

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 079**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6818 (2008.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015 PCT/US2015/049393**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16040607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015 E 15774750 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3191606**

54 Título: **Métodos para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia**

30 Prioridad:

12.09.2014 US 201462049883 P

16.12.2014 US 201462092693 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOYANOV, BOYAN;
QIANG, LIANGLIANG;
GUNDERSON, KEVIN, L.;
KLAUSING, KAY;
PICKERING, LEA;
DE LATTRE, CYRIL y
KHURANA, TARUN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 803 079 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 para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia

Campo

Esta solicitud se refiere generalmente a detectar la presencia de una subunidad de polímero.

5 Antecedentes

La detección de analitos, tales como las secuencias de ácido nucleico que están presentes en una muestra biológica, se ha utilizado como un método para identificar y clasificar microorganismos, diagnosticar enfermedades infecciosas, detectar y caracterizar anomalías genéticas, identificar cambios genéticos asociados con el cáncer, estudiar la susceptibilidad genética a la enfermedad, y medir la respuesta a varios tipos de tratamiento. Una técnica común para

10 detectar analitos tales como secuencias de ácido nucleico en una muestra biológica es la secuenciación de ácidos nucleicos.

La metodología de secuenciación de ácidos nucleicos ha evolucionado significativamente a partir de los métodos de degradación química utilizados por Maxam y Gilbert y los métodos de elongación de cadena utilizados por Sanger. Hoy en día se utilizan varias metodologías de secuenciación que permiten el procesamiento paralelo de miles de

15 ácidos nucleicos, todo en una sola operación de secuenciación. La instrumentación que realiza tales métodos es típicamente grande y costosa, ya que los métodos actuales se basan generalmente en grandes cantidades de reactivos costosos y múltiples conjuntos de filtros ópticos para registrar la incorporación de ácidos nucleicos en las reacciones de secuenciación.

Ha quedado claro que la necesidad de tecnologías de secuenciación de ADN más pequeñas, más económicas y de alto rendimiento será beneficiosa para recoger los frutos de la secuenciación del genoma. La atención médica personalizada se está moviendo hacia la vanguardia y se beneficiará de tales tecnologías; la secuenciación del genoma de un individuo para identificar mutaciones y anomalías potenciales será crucial para identificar si una persona tiene una enfermedad en particular, seguida de terapias posteriores adaptadas a ese individuo. Para acomodar un esfuerzo tan agresivo, la secuenciación debe avanzar y estar abierta a las tecnologías de alto rendimiento

20 no solo por sus capacidades de alto rendimiento, sino también en términos de facilidad de uso, eficiencia de tiempo y costo, y acceso clínico a instrumentos y reactivos.

Los siguientes documentos pueden ser útiles para comprender la presente invención.

WO9954503 describe un método para la detección quimioluminiscente secuencial de dos analitos marcados de manera diferente en una sola transferencia. En el método, se detecta un ADN marcado de forma única con un sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP) seguido de la detección de otro ADN marcado de forma única con un segundo sustrato enzimático diferente que también inhibe la quimioluminiscencia generada por HRP. El método de detección secuencial descrito en la presente memoria elimina la necesidad de remover y reprobar las transferencias Southern, Northern y Western. Las aplicaciones potenciales de este método incluyen la toma de huellas digitales de ADN forense donde se usa más de una sonda para sondear una transferencia Southern, secuenciación de ADN múltiple de más de

35 un molde, detección de reordenamientos genéticos, mutaciones y ligamiento genético.

WO2005007874 describe ensayos quimioluminiscentes para determinar la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos marcados en una muestra, en donde un soporte sólido se pone en contacto secuencialmente con el primer y segundo sustrato quimioluminiscente, cada uno de los cuales es capaz de ser activado por una enzima y se detectan las señales quimioluminiscentes resultantes. Una pluralidad de sondas está dispuesta en una capa superficial del soporte sólido en una pluralidad de áreas discretas. Algunas de las sondas están unidas a un conjugado de la primera enzima y algunas de las sondas están unidas a un conjugado de la segunda enzima. El ensayo se puede usar para comparar muestras biológicas (por ejemplo, poblaciones de ARNm de diferentes células) en la misma superficie de soporte. Alternativamente, una de las señales quimioluminiscentes generadas puede usarse como una señal de control para normalizar los datos del ensayo quimioluminiscente.

40

WO2006041745 describe métodos, aparatos y sistemas para detectar moléculas diana en muestras.

US2011097723 se refiere al uso de una molécula/enzima quimioluminiscente y fluorescente acoplada con moléculas de unión de analito para detectar moléculas de analito específicas.

AIPING FAN ET AL, "Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analytes", BUNSEKI-KAGAKU = ANALYTICAL CHEMISTRY, JP, (20090501), vol. 25, no. 5, doi: 10.2116/analsci.25.587, ISSN 0910-6340, páginas 587-597 analiza los avances recientes en los ensayos de CL que se han producido en los últimos años, incluidas las diferentes clases de marcadores de CL, tales como los ensayos de CL basados en nanopartículas, DNzyme, éster de acridinio, enzimas y luminol, referentes a la detección de ADN y proteínas. También se discuten las técnicas de resolución espacial y de resolución de zona de sustrato.

50

Anónimo, "Instructions: Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module", (20110101), páginas 1-3, URL:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011520_Chemiluminescent_NucAcid_Detect_Mod_UG.pdf, (20151124) describe el Módulo de detección de ácido nucleico quimioluminiscente de Thermo Scientific, que es un sistema completo para la detección de ácidos nucleicos marcados con biotina para diversas aplicaciones de transferencia que incluyen transferencias Northern/Southern, ensayos de protección de ribonucleasa (RPA) y ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA) o ensayos de desplazamiento en gel. El sistema utiliza un sustrato de luminol mejorado para la peroxidasa de rábano picante (HRP) con etapas optimizadas de bloqueo y lavado que conjuntamente producen una sensibilidad equivalente a los sistemas radiactivos (32P) y se dice que proporciona un fondo limpio y consistente requerido para los datos con calidad de publicación.

El documento WO03020895 describe un nuevo método para analizar secuencias de ácido nucleico basado en la detección en tiempo real de la incorporación catalizada por ADN polimerasa de cada una de las cuatro bases de nucleótidos, suministradas individualmente y en serie en un sistema microfluídico, a una célula de reacción que contiene un sistema de molde que comprende un fragmento de ADN de secuencia desconocida y un cebador oligonucleotídico. La incorporación de una base de nucleótido en el sistema de molde se puede detectar mediante cualquiera de una variedad de métodos que incluyen, pero no están limitados a, detección de fluorescencia y quimioluminiscencia. Alternativamente, la detección microcalorimétrica del calor generado por la incorporación de un nucleótido en el sistema de molde que se extiende usando termopila, termistor y mediciones de índice de refracción se puede usar para detectar reacciones de extensión.

Resumen

Las realizaciones de la presente descripción proporcionan composiciones, sistemas y métodos para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia.

Bajo un aspecto, una composición incluye un sustrato; un primer polinucleótido acoplado al sustrato; un segundo polinucleótido hibridado con el primer polinucleótido; y un catalizador acoplado a un primer nucleótido del segundo polinucleótido, siendo el catalizador operable para causar que una molécula quimioluminogénica emita un fotón.

En algunas realizaciones, la composición incluye además una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas. El catalizador puede hacer que cada una de las moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente. La composición puede incluir además una pluralidad de moléculas reactivas, el catalizador hace que cada una de las moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente oxidando esa molécula quimioluminogénica usando una molécula reactiva. La molécula quimioluminogénica oxidada puede tener un estado excitado que se desintegra emitiendo el fotón correspondiente.

En algunas realizaciones, el catalizador es escindible del primer nucleótido.

En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al primer nucleótido a través de un primer resto acoplado al nucleótido, y un segundo resto acoplado al primer resto y al catalizador. En un ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos puede ser biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos puede ser estreptavidina. En otro ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es digoxigenina, y el otro del primer y segundo restos es antidigoxigenina.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye una enzima. En un ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye luciferina o un derivado de luciferina. En otro ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina. En otro ejemplo ilustrativo más, la enzima incluye un cortador de 1,2-dioxetano, y la molécula quimioluminogénica incluye un derivado de 1,2-dioxetano.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye luminol o un derivado de luminol. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido puede incluir una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido puede incluir un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye acridinio o un derivado de acridinio. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido puede incluir una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido puede incluir un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.

Un sistema puede incluir cualquiera de las composiciones y circuitería anteriores configurados para detectar el fotón emitido por la molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, la circuitería está configurada además para detectar la presencia del primer nucleótido basado en la detección del fotón.

Bajo otro aspecto, un método puede incluir proporcionar un sustrato; proporcionar un primer polinucleótido acoplado al sustrato; hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido; acoplar un primer catalizador a un primer nucleótido del segundo polinucleótido; y causar, por el primer catalizador, que una primera molécula quimioluminogénica emita un fotón.

En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar una pluralidad de las primeras moléculas quimioluminogénicas. En algunas realizaciones, el método incluye además causar, por el primer catalizador, que cada

una de las primeras moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente. En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar una pluralidad de moléculas reactivas y causar, por el primer catalizador, que cada una de las primeras moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente oxidando esa primera molécula quimioluminogénica usando una molécula reactiva. En algunas realizaciones, la primera molécula quimioluminogénica oxidada tiene un estado excitado que se desintegra emitiendo el fotón correspondiente.

En algunas realizaciones, el método incluye además acoplar una polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. La polimerasa puede añadir un segundo nucleótido al segundo polinucleótido. En algunas realizaciones, el método puede incluir además escindir el primer catalizador del primer nucleótido antes de acoplar la polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. En algunas realizaciones, el método puede incluir además añadir el segundo nucleótido al primer polinucleótido después de acoplar la polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. En algunas realizaciones, el método puede incluir además el acoplamiento de un segundo catalizador al segundo nucleótido. En algunas realizaciones, el segundo catalizador se acopla al segundo nucleótido después de añadir el segundo nucleótido al segundo polinucleótido. En algunas realizaciones, el segundo nucleótido está acoplado a un primer resto, el segundo catalizador está acoplado a un segundo resto, y dicho segundo catalizador está acoplado al segundo nucleótido acoplado el segundo resto al primer resto. En algunas realizaciones, el método incluye además causar, por el segundo catalizador, que una segunda molécula quimioluminogénica emita un fotón.

