionar ventajas para mejorar la confianza en la lectura de base.

15 **Ejemplo 9: Código de corrección de errores**

20 Este ejemplo explota aún más una capacidad única de los métodos de SBB™ con el propósito no solo de detectar errores sino también de corregirlos. Dado que el examen es reversible, se puede hacer varias veces con combinaciones únicas de nucleótidos y marcadores fluorescentes en los nucleótidos para no solo detectar cuándo se ha producido un error, sino también corregirlo.

25 La detección y corrección de errores se proporciona utilizando un ciclo de SBB™ que incluye cinco exámenes con dos nucleótidos por flujo/examen. La Tabla 14A muestra un orden de examen de ejemplo y los estados de señal esperados para los complejos ternarios formados con cada tipo de nucleótido. Aquí los estados de señal son (+) para la presencia de una señal y (-) para la ausencia de una señal. La Tabla 14B muestra la palabra clave esperada para cada nucleótido.

Tabla 14A

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A + G				
1 <sup>er</sup> examen	(+)	(+)	(-)	(-)

30

(continuación)

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A + C				
2º examen	(+)	(-)	(+)	(-)
Flujo de pol + G + T				
3º examen	(-)	(+)	(-)	(+)
Flujo de pol + C + T				
4º examen	(-)	(-)	(+)	(+)
Flujo de pol + A + T				
5º examen	(+)	(-)	(-)	(+)

Tabla 14B

Lectura de base	Palabra clave
A	11001
G	10100
C	01010
T	00111

- 5 Cada una de las palabras clave válidas está al menos a tres ediciones de cualquier otra palabra clave válida. Si se comete un error de un dígito, se puede encontrar la palabra clave válida más cercana y ese nucleótido se selecciona como la lectura de base para ese ciclo.

10 Las configuraciones a modo de ejemplo de las Tablas 14A y 14B usan un estado de señal detectable (+) y un estado oscuro (-), lo que proporciona una ventaja de distinguir cuatro tipos de base usando un solo canal de detección. Una variación es usar dos estados de señal detectables, por ejemplo, dos longitudes de onda de luminiscencia. Aunque un segundo canal de detección añadiría complejidad a un aparato de detección, la identificación positiva de cada nucleótido en cada flujo puede proporcionar ventajas para mejorar la confianza en la lectura de base.

15 Aunque el ciclo que se muestra en la Tabla 14A proporciona la corrección de errores, una desventaja es el aumento del tiempo y el uso de reactivos como resultado de realizar más exámenes que el número de nucleótidos a resolver. Otra opción para la corrección y detección de errores que es más eficaz desde la perspectiva del número de exámenes introduce un segundo colorante. El resultado es un esquema de codificación que utiliza un estado de señal ternario (primer color, segundo color y oscuro) representado por dígitos ternarios en el código.

20

Tabla 15A

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>azul</sub> + C <sub>rojo</sub>				
1º examen	azul	(-)	rojo	(-)
Flujo de pol + C <sub>azul</sub> + G <sub>rojo</sub>				
2º examen	(-)	rojo	azul	(-)
Flujo de pol + G <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
3º examen	(-)	azul	(-)	rojo
Flujo de pol + A <sub>rojo</sub> + T <sub>azul</sub>				
4º examen	rojo	(-)	(-)	azul



Tabla 15B

Lectura de base	Palabra clave
A	2001
G	0120
C	1200
T	0012

5 La configuración en la Tabla 15A usa detección de dos canales (emisión roja y azul), y cada uno de los cuatro nucleótidos se proporciona en dos formas (una con un colorante rojo y una segunda con un colorante azul) para un total de ocho nucleótidos marcados utilizados por ciclo. Una modificación en el enfoque de dos colores es conservar los colores de nucleótidos en los exámenes. Esto cambiaría la solicitud anterior para que A y G sean siempre azules, y C y T siempre sean rojas. La configuración del ciclo se muestra en la Tabla 16A y las palabras clave resultantes para cada lectura de base válida se muestran en la Tabla 16B.