En algunas realizaciones, el primer catalizador y el segundo catalizador son el mismo tipo de catalizador entre sí. La primera molécula quimioluminogénica y la segunda molécula quimioluminogénica pueden ser el mismo tipo de molécula quimioluminogénica entre sí. En otras realizaciones, el primer catalizador y el segundo catalizador son diferentes tipos de catalizadores entre sí. La primera molécula quimioluminogénica y la segunda molécula quimioluminogénica pueden ser diferentes tipos de moléculas quimioluminogénicas entre sí.

En algunas realizaciones, el primer nucleótido está acoplado a un tercer resto, el primer catalizador está acoplado a un cuarto resto, y dicho primer catalizador está acoplado al primer nucleótido acoplado el cuarto resto al tercer resto. Ilustrativamente, el primer resto y el tercer resto pueden ser diferentes entre sí. Ilustrativamente, el segundo resto y el cuarto resto pueden ser diferentes entre sí.

En algunas realizaciones, el método puede incluir además detectar el fotón emitido por la segunda molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método puede incluir además detectar la presencia del segundo nucleótido basándose en la detección del fotón. En algunas realizaciones, el método puede incluir además detectar el fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar la presencia del primer nucleótido en base a la detección del fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además escindir el primer catalizador del primer nucleótido.

En algunas realizaciones, el primer nucleótido está acoplado a un primer resto, el primer catalizador está acoplado a un segundo resto, y dicho primer catalizador está acoplado al primer nucleótido acoplado el primer resto al segundo resto. En un ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos es estreptavidina. En otro ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es digoxigenina, y el otro del primer y segundo restos es antidigoxigenina.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye una enzima. En un ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye una luciferina o un derivado de luciferina. En otro ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina. En otro ejemplo ilustrativo más, la enzima incluye un cortador de 1,2-dioxetano, y la molécula quimioluminogénica incluye un derivado de 1,2-dioxetano.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye luminol o un derivado de luminol. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.

En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye acridinio o un derivado de acridinio. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.

En algunas realizaciones, el método incluye además detectar el fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar la presencia de la primera subunidad en base a la detección del fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica.

Bajo otro aspecto, un método para secuenciar un primer polinucleótido incluye proporcionar el primer polinucleótido que se secuenciará y se acoplará a un sustrato; b) hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido; y poner en contacto el segundo polinucleótido con una polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. Un primer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un primer resto, un segundo subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un segundo resto, un tercer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un tercer resto, y un cuarto subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un cuarto resto o sin resto. El método puede incluir además añadir un nucleótido de la pluralidad de nucleótidos al segundo polinucleótido basándose en una secuencia

- del primer polinucleótido. El método puede incluir además exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además exponer el nucleótido a una molécula de corte; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además detectar el nucleótido añadido basándose en la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en una o más de las etapas de detección o una combinación de los mismos.
- 5 Bajo otro aspecto, una composición incluye un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón; un sustrato; un primer polinucleótido acoplado al sustrato; un segundo polinucleótido hibridado con el primer polinucleótido; y un apantallador acoplado a un primer nucleótido del segundo polinucleótido, el apantallador operable para inhibir la emisión de fotones por la molécula quimioluminogénica.
- 10 Algunas realizaciones incluyen además una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas. En algunas realizaciones, el apantallador inhibe la emisión de fotones por cada una de las moléculas quimioluminogénicas. Algunas realizaciones incluyen además una pluralidad de moléculas reactivas, el catalizador hace que cada una de las moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente oxidando esa molécula quimioluminogénica usando una molécula reactiva en ausencia del apantallador. En algunas realizaciones, la molécula quimioluminogénica oxidada tiene un estado excitado que se desintegra emitiendo el fotón correspondiente en ausencia del apantallador.
- 15 En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al sustrato. En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al primer polinucleótido. En algunas realizaciones, el apantallador es escindible del primer nucleótido.
- 20 En algunas realizaciones, el apantallador está acoplado al primer nucleótido a través de un primer resto acoplado a la primera subunidad, y un segundo resto acoplado al primer resto y al apantallador. En un ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos es estreptavidina. En otro ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es digoxigenina, y el otro de los primeros y segundos restos es antidigoxigenina.
- 25 En algunas realizaciones, el catalizador incluye una enzima. En un ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye una luciferina o un derivado de luciferina. En otro ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina. En otro ejemplo ilustrativo más, la enzima incluye un cortador de 1,2-dioxetano, y la molécula quimioluminogénica incluye un derivado de 1,2-dioxetano.
- 30 En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye luminol o un derivado de luminol. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.
- 35 En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye acridinio o un derivado de acridinio. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.
- 40 En algunas realizaciones, el apantallador se selecciona del grupo que consiste en Apantallador DABCYL, Apantallador BHQ-1®, Apantallador BHQ-2®, Apantallador BHQ-3®, Apantallador ECLIPSE, Apantallador BHQ-0 Dark, Apantallador ELLEQUENCHER, IOWA BLACK®, Ácido (±) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (nombre comercial Trolox), apantallador QSY 7, apantallador QSY 9, apantallador QSY 21 y apantallador QSY 35.
- 45 Un sistema puede incluir cualquiera de las composiciones y circuitería anteriores configurados para detectar un fotón emitido por la molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, la circuitería está configurada además para detectar la presencia del primer nucleótido en base a la inhibición de la emisión del fotón.
- 50 Bajo otro aspecto, un método incluye proporcionar un catalizador operable para causar que una primera molécula quimioluminogénica emita un fotón; proporcionar un sustrato; proporcionar un primer polinucleótido acoplado al sustrato; hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido; acoplar un primer apantallador a un primer nucleótido del segundo polinucleótido; e inhibir, por el primer apantallador, la emisión de fotones por la primera molécula quimioluminogénica.
- 55 En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar una pluralidad de las primeras moléculas quimioluminogénicas. En algunas realizaciones, el método incluye además causar, por el primer catalizador, que cada una de las primeras moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente en ausencia del apantallador. En algunas realizaciones, el método incluye además proporcionar una pluralidad de moléculas reactivas, el primer catalizador operable para hacer que cada una de las primeras moléculas quimioluminogénicas emita un fotón correspondiente oxidando esa primera molécula quimioluminogénica usando una molécula reactiva en ausencia del apantallador. En algunas realizaciones, la primera molécula quimioluminogénica oxidada tiene un estado excitado que se desintegra emitiendo el fotón correspondiente en ausencia del apantallador.

- En algunas realizaciones, el método incluye además acoplar una polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. En algunas realizaciones, la polimerasa agrega un segundo nucleótido al segundo polinucleótido. En algunas realizaciones, el método incluye además escindir el primer apantallador del primer nucleótido antes de acoplar la polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. En algunas realizaciones, el método incluye además añadir el segundo nucleótido al primer polinucleótido después de acoplar la polimerasa al primer y segundo polinucleótidos. En algunas realizaciones, el método incluye además el acoplamiento de un segundo apantallador al segundo nucleótido. En algunas realizaciones, el segundo apantallador se acopla al segundo nucleótido después de añadir el segundo nucleótido al primer polinucleótido. En algunas realizaciones, el segundo nucleótido está acoplado a un primer resto, el segundo apantallador está acoplado a un segundo resto, y dicho segundo apantallador está acoplado al segundo nucleótido acoplado el segundo resto al primer resto. En algunas realizaciones, el segundo apantallador inhibe la emisión de fotones por una segunda molécula quimioluminogénica.
- En algunas realizaciones, el primer apantallador y el segundo apantallador son el mismo tipo de apantallador entre sí. En un ejemplo ilustrativo, la primera molécula quimioluminogénica y la segunda molécula quimioluminogénica son el mismo tipo de molécula quimioluminogénica entre sí.
- En algunas realizaciones, el primer apantallador y el segundo apantallador son diferentes tipos de apantalladores entre sí. En un ejemplo ilustrativo, la primera molécula quimioluminogénica y la segunda molécula quimioluminogénica son diferentes tipos de moléculas quimioluminogénicas entre sí.
- En algunas realizaciones, el primer nucleótido está acoplado a un tercer resto, el primer apantallador está acoplado a un cuarto resto, y dicho primer apantallador está acoplado al primer nucleótido acoplado el cuarto resto al tercer resto. En un ejemplo ilustrativo, el primer resto y el tercer resto son diferentes entre sí. En otro ejemplo ilustrativo, el segundo resto y el cuarto resto son diferentes entre sí.
- En algunas realizaciones, el método incluye además detectar el fotón emitido por la segunda molécula quimioluminogénica en ausencia del segundo apantallador. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar la presencia del segundo nucleótido en base a la inhibición de la emisión del fotón por la segunda molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar el fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica en ausencia del primer apantallador. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar la presencia del primer nucleótido en base a la detección de la inhibición de la emisión del fotón por la primera molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además escindir el primer apantallador del primer nucleótido.
- En algunas realizaciones, el primer nucleótido está acoplado a un primer resto, el primer apantallador está acoplado a un segundo resto, y dicho primer apantallador está acoplado al primer nucleótido acoplado el primer resto al segundo resto. En un ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos es estreptavidina. En otro ejemplo ilustrativo, uno de los primeros y segundos restos es digoxigenina, y el otro de los primeros y segundos restos es antidigoxigenina.
- En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al segundo polinucleótido. En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al primer polinucleótido. En algunas realizaciones, el catalizador está acoplado al sustrato.
- En algunas realizaciones, el catalizador incluye una enzima. En un ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye una luciferina o un derivado de luciferina. En otro ejemplo ilustrativo, la enzima incluye una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina. En otro ejemplo ilustrativo más, la enzima incluye un cortador de 1,2-dioxetano, y la molécula quimioluminogénica incluye un derivado de 1,2-dioxetano.
- En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye luminol o un derivado de luminol. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.
- En algunas realizaciones, el catalizador incluye un generador de peróxido, y la molécula quimioluminogénica incluye acridinio o un derivado de acridinio. En un ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye una enzima. En otro ejemplo ilustrativo, el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.
- En algunas realizaciones, el método incluye además detectar el fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica. En algunas realizaciones, el método incluye además detectar la presencia del primer nucleótido en base a la detección del fotón emitido por la primera molécula quimioluminogénica.
- Bajo otro aspecto, un método para secuenciar un primer polinucleótido incluye proporcionar el primer polinucleótido que se secuenciará y se acoplará a un sustrato; hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido; y proporcionar un catalizador acoplado suficientemente cerca del segundo polinucleótido de manera que un apantallador acoplado al segundo polinucleótido pueda inhibir la emisión de fotones de las moléculas quimioluminiscentes que interactúan con el catalizador. El método puede incluir además poner en contacto el segundo polinucleótido con una polimerasa y una pluralidad de nucleótidos. Un primer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un primer resto, un segundo subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un segundo resto, un tercer subconjunto de la

pluralidad de nucleótidos incluye un tercer resto, y un cuarto subconjunto de la pluralidad de nucleótidos incluye un cuarto resto o sin resto. El método puede incluir además añadir un nucleótido de la pluralidad de nucleótidos al segundo polinucleótido basándose en una secuencia del primer polinucleótido. El método puede incluir además exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un quinto resto; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un sexto resto; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además exponer el nucleótido a una molécula de corte; exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas; y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas. El método puede incluir además detectar el nucleótido añadido basándose en la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en una o más de las etapas de detección o una combinación de los mismos.

Bajo otro aspecto más, un método para detectar nucleótidos incluye incorporar nucleótidos en polinucleótidos; realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir un catalizador o apantallador a, o eliminar un catalizador o apantallador de, al menos un nucleótido incorporado; capturar al menos primera y segunda imágenes en presencia de moléculas quimioluminogénicas; y realizar lecturas automáticas de nucleótidos basadas en al menos la primera y segunda imágenes.

Bajo otro aspecto más, un método para detectar nucleótidos incluye incorporar nucleótidos marcados con fluoróforo en polinucleótidos usando proteína de fusión catalizador-polimerasa; capturar al menos una imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas; y realizar lecturas automáticas de nucleótidos basadas en al menos una imagen.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A-1C ilustran esquemáticamente composiciones para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 2 ilustra un método para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 3 ilustra esquemáticamente una composición alternativa para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 4 ilustra un método alternativo para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 5 ilustra esquemáticamente una composición para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La secuencia se describe como SEQ ID NO: 1.

Las FIGS. 6A-6C ilustran esquemáticamente composiciones alternativas para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. En las FIGS. 6A-6C, la secuencia se describe como SEQ ID NO: 2.

La FIG. 7 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

Las FIGS. 8A-8M ilustran esquemáticamente composiciones para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. En las FIGS. 8A-8E, la secuencia se describe como SEQ ID NO: 3, en las FIGS. 8F-8H, la secuencia se describe como SEQ ID NO: 4, en las FIGS. 8I-8L, la secuencia se describe como SEQ ID NO: 5, y en la FIG. 8M, la secuencia se describe como SEQ ID NO: 6.

La FIG. 9 ilustra un método alternativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

Las FIGS. 10A-10B ilustran esquemáticamente sistemas que incluyen circuitería de detección configurada para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

Las FIGS. 11A-11B ilustran esquemáticamente sistemas que incluyen circuitería de detección configurada para detectar la presencia de subunidades de polímeros en conjuntos de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 12 ilustra un gráfico de la relación señal/ruido (S/N) calculada en función de la renovación de las moléculas quimioluminogénicas que tienen diferentes eficiencias cuánticas entre sí, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

Las FIGS. 13A-13E ilustran imágenes obtenidas durante un método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

5 Las FIGS. 14A-14E ilustran imágenes obtenidas durante otro método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 15A ilustra una imagen obtenida durante otro método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

10 La FIG. 15B ilustra una gráfica de la intensidad de píxeles en función de la distancia en la imagen de la FIG. 15A, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 16 ilustra una vista en sección transversal lateral de un ejemplo de una celda de flujo que usa quimioluminiscencia para proporcionar una secuenciación luminiscente sustancialmente sin luz por esquema de síntesis (SBS), de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

15 La FIG. 17 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de base en un esquema de secuenciación de SBS quimioluminiscente usando la celda de flujo de la FIG. 16, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 18 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método de la FIG. 17, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

20 La FIG. 19 muestra una porción de la celda de flujo de la FIG. 16 y representa un ejemplo de un esquema de SBS quimioluminiscente, en el que se usa un catalizador inmovilizado en un nucleótido para generar una señal quimioluminiscente, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 20 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de base en un esquema de secuenciación SBS quimioluminiscente utilizando la celda de flujo de la FIG. 16, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

25 La FIG. 21 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método de la FIG. 20, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 22 ilustra un ejemplo de un esquema de SBS quimioluminiscente que es una alternativa del esquema de SBS de la FIG. 19, en donde el catalizador se inmoviliza en cada sitio de una celda de flujo modelada y los nucleótidos se marcan con apantalladores de luminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

30 La FIG. 23 ilustra un ejemplo de un esquema de SBS quimioluminiscente que es otra alternativa del esquema de SBS de la FIG. 19, en donde el catalizador se une al cebador de secuenciación y los nucleótidos se marcan con apantalladores de luminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

35 La FIG. 24 ilustra una vista en sección transversal lateral de un ejemplo de un accionador de gotas que usa quimioluminiscencia para proporcionar un esquema de SBS luminiscente sustancialmente sin luz, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

La FIG. 25 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos usando en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 26 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método de la FIG. 25, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción.

40 La FIG. 27 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos usando en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La FIG. 28 ilustra esquemáticamente una composición alternativa para detectar la presencia de subunidades de polímero usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

45 La FIG. 29 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos usando en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

Descripción detallada

50 Las realizaciones de la presente descripción proporcionan composiciones, sistemas y métodos para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia. Más específicamente, las presentes composiciones, sistemas y métodos pueden usarse para detectar la presencia, en un polímero que incluye una pluralidad de subunidades, de una subunidad seleccionada de ese polímero. La subunidad seleccionada puede ser la

subunidad terminal del polímero, o puede estar más a lo largo de la cadena del polímero, por ejemplo, una subunidad no terminal. La presencia de dicha subunidad terminal o no terminal se puede detectar usando un catalizador que sea operable para causar que una molécula quimioluminogénica emita un fotón.

En un ejemplo, el catalizador se acopla a la subunidad seleccionada, por ejemplo, se acopla a la subunidad antes de añadir la subunidad al polímero, o se acopla a la subunidad después de añadir la subunidad al polímero. El polímero, que incluye la subunidad seleccionada que tiene el catalizador acoplado a la misma, se expone a una o a una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas, y opcionalmente también a una o más moléculas reactivas que pueden facilitar la reacción entre el catalizador y las moléculas quimioluminogénicas. En respuesta a la presencia de la o las moléculas quimioluminogénicas y la o las moléculas reactivas opcionales, el catalizador puede hacer que esas moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. La presencia de la subunidad seleccionada es detectable basándose de la detección de los fotones. Por ejemplo, el polímero se puede acoplar a una región de un sustrato. La presencia de la subunidad seleccionada en ese polímero se detecta en base a la detección de fotones de esa región del sustrato. Dicha detección puede realizarse en paralelo para múltiples subunidades del polímero, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de subunidades. Alternativamente, dicha detección se puede realizar para una sola subunidad del polímero en un momento dado. Dicha detección de subunidades únicas se puede realizar secuencialmente para diferentes subunidades del polímero, permitiendo así la detección de la secuencia de subunidades del polímero.

Se apreciará que la presencia de cualesquiera subunidades adecuadas de cualesquiera polímeros adecuados se puede detectar en base a la quimioluminiscencia. En un ejemplo ilustrativo, el polímero incluye un polinucleótido, y las subunidades del polímero incluyen nucleótidos de ese polinucleótido. La secuencia del polinucleótido puede basarse en la detección de la presencia de cada uno de los nucleótidos. Dicha detección puede realizarse en paralelo, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de los nucleótidos en la secuencia. Alternativamente, dicha detección se puede realizar para un solo nucleótido del polinucleótido en un momento dado. Por ejemplo, una polimerasa puede añadir un primer nucleótido al extremo terminal de un primer polinucleótido basándose en la secuencia de un segundo polinucleótido con el que se hibrida el primer polinucleótido. El primer nucleótido se puede acoplar a un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón. El catalizador se puede acoplar al primer nucleótido antes de que el primer nucleótido se agregue al extremo terminal del primer polinucleótido, o después de que el primer nucleótido se agregue al extremo terminal del polinucleótido. El primer polinucleótido, del cual el primer nucleótido define ahora el extremo terminal, puede exponerse a la o las moléculas quimioluminogénicas, y opcionalmente también a la o las moléculas reactivas que facilitan la reacción entre el catalizador y la o las moléculas quimioluminogénicas. En respuesta a la presencia de la o las moléculas quimioluminogénicas y la o las moléculas reactivas opcionales, el catalizador puede hacer que esas moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. La presencia del primer nucleótido es detectable en función de la detección de los fotones.

Por ejemplo, el primer polinucleótido se puede acoplar a una región de un sustrato; en una realización ilustrativa, el segundo polinucleótido está acoplado a la región del sustrato, y el primer polinucleótido está acoplado a la región del sustrato al hibridarse con el segundo polinucleótido. La presencia del primer nucleótido en el extremo terminal del primer polinucleótido se detecta basándose en la detección de fotones de esa región del sustrato. Dicha detección se puede realizar en paralelo para múltiples de los nucleótidos del primer polinucleótido, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de los nucleótidos. Alternativamente, dicha detección puede realizarse para un solo nucleótido del primer polinucleótido, por ejemplo, el nucleótido terminal del primer polinucleótido, en un momento dado. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que son diferentes entre sí se pueden acoplar a catalizadores diferentes entre sí, o pueden incluir restos diferentes entre sí que se pueden acoplar o escindir selectivamente de uno o más catalizadores de tal manera que permita distinguir diferentes tipos de nucleótidos entre sí a medida que se agrega cada nucleótido al polinucleótido. Dicha detección de un solo nucleótido se puede realizar secuencialmente para diferentes nucleótidos a medida que se agregan al primer polinucleótido, lo que permite la detección de la secuencia de nucleótidos en el primer polinucleótido y, en consecuencia, permite la detección de la secuencia del segundo polinucleótido que es complementaria a la secuencia del primer polinucleótido.