10

Tabla 16A

Etapa	A	G	C	T
Flujo de pol + A <sub>azul</sub> + C <sub>rojo</sub>				
1 <sup>er</sup> examen	azul	(-)	rojo	(-)
Flujo de pol + C <sub>rojo</sub> + G <sub>azul</sub>				
2 <sup>o</sup> examen	(-)	azul	rojo	(-)
Flujo de pol + G <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
3 <sup>er</sup> examen	(-)	azul	(-)	rojo
Flujo de pol + A <sub>azul</sub> + T <sub>rojo</sub>				
4 <sup>o</sup> examen	azul	(-)	(-)	rojo

Tabla 16B

Lectura de base	Palabra clave
A	2002
G	0220
C	1100
T	0011

15 En las configuraciones a modo de ejemplo de este Ejemplo, la polimerasa o el nucleótido se pueden unir a un marcador fluorescente. La ausencia de señal para cualquier nucleótido puede deberse a la ausencia del nucleótido en el flujo. Como alternativa, el nucleótido no detectado puede estar presente en el flujo y ser capaz de formar complejos ternarios, aunque no se detecten los complejos ternarios (por ejemplo, debido a la ausencia de un marcador en el complejo ternario formado con ese nucleótido). La configuración en las Tablas 15A y 16A se puede modificar para usar la escala de intensidad, en lugar de las diferencias de longitud de onda, para distinguir los complejos ternarios estabilizados. Por ejemplo, los marcadores rojos se pueden retener y los marcadores azules se pueden reemplazar con marcadores rojos que tienen una fracción de la intensidad de los marcadores rojos que se retienen. Una ventaja de esta modificación es que la detección de dos canales se puede reemplazar por una detección de canal único más simple y más barata (siempre y cuando las intensidades de señal se puedan distinguir en el canal único).

25 Las configuraciones a modo de ejemplo de las Tablas 15A y 16A usan dos estados de señal detectables (rojo y azul) y un estado oscuro (-), lo que proporciona una ventaja de distinguir cuatro tipos de base usando solo dos canales de detección. Una variación es usar tres estados de señal detectables, por ejemplo, tres longitudes de onda de luminiscencia. Aunque un tercer canal de detección añadiría complejidad a un aparato de detección, la identificación positiva de cada nucleótido en cada flujo puede proporcionar ventajas para mejorar la confianza en la lectura de base.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el tipo de base en una posición en un ácido nucleico de plantilla, que comprende las etapas de:

- 5 (a) poner en contacto un ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una primera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en una posición de nucleótido en la plantilla, en donde la primera mezcla comprende un análogo de nucleótido de un primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base, en donde dichos análogos de nucleótido están unidos a marcadores exógenos de la misma estructura química o a diferentes marcadores exógenos que producen una señal superpuesta de modo que las señales son ambiguas;
- 10 b) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una segunda mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la segunda mezcla comprende un análogo de nucleótido del primer tipo de base y un análogo de nucleótido de un tercer tipo de base, en donde dichos análogos de nucleótido están unidos a marcadores exógenos de la misma estructura química o a diferentes marcadores exógenos que producen una señal superpuesta de modo que las señales son ambiguas;
- 15 (c) examinar los productos de las etapas (a) y (b) para detectar señales producidas por un complejo ternario que comprende el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (a) son ambiguas para el primer y el segundo tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (b) son ambiguas para el primer y el tercer tipo de base;
- 20 (d) desambiguación de señales adquiridas en la etapa (c) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico de plantilla cebado no está en contacto con un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base durante la etapa (c).

30 3. El método de la reivindicación 2, en el que

- 35 (i) el primer tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b),  
 (ii) el segundo tipo de base se correlaciona con la presencia de señales para el producto de la etapa (a) y la ausencia de señales para el producto de la etapa (b), y  
 (iii) el tercer tipo de base se correlaciona con la ausencia de señales para el producto de la etapa (a) y la presencia de señales para el producto de la etapa (b).

40 4. El método de la reivindicación 3, en el que la primera mezcla carece de análogos de nucleótido del tercer y cuarto tipos de base, y en donde la segunda mezcla carece de análogos de nucleótido del segundo y cuarto tipos de base.