Debe apreciarse que la ausencia de fotones emitidos puede usarse alternativamente para detectar la presencia de una subunidad de polímero. En un ejemplo, se proporciona un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón, por ejemplo, acoplado al polímero o a un sustrato al que está acoplado el polímero. Un apantallador operable para inhibir la emisión de fotones por la molécula quimioluminogénica se acopla a una subunidad seleccionada, por ejemplo, se acopla a la subunidad antes de añadir la subunidad al polímero, o se acopla a la subunidad después de añadir la subunidad al polímero. El polímero, incluida la subunidad seleccionada que tiene el apantallador acoplada a la misma, se expone a una o a una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas, y opcionalmente también a una o más moléculas reactivas que pueden facilitar la reacción entre el catalizador y las moléculas quimioluminogénicas. En respuesta a la presencia de la o las moléculas quimioluminogénicas y la o las moléculas reactivas opcionales, el apantallador puede inhibir la emisión de fotones de la o las moléculas quimioluminogénicas en presencia del catalizador. La presencia de la subunidad seleccionada es detectable en función de la ausencia de los fotones. Por ejemplo, el polímero se puede acoplar a una región de un sustrato. La presencia de la subunidad seleccionada en ese polímero se detecta en base a la detección de la ausencia de fotones de esa región del sustrato. Dicha detección puede realizarse en paralelo para múltiples subunidades del polímero, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de subunidades. Alternativamente, dicha detección se puede realizar para

una sola subunidad del polímero en un momento dado. Dicha detección de subunidades únicas se puede realizar secuencialmente para diferentes subunidades del polímero, permitiendo así la detección de la secuencia de subunidades del polímero.

Se apreciará que la presencia de cualesquiera subunidades adecuadas de cualesquiera polímeros adecuados se puede detectar basándose en la quimioluminiscencia. En un ejemplo ilustrativo, el polímero incluye un polinucleótido, y las subunidades del polímero incluyen nucleótidos de ese polinucleótido. Se proporciona un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón, por ejemplo, acoplado al polinucleótido o a un sustrato al que está acoplado el polinucleótido. La secuencia del polinucleótido puede basarse en la detección de la presencia de cada uno de los nucleótidos. Dicha detección puede realizarse en paralelo, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de los nucleótidos en la secuencia. Alternativamente, dicha detección se puede realizar para un solo nucleótido del polinucleótido en un momento dado. Por ejemplo, una polimerasa puede añadir un primer nucleótido al extremo terminal de un primer polinucleótido basándose en la secuencia de un segundo polinucleótido con el que se hibrida el primer polinucleótido. El primer nucleótido se puede acoplar a un apantallador operable para inhibir la emisión de fotones por la molécula quimioluminogénica. El catalizador se puede acoplar al primer nucleótido antes de que el primer nucleótido se agregue al extremo terminal del primer polinucleótido, o después de que el primer nucleótido se agregue al extremo terminal del polinucleótido. El primer polinucleótido, del cual el primer nucleótido define ahora el extremo terminal, puede exponerse a la o las moléculas quimioluminogénicas, y opcionalmente también a la o las moléculas reactivas que facilitan la reacción entre el catalizador y la o las moléculas quimioluminogénicas. En ausencia del apantallador, en presencia de la o las moléculas quimioluminogénicas y la o las moléculas reactivas opcionales, el catalizador puede hacer que esas moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. Sin embargo, el apantallador unido al primer nucleótido puede inhibir dicha emisión de fotones. La presencia del primer nucleótido es detectable en base a la inhibición de la emisión de fotones.

Por ejemplo, el primer polinucleótido se puede acoplar a una región de un sustrato; en una realización ilustrativa, el segundo polinucleótido está acoplado a la región del sustrato, y el primer polinucleótido está acoplado a la región del sustrato al hibridarse con el segundo polinucleótido. La presencia del primer nucleótido en el extremo terminal del primer polinucleótido se detecta en base a la detección de la inhibición de la emisión de fotones desde esa región del sustrato. Dicha detección puede realizarse en paralelo para múltiples de los nucleótidos del primer polinucleótido, por ejemplo, detectando simultáneamente una pluralidad de los nucleótidos. Alternativamente, dicha detección puede realizarse para un solo nucleótido del primer polinucleótido, por ejemplo, el nucleótido terminal del primer polinucleótido, en un momento dado. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que son diferentes entre sí pueden estar acoplados a diferentes apantalladores entre sí, o pueden incluir diferentes restos entre sí que pueden acoplarse a o escindirse selectivamente de uno o más apantalladores de tal manera que permita distinguir diferentes tipos de nucleótidos entre sí a medida que se agrega cada nucleótido al polinucleótido. Dicha detección de un solo nucleótido puede realizarse secuencialmente para diferentes nucleótidos a medida que se agregan al primer polinucleótido, lo que permite la detección de la secuencia de nucleótidos en el primer polinucleótido y, en consecuencia, permite la detección de la secuencia del segundo polinucleótido que es complementaria a la secuencia del primer polinucleótido.

En primer lugar, se explicarán brevemente algunos términos usados en la presente memoria. Después, se describirán algunas composiciones ejemplares, sistemas ejemplares que incluyen circuitería de medición que puede usarse con las presentes composiciones, métodos ejemplares que pueden usarse con las presentes composiciones, algunos ejemplos específicos de composiciones que pueden usarse durante tales métodos y resultados ejemplares.

Términos ejemplares

Tal y como se usa en la presente memoria, "polímero" significa una molécula que incluye una pluralidad de subunidades repetidas. Los polímeros pueden ser polímeros biológicos o sintéticos. Los polímeros biológicos ejemplares incluyen polinucleótidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un nucleótido), polipéptidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un aminoácido), polisacáridos (una subunidad ejemplar de los cuales es un azúcar), análogos de polinucleótidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un análogo de nucleótido) y análogos de polipéptidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un análogo de aminoácido). Los polinucleótidos y análogos de polinucleótidos ejemplares incluyen ADN, ADN enantiomérico, ARN, PNA (péptido-ácido nucleico), morfollinos y LNA (ácido nucleico bloqueado). Los polipéptidos sintéticos ejemplares pueden incluir aminoácidos cargados, así como residuos hidrófilos y neutros. Los polímeros sintéticos ejemplares incluyen PEG (polietilenglicol), PPG (polipropilenglicol), PVA (alcohol polivinílico), PE (polietileno), LDPE (polietileno de baja densidad), HDPE (polietileno de alta densidad), polipropileno, PVC (cloruro de polivinilo), PS (poliestireno), NYLON (poliamidas alifáticas), TEFLON® (tetrafluoroetileno), poliuretanos termoplásticos, polialdehídos, poliolefinas, poli(óxidos de etileno), poliésteres de ácido ω -alquenoico), poli(metacrilatos de alquilo) y otros conectores poliméricos químicos y biológicos como los descritos en Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, tercera edición, Academic Press, Londres (2013).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "nucleótido" pretende significar una molécula que incluye un azúcar y al menos un grupo fosfato, y opcionalmente también incluye una nucleobase. Un nucleótido que carece de una nucleobase puede denominarse "abásico". Los nucleótidos incluyen desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, nucleótidos peptídicos, nucleótidos peptídicos modificados, nucleótidos de esqueleto de azúcar fosfato modificados y mezclas de los mismos. Los ejemplos de nucleótidos incluyen monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de

adenosina (ATP), monofosfato de timidina (TMP), difosfato de timidina (TDP), trifosfato de timidina (TTP), monofosfato de citidina (CMP), difosfato de citidina (CDP), trifosfato de citidina (CTP), monofosfato de guanosina (GMP), difosfato de guanosina (GDP), trifosfato de guanosina (GTP), monofosfato de uridina (UMP), difosfato de uridina (UDP), trifosfato de uridina (UTP), monofosfato de desoxiadenosina (dAMP), difosfato de desoxiadenosina (dADP), trifosfato de desoxiadenosina (dATP), monofosfato de desoxitimidina (dTTP), difosfato de desoxitimidina (dTDP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP), difosfato de desoxicitidina (dCDP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), monofosfato de desoxiguanosina (dGMP), difosfato de desoxiguanosina (dGDP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), monofosfato de desoxiuridina (dUMP), difosfato de desoxiuridina (dUDP), trifosfato de desoxiuridina (dUTP), trifosfato de adenosina bloqueado reversiblemente (rbATP), trifosfato de timidina bloqueado reversiblemente (rbTTP), trifosfato de citidina bloqueado reversiblemente (rbCTP) y trifosfato de guanosina bloqueado reversiblemente (rbGTP). Para más detalles sobre trifosfatos de nucleótidos bloqueados reversiblemente (rbNTP), véase la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2013/0079232.

El término "nucleótido" también pretende abarcar cualquier análogo de nucleótido que sea un tipo de nucleótido que incluya una nucleobase modificada, un resto de azúcar y/o fosfato. Las nucleobases modificadas ejemplares que pueden incluirse en un polinucleótido, ya sea que tengan un esqueleto nativo o estructura análoga, incluyen, inosina, xatanina, hipoxatanina, isocitosina, isoguanina, 2-aminopurina, 5-metilcitosina, 5-hidroximetil citosina, 2-aminoadenina, 6-metil adenina, 6-metil guanina, 2-propil guanina, 2-propil adenina, 2-tioLiracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 15-halouracilo, 15-halocitosina, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azotimina, 5-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina o guanina, 8-amino adenina o guanina, 8-tiol adenina o guanina, 8-tioalquil adenina o guanina, 8-hidroxil adenina o guanina, uracilo o citosina sustituido con halo en 5, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 3-deazaguanina, 3-deazaadenina o similares. Como se sabe en la técnica, ciertos análogos de nucleótidos no pueden incorporarse a un polinucleótido, por ejemplo, análogos de nucleótidos tales como el 5'-fosfosulfato de adenosina.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una molécula que incluye una secuencia de nucleótidos que están unidos entre sí. Los ejemplos de polinucleótidos incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) y análogos de los mismos. Un polinucleótido puede ser una secuencia de nucleótidos monocatenaria, tal como ARN o ADN monocatenario, una secuencia de nucleótidos bicatenaria, tal como ADN bicatenario, o puede incluir una mezcla de secuencias de nucleótidos monocatenarias y bicatenarias. El ADN bicatenario (ADNs) incluye ADN genómico y productos de PCR y amplificación. El ADN monocatenario (ADNs) se puede convertir en ADNs y viceversa. La secuencia precisa de nucleótidos en un polinucleótido puede ser conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos ejemplares de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta de secuencia expresada (EST) o análisis en serie de la etiqueta de expresión génica (SAGE)), ADN genómico, fragmento de ADN genómico, exón, intrón, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozima, ADNc, polinucleótido recombinante, polinucleótido sintético, polinucleótido ramificado, plásmido, vector, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sonda de ácido nucleico, cebador o copia amplificada de cualquiera de los anteriores.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "sustrato" se pretende que signifique una estructura formada por un material sólido que es relativamente grande en comparación con una o más moléculas que pueden acoplarse al mismo. Los sustratos pueden incluir materiales biológicos o en estado sólido, o una combinación de los mismos. Los sustratos de estado sólido ejemplares pueden incluir uno o más aislantes tales como vidrio o plástico, uno o más conductores tales como metales o polímeros conductores, y uno o más materiales semiconductores, tales como silicio o germanio, o cualquier combinación adecuada de aislante(s), conductor(es) y semiconductor(es). Un sustrato puede incluirse, pero no necesariamente, en una celda de flujo o una plataforma de tipo matriz.

Tal y como se usa en la presente memoria, "acoplado" pretende significar una unión entre un primer miembro y un segundo miembro que es suficientemente estable como para ser útil para detectar una subunidad de un polímero. En algunas realizaciones, dicha unión es normalmente irreversible en las condiciones en las que se usan los miembros unidos. En otras realizaciones, dicha unión permanente es reversible, pero persiste durante al menos el período de tiempo en el que se usa para detectar una subunidad de un polímero. Tal unión puede formarse mediante un enlace químico, por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace de hidrógeno, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión de London o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los enlaces covalentes son solo un ejemplo de una unión que se puede usar adecuadamente para acoplar un primer miembro a un segundo miembro. Otros ejemplos incluyen dúplex entre oligonucleótidos, interacciones péptido-péptido e interacciones hapteno-anticuerpo tales como estreptavidina-biotina, estreptavidina-destiobiotina y digoxigenina-antidigoxigenina. En una realización, se puede formar una unión hibridando un primer polinucleótido a un segundo polinucleótido que inhibe la separación del primer polinucleótido del segundo polinucleótido. Alternativamente, se puede formar una unión usando interacciones físicas o biológicas, por ejemplo, una interacción entre una primera proteína y una segunda proteína que inhibe la separación de la primera proteína de la segunda proteína.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "catalizador" es una molécula que participa en una reacción química, pero que no se consume en esa reacción. Los catalizadores incluyen enzimas, catalizadores metálicos, orgánicos y metalorgánicos, así como compuestos autocatalíticos. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "enzima" pretende significar una biomolécula que modifica catalíticamente otra molécula. Las enzimas pueden incluir proteínas, así como ciertos otros tipos de moléculas tales como polinucleótidos. Tal y como se usa en la presente memoria, el

término "proteína" pretende significar una molécula que incluye, o consiste en, un polipéptido que se pliega en una estructura tridimensional. El polipéptido incluye restos que, cuando se pliegan en la estructura tridimensional, imparten actividad biológica a la proteína.

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria, "quimioluminiscencia" significa luz resultante de una reacción química en la que uno o más reactivos de la reacción experimentan un cambio químico. El término "quimioluminiscencia" pretende abarcar la bioluminiscencia, por ejemplo, la luz resultante de reacciones biológicas, así como la luz resultante de otros tipos de reacciones.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "molécula quimioluminogénica" es una molécula que emite quimioluminiscencia cuando reacciona con los reactivos apropiados.

- 10 Tal y como se usa en la presente memoria, "hibridar" pretende significar la unión no covalente de un primer polinucleótido a un segundo polinucleótido. La fuerza de la unión entre el primer y segundo polinucleótidos aumenta con la complementariedad entre esos polinucleótidos.

- 15 Tal y como se usa en la presente memoria, una "polimerasa" pretende significar una enzima que tiene un sitio activo que ensambla polinucleótidos polimerizando nucleótidos en polinucleótidos. Una polimerasa puede unirse a un molde de polinucleótido monocatenario cebado, y puede añadir secuencialmente nucleótidos al cebador en crecimiento para formar un polinucleótido que tiene una secuencia que es complementaria a la del molde.

Composiciones y métodos ejemplares

Ahora, se describirán algunas composiciones y métodos ejemplares para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia con referencia a las FIGS. 1A-1C y 2-4.

- 20 Bajo un aspecto, una composición incluye un polímero que incluye una pluralidad de subunidades y un catalizador acoplado a una primera subunidad del polímero. El catalizador es operable para causar que una molécula quimioluminogénica emita un fotón. Por ejemplo, las FIGS. 1A-1C ilustran esquemáticamente composiciones para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La composición ejemplar 100 ilustrada en la FIG. 1A incluye el sustrato 110, el polímero
- 25 120 que incluye una pluralidad de subunidades 121 y el catalizador 130 acoplado a una subunidad seleccionada 121' de las subunidades 121. En la realización ilustrada, el sustrato 110 incluye la superficie 111 a la que está acoplado el polímero 120. Sin embargo, debe entenderse que el polímero 120 no necesita estar necesariamente acoplado al sustrato 110, y que el sustrato 110 es opcional. En las realizaciones que incluyen el sustrato 110, el sustrato incluye opcionalmente un detector óptico (no ilustrado específicamente) operable para detectar uno o más fotones emitidos
- 30 por la o las moléculas quimioluminogénicas que responden a la presencia del catalizador 130 y la subunidad de polímero seleccionada 121' a la que el catalizador 130 está acoplado. Un detector óptico ejemplar es un sensor de píxeles activos que incluye una matriz de fotodetectores amplificados configurados para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos por los fotodetectores.

- 35 El sustrato 110 puede incluir materiales biológicos o en estado sólido, o una combinación de los mismos. Los sustratos de estado sólido ejemplares pueden incluir uno o más aislantes tales como vidrio o plástico, uno o más conductores tales como metales o polímeros conductores, y uno o más materiales semiconductores, tales como silicio o germanio, o cualquier combinación adecuada de aislante(s), conductor(es) y semiconductor(es). Un sustrato basado en semiconductores puede denominarse "chip". En algunas realizaciones, el sustrato puede incluir un sustrato o matriz inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio, perlas de polímero, etc.) que se ha funcionalizado, por ejemplo, mediante
- 40 la aplicación de una capa o revestimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente a biomoléculas, tales como polinucleótidos. Los ejemplos de tales soportes incluyen, pero no están limitados a, hidrogeles de poli(acrilamida) soportados sobre un sustrato inerte tal como vidrio, particularmente hidrogeles de poli(acrilamida) como se describe en WO 2005/065814 y US 2008/0280773. Los posibles sustratos incluyen, pero no están limitados a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™ y similares), polisacáridos,
- 45 nylon, o nitrocelulosa, cerámica, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas y una variedad de otros polímeros.

- En algunas realizaciones, el sustrato o su superficie no es plana, tal como la superficie interna o externa de un tubo o recipiente. En algunas realizaciones, el sustrato incluye una microesfera o una perla. Por "microesfera" o "perla" o
- 50 "partícula" o equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende una partícula discreta relativamente pequeña. Las composiciones de perlas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilmetacrilato, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de toria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sefarosa, celulosa, nylon, micelas reticuladas y teflón, así como cualquier otro material descritos en la presente memoria para sustratos pueden usarse. La "Guía de Detección de
- 55 Microesferas" de Bangs Laboratories, Fishers Ind., es una guía útil. En ciertas realizaciones, las microesferas son microesferas magnéticas o perlas. Obsérvese que las perlas no necesitan ser esféricas; se pueden utilizar partículas irregulares. Alternativa o adicionalmente, las perlas pueden ser porosas. Los tamaños de las perlas varían desde nanómetros, es decir, 100 nm, hasta milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose las perlas de aproximadamente

0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, y prefiriéndose particularmente las de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones pueden usarse perlas más pequeñas o más grandes.

El sustrato 110 puede incluirse, pero no necesariamente, en una celda de flujo o plataforma de tipo matriz. En una realización ilustrativa en la que el polímero 120 es un polinucleótido, la plataforma se puede configurar para la secuenciación paralela de múltiples polinucleótidos. Las plataformas configuradas para la secuenciación paralela de múltiples polinucleótidos incluyen, pero no están limitadas a, las ofrecidas por Illumina, Inc. (por ejemplo, plataformas HiSeq, Genome Analyzer, MiSeq, iScan), Life Technologies (por ejemplo, SOLiD), Helicos Biosciences (por ejemplo, Heliscope), 454/Roche Life Sciences (Branford, Conn.) y Pacific Biosciences (p. ej., SMART). Las celdas de flujo, los chips y otros tipos de superficies que pueden acomodar múltiples especies de ácidos nucleicos son ejemplos de sustratos utilizados para la secuenciación paralela. En los formatos múltiples en los que se secuencian múltiples especies de ácido nucleico en paralelo, las secuencias diana amplificadas clonalmente (por ejemplo, mediante PCR en emulsión (emPCR) o amplificación en puente) se inmovilizan típicamente covalentemente sobre un sustrato. Por ejemplo, cuando se practica la PCR en emulsión, la diana de interés se inmoviliza en un sustrato de perlas, mientras que las dianas amplificadas clonalmente se inmovilizan en canales de un sustrato basado en celdas de flujo o en ubicaciones específicas en un sustrato basado en matriz o basado en chip.