5. El método de la reivindicación 4, en el que (iv) el cuarto tipo de base se correlaciona con la ausencia de señales para el producto de la etapa (a) y la ausencia de señales para el producto de la etapa (b).

45 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el examen de los productos de la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b).

7. El método de la reivindicación 1, que además comprende

- 50 (i) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una tercera mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la tercera mezcla comprende un análogo de nucleótido del segundo tipo de base y un análogo de nucleótido de un cuarto tipo de base;
- 55 (ii) poner en contacto el ácido nucleico de plantilla cebado con una polimerasa y una cuarta mezcla de nucleótidos en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde la cuarta mezcla comprende un análogo de nucleótido del tercer tipo de base y un análogo de nucleótido del cuarto tipo de base; y
- 60 (iii) examinar los productos de las etapas (i) y (ii) para detectar señales producidas por un complejo ternario que comprende el ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa y un siguiente nucleótido correcto, en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (i) son ambiguas para el segundo y el cuarto tipo de base, y en donde las señales adquiridas para el producto de la etapa (ii) son ambiguas para el tercer y el cuarto tipo de base.

8. Un método para identificar el tipo de base en una posición en un ácido nucleico de plantilla, que comprende:

- 65 (a) examinar una mezcla que comprende un ácido nucleico de plantilla cebado, una polimerasa, un análogo de nucleótido de un primer tipo de base en la plantilla y un análogo de nucleótido de un segundo tipo de base en la

- plantilla, en condiciones para estabilizar un complejo ternario en una posición de nucleótido en la plantilla, en donde dichos análogos de nucleótido están unidos a marcadores exógenos de la misma estructura química o a diferentes marcadores exógenos que producen una señal superpuesta, de modo que las señales adquiridas de la mezcla son ambiguas para el primer y el segundo tipo de base;
- 5 b) examinar una segunda mezcla que incluye el mismo ácido nucleico de plantilla cebado y una polimerasa, en condiciones para estabilizar un complejo ternario en la posición de nucleótido en la plantilla, en donde
- 10 i) la segunda mezcla comprende un primer tipo de nucleótido de la primera mezcla y carece de un segundo tipo de nucleótido de la primera mezcla, o comprende tanto el primer como el segundo tipo de nucleótido de la primera mezcla pero no produce una señal para dicho segundo tipo de nucleótido;
- o
- 15 ii) la segunda mezcla comprende al menos un tipo de nucleótido de la primera mezcla en donde el marcador para dicho nucleótido se ha cambiado entre la primera y la segunda mezcla de modo que haya un cambio en la señal detectable; y
- (c) desambiguar las señales adquiridas de (a) y (b) para identificar un tipo de base que se une al siguiente nucleótido correcto.
- 20 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa de lavado entre las etapas (a) y (b) para eliminar uno o más componentes de la primera mezcla del ácido nucleico de plantilla cebado.
- 25 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas se llevan a cabo para una pluralidad de ácidos nucleicos de plantilla cebados que tienen diferentes secuencias, opcionalmente en donde la pluralidad de ácidos nucleicos de plantilla cebados se une a una matriz.
- 30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende exámenes repetitivos de la capacidad de un tipo de nucleótido análogo particular para formar un complejo ternario en una posición de plantilla dada.
- 35 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende exámenes repetitivos de la capacidad de cada tipo de nucleótido análogo para formar un complejo ternario en una posición de plantilla dada.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además añadir un siguiente nucleótido correcto terminado de forma reversible al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado después de las etapas de examen, produciendo así un cebador extendido terminado de forma reversible.
- 40 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además repetir las etapas de la reivindicación 1 o la reivindicación 8 para el ácido nucleico de plantilla cebado que comprende el cebador extendido terminado de forma reversible.
15. El método de la reivindicación 13, que comprende además eliminar la fracción de terminación reversible del cebador extendido terminado de forma reversible después de que se completen las etapas de examen.
- 45 16. El método de la reivindicación 13, en el que la etapa de añadir un siguiente nucleótido correcto terminado de forma reversible al cebador del ácido nucleico de plantilla cebado se lleva a cabo antes de la etapa de desambiguación.