En una realización ilustrativa, el sustrato 110 puede incluir un chip CMOS que se ha adaptado para aplicaciones de secuenciación. La superficie 111 del sustrato 110 puede incluir una o más regiones hidrófilas para la unión del polímero, por ejemplo, unión del polinucleótido, y amplificación rodeada de regiones hidrófobas. Por ejemplo, se pueden usar almohadillas dinámicas que tienen un parche hidrófilo, como se describe en US 2013/0116128. Alternativa o adicionalmente, una colección de almohadillas dinámicas que incluyen algunas que están en estado hidrófilo mientras que las almohadillas circundantes están en estado hidrófobo pueden formar regiones hidrófilas rodeadas por una región hidrófoba. La superficie para la unión del polímero, por ejemplo, la unión de ácido nucleico, puede incluir opcionalmente una pluralidad de regiones aisladas de manera que cada región aislada contenga una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que pueden derivar de una molécula de ácido nucleico para la secuenciación. Por ejemplo, la región hidrófila puede incluir un gel. Las regiones hidrófilas pueden ser lisas, texturizadas, porosas o no porosas, por ejemplo. Las regiones hidrófobas pueden ubicarse entre las regiones hidrófilas. Las moléculas se pueden mover a través de la superficie mediante cualquier número de fuerzas, por ejemplo, fuerzas de humectación eléctrica, tal como se describe en US 2013/0116128.

En la realización ilustrada, el polímero 120 se acopla a la superficie 111 del sustrato 110 usando cualquier unión permanente adecuada. Tal unión puede formarse mediante un enlace químico, por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace de hidrógeno, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión de London o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los enlaces covalentes son solo un ejemplo de una unión que puede usarse adecuadamente para acoplar el polímero 120 a la superficie 111 del sustrato 110. Otros ejemplos incluyen dúplex entre oligonucleótidos, interacciones péptido-péptido e interacciones hapteno-anticuerpo tales como estreptavidina-biotina, estreptavidina-destiobiotina, y digoxigenina-antidigoxigenina. En una realización ejemplar en la que el polímero 120 es un polinucleótido, ese polinucleótido se puede unir a la superficie 111 del sustrato 110 hibridando ese polinucleótido con otro polinucleótido que está acoplado a la superficie 111. Alternativamente, se puede formar una unión usando interacciones físicas o biológicas, por ejemplo, una interacción entre una primera proteína acoplada al polímero 120 y una segunda proteína acoplada al sustrato 110 que inhibe la separación de la primera proteína de la segunda proteína.

El polímero 120 puede incluir un polímero biológico o un polímero sintético. Los polímeros biológicos ejemplares incluyen polinucleótidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un nucleótido), polipéptidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un aminoácido), polisacáridos (una subunidad ejemplar de los cuales es un azúcar), análogos de polinucleótidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un análogo de nucleótido) y análogos de polipéptidos (una subunidad ejemplar de los cuales es un análogo de aminoácido). Los polinucleótidos y análogos de polinucleótidos ejemplares incluyen ADN, ADN enantiomérico, ARN, PNA (péptido-ácido nucleico), morfollinos y LNA (ácido nucleico bloqueado). Los polipéptidos sintéticos ejemplares pueden incluir aminoácidos cargados, así como residuos hidrófilos y neutros. Los polímeros sintéticos ejemplares incluyen PEG (polietilenglicol), PPG (polipropilenglicol), PVA (alcohol polivinílico), PE (polietileno), LDPE (polietileno de baja densidad), HDPE (polietileno de alta densidad), polipropileno, PVC (cloruro de polivinilo), PS (poliestireno), NYLON (poliamidas alifáticas), TEFLON® (tetrafluoroetileno), poliuretanos termoplásticos, polialdehídos, poliolefinas, poli(óxidos de etileno), poli(ésteres de ácido ω -alquenoico), poli(metacrilatos de alquilo) y otros conectores poliméricos químicos y biológicos como los descritos en Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, tercera edición, Academic Press, Londres (2013). En una realización ilustrativa y no limitante, el polímero 120 incluye un polinucleótido, y las subunidades 121 del mismo incluyen nucleótidos.

El catalizador 130 es operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón, y está acoplado a una subunidad seleccionada 121' de las subunidades 121. En la realización ilustrada, el catalizador 130 está acoplado a la subunidad seleccionada 121' usando cualquier unión permanente adecuada. Tal unión puede formarse mediante un enlace químico, por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace de hidrógeno, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión de London o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los enlaces covalentes son solo un ejemplo de una unión que puede usarse adecuadamente para acoplar el catalizador 130 a la subunidad

121' seleccionada. Por ejemplo, el catalizador 130 puede acoplarse a la subunidad 121' seleccionada a través de un primer resto acoplado a la subunidad 121' y un segundo resto acoplado al primer resto y al catalizador 130. El primer y segundo restos pueden incluir oligonucleótidos, péptidos o pares de unión tal como pares hapteno-anticuerpo, tal como estreptavidina-biotina, estreptavidina-destiobiotina y digoxigenina-antidigoxigenina. Por ejemplo, uno de los primeros y segundos restos puede ser biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos puede ser estreptavidina. O, por ejemplo, uno de los primeros y segundos restos puede ser digoxigenina, y el otro de los primeros y segundos restos es antidigoxigenina. O, por ejemplo, se puede formar una unión utilizando interacciones físicas o biológicas, por ejemplo, una interacción entre una proteína, un hapteno o un anticuerpo acoplado a la subunidad seleccionada 121' y una proteína, un hapteno o un anticuerpo acoplado al catalizador 130 que inhibe la separación del catalizador 130 de la subunidad seleccionada 121'. En algunas realizaciones, el catalizador 130 también puede ser escindible de la subunidad seleccionada 121', por ejemplo, exponiendo el catalizador 130 y la subunidad seleccionada 121' a una o más moléculas reactivas adecuadas para escindir el acoplamiento entre el catalizador 130 y la subunidad 121' después de detectar la presencia de la subunidad seleccionada 121'.

El catalizador 130 puede incluir, por ejemplo, una enzima o un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico o un compuesto autocatalítico operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón. Los catalizadores ejemplares operables para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón se describen en Dodeigne et al., "Chemiluminescence as diagnostic tool. A review", *Talanta* 51: 415-439 (2000). Como un ejemplo, el catalizador puede incluir un generador de peróxido, tal como una enzima o un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico, y la molécula quimioluminogénica puede incluir luminol o un derivado de luminol. Como otro ejemplo, el catalizador puede incluir un generador de peróxido, tal como una enzima o un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico, y la molécula quimioluminogénica puede incluir acridinio o un derivado de acridinio. En la técnica se conoce una amplia variedad de generadores de peróxido que pueden ser adecuados para causar que el luminol, un derivado de luminol, acridinio o derivado de acridinio emitan quimioluminiscencia, tales como los descritos en Dodeigne, que incluyen microperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), peroxidasa bacteriana (p. ej., de *Arthromyces ramosus*), catalasa, xantina oxidasa, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa y β -glucosidasa en presencia de conjugados de indoxilo, lactato oxidasa, acilCoA sintetasa, acilCoA oxidasa, diamina oxidasa, citocromo c, hemoglobina, haptoglobina, deuterohemina, ozono molecular, halógenos, aniones persulfato, complejos de Fe (III), Co (II), Cu (II). Además, como se describe en Dodeigne, la 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa o la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa liberan NADH que reduce el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno en presencia de metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio. Los derivados de luminol ejemplares incluyen isoluminol, aminoetilisoluminol (AEI), aminoetiletilisoluminol (AEEI), aminobutilisoluminol (ABI), aminobutiletilisoluminol (ABEI), aminopentiletilisoluminol (APEI), aminohexilisoluminol (AHI), aminohexiletilisoluminol (AHEI), aminooctiletilisoluminol (AOMI), aminooctiletilisoluminol (AOEI) y aminobutiletinaftalhidrazida (ABENH), tal como se describe en Dodeigne. Los derivados de acridinio ejemplares incluyen lucigenina, arilmetileno *N*-metil dihidroacridinas, *N*-metil acridina no sustituida, y *N*-metil acridinas sustituidas con alcoholes, fluoroalcoholes, fenoles, tioles, sulfonamidas, aminas heterocíclicas, aminas endocíclicas heterocíclicas, ácidos hidroxámicos, ácidos sulfohidroxámicos, tiolaminas, oximas (p. ej., oximas esterificadas en O), o grupos salientes de croloxima, por ejemplo, *N*-metil acridina sustituida con metoxi, 4-(2-succinimidil-oxycarboniletil)-fenil-10-metil-acridinio-9-carboxilato (AE-NHS) y el análogo 2-6-dimetilfenol de AE-NHS, como se describe en Dodeigne.

Como otro ejemplo, el catalizador puede incluir una enzima tal como una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica puede incluir una luciferina o un derivado de luciferina. Como otro ejemplo más, el catalizador puede incluir una enzima tal como una luciferasa, y la molécula quimioluminogénica puede incluir colenterazina o un derivado de colenterazina. "Luciferasa" se refiere a una clase de enzimas oxidativas que facilitan catalíticamente la quimioluminiscencia y que incluyen luciferasa de luciérnaga de la especie *Photinus pyralis* u otra especie de luciérnaga, luciferasa monooxigenasa bacteriana, luciferina 2-monooxigenasa de Renilla, luciferasa de dinoflagelado, proteína lumazina tal como en *Vibrio fischeri*, *hawaii* y *harveyi*, luciferasa de Metridia derivada de *Metridia longa* y luciferasa de Vargula. Las luciferinas y los derivados de luciferina son moléculas quimioluminogénicas ejemplares que pueden emitir fotones sensibles a las interacciones con una luciferasa en presencia de una molécula de reactivo que contiene oxígeno. Las luciferinas ejemplares incluyen colenterazina (también conocida como luciferina de Renilla), derivados de colenterazina, luciferina de luciérnaga, luciferina de Latia, luciferina bacteriana, luciferina de dinoflagelado y vargulina. Los derivados de colenterazina ejemplares incluyen 2-metil-6-fenil-3,7-dihidroimidazo[1,2-a]pirazin-3-ona (CLA) y 2-metil-6-(4-metoxifenil)-3,7-dihidroimidazo[1,2-a]pirazin-3-ona (CLA) y otros derivados tal como se describe en Dodeigne.

Como otro ejemplo, el catalizador puede incluir una enzima tal como un cortador de 1,2-dioxetano, y la molécula quimioluminogénica puede incluir un derivado de 1,2-dioxetano. Los cortadores de 1,2-dioxetano y derivados de 1,2-dioxetano ejemplares adecuados para su uso se describen en la Patente de EE. UU. No. 5.330.900 de Bronstein et al. Los cortadores de 1,2-dioxetano ejemplares incluyen fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, tal como se describe en Bronstein. Los derivados de 1,2-dioxetano ejemplares incluyen 3-3,4-trimetil-1,2-dioxetano, adamantilideno adamantil 1,2-dioxetano, 9-(2-adamantilideno)-*N*-metilacridan-1,2-dioxetano, 1,2-dioxetano sustituido con fenol, 1,2-dioxetano sustituido con fenol sililado o esterificado, sal de disodio de 3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)fenil-1,2-dioxetano (AMPPD), 3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3"- β -D-galactopiranosiloxifenil)-1,2-dioxetano (AMPGD), sal de disodio de 3-4-metoxiespiro(1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tríciclo-[3.3.1.1.3,7]decan)-4-il fenil-fosfato (CSPD) y otros derivados tales como se describe en Dodeigne o en Bronstein.

Debe apreciarse que se pueden usar adecuadamente otros pares o combinaciones de catalizadores y moléculas quimioluminogénicas en las presentes composiciones, sistemas y métodos, y que los ejemplos proporcionados anteriormente pretenden ser puramente ilustrativos y no limitativos de ninguna manera.

Como se ilustra en la FIG. 1B, la composición 100 puede incluir, además, o puede ponerse en contacto con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 140 que emiten fotones que responden respectivamente a las interacciones con el catalizador 130. Por ejemplo, el catalizador 130 puede unirse o interactuar adecuadamente de otra manera con una molécula quimioluminogénica seleccionada 140', que hace que la molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B. Opcionalmente, la composición 100 incluye además, o además se pone en contacto con, una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 130 y las moléculas quimioluminogénicas 140 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. Como se ilustra en la FIG. 1C, después de la interacción con el catalizador 130 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 140 obtengan un estado excitado 140', tales estados excitados pueden decaer emitiendo un fotón correspondiente, como se representa en la FIG. 1C por las líneas discontinuas de la molécula 140" y la flecha con "λ" que representa la emisión de fotones. Basándose en la emisión de fotones, se puede detectar la presencia de la subunidad 121', por ejemplo, utilizando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el catalizador 130 interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 140, causando así la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones, aumentando así la detectabilidad de la subunidad 121', tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12.

En un ejemplo ilustrativo, el catalizador 130 puede incluir un generador de peróxido y las moléculas quimioluminogénicas 140 pueden incluir luminol o un derivado de luminol, y las moléculas reactivas pueden incluir moléculas que contienen oxígeno que el generador de peróxido puede usar para oxidar el luminol o el derivado de luminol para formar una molécula intermedia que tiene un estado excitado, por ejemplo, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B, que luego se desintegra emitiendo un fotón, por ejemplo, como se representa por las líneas discontinuas de la molécula 140" en la Figura 1C. O, por ejemplo, el catalizador 130 puede incluir un generador de peróxido y las moléculas quimioluminogénicas 140 pueden incluir acridinio o un derivado de acridinio, y las moléculas reactivas pueden incluir moléculas que contienen oxígeno que el generador de peróxido puede usar para oxidar el acridinio o derivado de acridinio para formar una molécula intermedia que tiene un estado excitado, por ejemplo, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B, que luego se desintegra emitiendo un fotón, por ejemplo, como se representa por las líneas discontinuas de la molécula 140" en la FIG. 1C. En otro ejemplo, el catalizador 130 puede incluir una luciferasa y las moléculas quimioluminogénicas 140 pueden incluir una luciferina o un derivado de luciferina, y las moléculas reactivas pueden incluir ATP y O₂ que la luciferasa puede usar para interactuar con la luciferina o derivado de luciferina para formar una molécula intermedia que tiene un estado excitado, por ejemplo, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B, que luego se desintegra emitiendo un fotón, por ejemplo, como se representa por las líneas discontinuas de la molécula 140" en la Figura 1C. En otro ejemplo, el catalizador 130 puede incluir una luciferasa y las moléculas quimioluminogénicas 140 pueden incluir una luciferina o un derivado de luciferina, y las moléculas reactivas pueden incluir ATP y O₂ que la luciferasa puede usar para interactuar con la luciferina o derivado de luciferina para formar una molécula intermedia que tiene un estado excitado, por ejemplo, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B, que luego se desintegra emitiendo un fotón, por ejemplo, como se representa por las líneas discontinuas de la molécula 140" en la FIG. 1C. En otro ejemplo, el catalizador 130 puede incluir un cortador de 1,2-dioxetano y las moléculas quimioluminogénicas 140 pueden incluir un derivado de 1,2-dioxetano; en tales realizaciones, las moléculas reactivas no necesitan necesariamente ser necesarias para que el catalizador 130 forme una molécula intermedia que tiene un estado excitado, por ejemplo, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la figura 1B, que luego se desintegra emitiendo un fotón, por ejemplo, como se representa por las líneas discontinuas de la molécula 140" en la FIG. 1C.

La FIG. 2 ilustra un método para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. El método 200 ilustrado en la FIG. 2 incluye proporcionar un polímero que incluye una pluralidad de subunidades (201). Por ejemplo, puede proporcionarse el polímero 120 ilustrado en las FIGS. 1A-1C, y opcionalmente puede acoplarse a un sustrato tal como el sustrato 110. El método 200 ilustrado en la FIG. 2 también incluye acoplar un catalizador a una subunidad del polímero (202). Por ejemplo, el catalizador 130 ilustrado en las FIGS. 1A-1C se puede acoplar a la subunidad 121' del polímero 120 usando cualquier enlace adecuado. El método 200 ilustrado en la FIG. 2 también incluye causar, por el catalizador, que una molécula quimioluminogénica emita un fotón (203). Por ejemplo, el catalizador 130 ilustrado en las FIGS. 1A-1C puede unirse o interactuar adecuadamente de otra manera con una molécula quimioluminogénica seleccionada 140' de una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 140, lo que hace que esa molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 140' en la FIG. 1B. Opcionalmente, también se pueden proporcionar una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 130 y las moléculas quimioluminogénicas 140 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. Como se ilustra en la FIG. 1C, después de la interacción con el catalizador 130 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 140 obtengan un estado excitado 140', tales estados excitados pueden desintegrarse emitiendo un fotón correspondiente, como se representa en la FIG. 1C

por las líneas discontinuas de la molécula 140" y la flecha con "λ" que representa la emisión de fotones. En base a la emisión de fotones, se puede detectar la presencia de la subunidad 121', por ejemplo, utilizando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el catalizador 130 interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 140, causando así la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones, aumentando así la detectabilidad de la subunidad 121', tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12.

En realizaciones alternativas, la presencia de una subunidad de polímero puede detectarse en base a la inhibición de la quimioluminiscencia. Bajo un aspecto, una composición puede incluir un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón, un polímero que incluye una pluralidad de subunidades y un apantallador acoplado a una primera subunidad del polímero. El apantallador puede ser operable para inhibir la emisión de fotones por la molécula quimioluminogénica. Por ejemplo, la FIG. 3 ilustra esquemáticamente una composición alternativa para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

La composición ejemplar 300 ilustrada en la FIG. 3 incluye el sustrato 310, el polímero 320 que incluye una pluralidad de subunidades 321, el catalizador 330 operable para hacer que una molécula quimioluminogénica 340 emita un fotón y el apantallador 350. Los polímeros, sustratos, catalizadores, acoplamientos, moléculas quimioluminogénicas, moléculas reactivas, reacciones quimioluminogénicas, y circuitería de detección ejemplares adecuados para su uso se describen en otra parte de la presente memoria, por ejemplo, con referencia a las FIGS. 1A-1C. En la realización ilustrada, el sustrato 310 incluye la superficie 311 a la que el polímero 320 y el catalizador 330 están acoplados cada uno a través de cualquier unión permanente adecuada, aunque debe apreciarse que el catalizador 330 puede acoplarse adecuadamente en cualquier lugar en la región del polímero 320. El apantallador 350 está acoplado a una subunidad seleccionada 321' de las subunidades 321 usando cualquier unión permanente adecuada. Tal unión puede formarse mediante un enlace químico, por ejemplo, mediante un enlace covalente, enlace de hidrógeno, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión de London o cualquier combinación adecuada de los mismos. Los enlaces covalentes son solo un ejemplo de una unión que puede usarse adecuadamente para acoplar el apantallador 350 a la subunidad seleccionada 321'. Por ejemplo, el apantallador 350 puede acoplarse a la subunidad seleccionada 321' a través de un primer resto acoplado a la subunidad 321' y un segundo resto acoplado al primer resto y al catalizador 330. El primer y segundo restos pueden incluir oligonucleótidos, péptidos o pares de unión tales como pares de hapteno-anticuerpo tales como estreptavidina-biotina, estreptavidina-destiobiotina y digoxigenina-antidigoxigenina. Por ejemplo, uno de los primeros y segundos restos puede ser biotina o un derivado de biotina, y el otro de los primeros y segundos restos puede ser estreptavidina. O, por ejemplo, uno de los primeros y segundos restos puede ser digoxigenina, y el otro de los primeros y segundos restos es antidigoxigenina. O, por ejemplo, se puede formar una unión usando interacciones físicas o biológicas, por ejemplo, una interacción entre una proteína, un hapteno o un anticuerpo acoplado a la subunidad seleccionada 321' y una proteína, un hapteno o un anticuerpo acoplado al apantallador 350 que inhibe la separación del apantallador 350 de la subunidad seleccionada 321'. En algunas realizaciones, el apantallador 350 también puede ser escindible de la subunidad seleccionada 321', por ejemplo, exponiendo el apantallador 350 y la subunidad seleccionada 321' a una o más moléculas reactivas adecuadas para escindir el acoplamiento entre el apantallador 350 y la subunidad 321' después de detectar la presencia de la subunidad seleccionada 321'.

El apantallador 350 puede incluir cualquier apantallador adecuado. Los apantalladores ejemplares conocidos en la técnica incluyen el Apantallador DABCYL, Apantallador BHQ-1®, Apantallador BHQ-2®, Apantallador BHQ-3® y Apantallador ECLIPSE, cada uno de los cuales está disponible comercialmente en Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania; Apantallador BHQ-0 Dark disponible en Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, California; ELLEQUENCHER™ (Eurogentec S.A., Maastricht, Países Bajos); Apantallador IOWA BLACK® disponible en Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa; ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (nombre comercial Trolox) disponible en Sigma-Aldrich Co., LLC, St. Louis, Missouri; apantalladores QSY 7, QSY 9, QSY 21 y QSY 35, cada uno de los cuales está disponible comercialmente en Life Technologies, Grand Island, Nueva York; y apantalladores de dinitrofenol (DNP) tales como 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP), 2,5-dinitrofenol (2,5-DNP) y 2,6-dinitrofenol (2,6-DNP).

Como se ilustra en la FIG. 3, la composición 300 además puede incluir, o puede ponerse en contacto con, una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 340 que emiten fotones que responden respectivamente a las interacciones con el catalizador 330 en ausencia del apantallador 350. Por ejemplo, el catalizador 330 puede unirse o interactuar de otra manera adecuadamente con una molécula quimioluminogénica seleccionada 340', que hace que esa molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 340' en la FIG. 3. Opcionalmente, la composición 300 incluye, además, o se pone en contacto con, una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 330 y las moléculas quimioluminogénicas 340 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos en ausencia del apantallador 350. Como se ilustra en la FIG. 3, la interacción con el catalizador 330 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 340 obtengan un estado excitado 340'. Sin embargo, mientras que dichos estados excitados pueden decaer emitiendo un fotón correspondiente en ausencia del apantallador 350 de una manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 1A-1C, en la realización ilustrada en la FIG. 3, el apantallador 350 inhibe la emisión de fotones de las moléculas de estado excitado 340' de modo que las moléculas en estado excitado 340' se desintegran en moléculas en estado fundamental 340" con emisión

de fotones reducida o nula. Basándose en la emisión inhibida de fotones, se puede detectar la presencia de la subunidad 321', por ejemplo, usando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. Por ejemplo, una cantidad respectiva de emisión de fotones de la composición 300 en presencia de moléculas quimioluminogénicas 340 puede ser detectada antes y después de acoplar el apantallador 350 a la subunidad 321', y en base a la emisión reducida de fotones después de acoplar el apantallador 350 a la subunidad 321' se puede detectar que está presente la subunidad 321'. En algunas realizaciones, el catalizador 330 interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 340, causando así la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones en ausencia del apantallador 350, aumentando así la detectabilidad de la subunidad 321', tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12.

La FIG. 4 ilustra un método alternativo para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. El método 400 ilustrado en la FIG. 4 incluye proporcionar un catalizador operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón (401). Por ejemplo, el catalizador 330 ilustrado en la FIG. 3 se puede acoplar a la superficie 311 del sustrato 310, o de otra manera en una relación sustancialmente fija con el polímero 320, usando cualquier enlace adecuado. El método 400 ilustrado en la FIG. 4 incluye además proporcionar un polímero que incluye una pluralidad de subunidades (402). Por ejemplo, el polímero 320 ilustrado en la FIG. 3 puede proporcionarse, y puede acoplarse a un sustrato tal como el sustrato 310. El método 400 ilustrado en la FIG. 4 incluye además acoplar un apantallador a una primera subunidad del polímero (403). Por ejemplo, el apantallador 350 ilustrado en la FIG. 3 se puede acoplar a la subunidad 321' del polímero 320 usando cualquier enlace adecuado. El método 400 ilustrado en la FIG. 4 también incluye la inhibición, por el apantallador, de la emisión de fotones por la molécula quimioluminogénica (404). Por ejemplo, el catalizador 330 ilustrado en la FIG. 3 puede unirse o interactuar de otra manera adecuadamente con una molécula quimioluminogénica seleccionada 340' de una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 340, lo que hace que esa molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 340' en la FIG. 3. Opcionalmente, también se pueden proporcionar una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 330 y las moléculas quimioluminogénicas 340 lo que causaría que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos en ausencia del apantallador 350. Como se ilustra en la FIG. 3, aunque la interacción con el catalizador 330 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 340 obtengan un estado excitado 340', el apantallador 350 inhibe que dichos estados excitados emitan un fotón correspondiente, y en su lugar hace que la molécula en estado excitado se desintegre sin emisión de fotones, como se representa en la FIG. 3 por las líneas discontinuas de la molécula 340". En base a la emisión inhibida de fotones, se puede detectar la presencia de la subunidad 321', por ejemplo, usando una circuitería adecuada configurada para detectar la inhibición de fotones tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A -10B y 11A-11B.

Secuenciación por síntesis usando métodos ejemplares y composiciones ejemplares para uso durante tales métodos

Como se indicó anteriormente, un polímero ejemplar que se puede usar en los presentes métodos y composiciones es un polinucleótido. La detección de los nucleótidos de ese polinucleótido se puede usar para secuenciar el polinucleótido - así como otro polinucleótido al que se hibrida ese nucleótido - usando "secuenciación por síntesis" o SBS.

Por ejemplo, la FIG. 5 ilustra esquemáticamente una composición para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La composición 500 ilustrada en la FIG. 5 incluye el sustrato 510; primer nucleótido 521 acoplado a la superficie 511 del sustrato 510 e incluye una pluralidad de nucleótidos; segundo polinucleótido 522 que incluye una pluralidad de nucleótidos, por ejemplo, ACATTA, que se hibridan con una pluralidad correspondiente de nucleótidos del primer polinucleótido 521, por ejemplo, con TGTAAT del primer polinucleótido 521; y catalizador 530 acoplado a un nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido 522, por ejemplo, A.

En algunos de los sistemas, métodos y composiciones presentados en la presente memoria, los polinucleótidos se inmovilizan en un sustrato. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se inmovilizan covalentemente al sustrato. Cuando se hace referencia a la inmovilización de polímeros (p. ej., polinucleótidos) en un sustrato, los términos "inmovilizado" y "unido" se usan indistintamente en la presente memoria y ambos términos pretenden abarcar la unión directa o indirecta, covalente o no covalente, a menos que se indique lo contrario, ya sea explícitamente o por contexto. En ciertas realizaciones, puede preferirse la unión covalente, pero en general todo lo que se requiere es que los polímeros (por ejemplo, polinucleótidos) permanezcan inmovilizados o unidos al sustrato en las condiciones en las que se pretende usar el sustrato, por ejemplo, en aplicaciones que requieren la amplificación y/o secuenciación de ácidos nucleicos.

Ciertas realizaciones pueden hacer uso de sustratos que incluyen un sustrato o matriz inerte (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio, una perla de polímero o similar) que se ha funcionalizado, por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o recubrimiento de un material intermedio que incluye uno o más grupos reactivos que permiten la unión covalente a un polímero, tal como un polinucleótido. Los ejemplos de tales sustratos incluyen, pero no están limitados a, hidrogeles de poliacrilamida soportados sobre un sustrato inerte tal como vidrio, particularmente hidrogeles de poliacrilamida como se describe en WO 2005/065814 y US 2008/0280773. En tales realizaciones, el polímero (por ejemplo, polinucleótido) se puede unir directamente covalentemente al material intermedio (por ejemplo, el hidrogel)

pero el material intermedio se puede unir como tal de forma no covalente al sustrato o matriz (por ejemplo, el sustrato de vidrio). El término "unión covalente a un sustrato" debe interpretarse en consecuencia como que abarca este tipo de disposición.

Los enlaces covalentes ejemplares incluyen, por ejemplo, aquellos que se producen por el uso de técnicas de química de clic. Los enlaces no covalentes ejemplares incluyen, pero no están limitados a, interacciones no específicas (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones de van der Waals, etc.) o interacciones específicas (por ejemplo, interacciones de afinidad, interacciones receptor-ligando, interacciones anticuerpo-epítipo, interacciones avidina-biotina, interacciones estreptavidina-biotina, interacciones lectina-carbohidrato, etc.). Los enlaces ejemplares se exponen en las Pat. de EE. UU. No. 6.737.236; 7.259.258; 7.375.234 y 7.427.678; y en la Pub. de Pat. de EE. UU. No. 2011/0059865 A1.

Como deben apreciar los expertos en la técnica, el número de sustratos posibles es muy grande. Los posibles sustratos incluyen, pero no están limitados a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluidos acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, etc.), polisacáridos, nylon o nitrocelulosa, cerámica, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, haces de fibras ópticas y una variedad de otros polímeros. Los sustratos particularmente útiles para algunas realizaciones están ubicados dentro de un aparato de celda de flujo.

En algunas realizaciones, el sustrato incluye una superficie con patrón adecuada para la inmovilización de uno o más polinucleótidos en un patrón ordenado. Una "superficie con patrón" se refiere a una disposición de diferentes regiones en o sobre una capa expuesta de un sustrato. Por ejemplo, una o más de las regiones pueden ser características donde están presentes uno o más polinucleótidos. Las características pueden estar separadas por regiones intersticiales donde uno o más polinucleótidos no están presentes. En algunas realizaciones, el patrón puede incluir un formato x-y de características que se organizan regularmente en filas y columnas. En algunas realizaciones, el patrón puede incluir una disposición repetitiva de características y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el patrón puede incluir una disposición aleatoria o irregular de características y/o regiones intersticiales. En algunas realizaciones, el uno o más polinucleótidos se distribuyen aleatoriamente sobre el sustrato. En algunas realizaciones, el uno o más polinucleótidos se distribuyen en una superficie con patrón. Los ejemplos de superficies con patrón que se pueden usar en los sistemas, métodos y composiciones establecidos en la presente memoria se describen en US 8.778.849 y US 8.778.848.

En algunas realizaciones, el sustrato incluye una matriz de pocillos o depresiones en una superficie. Esto puede fabricarse como se conoce generalmente en la técnica usando una variedad de técnicas, que incluyen, pero no están limitadas a, fotolitografía, técnicas de estampado, técnicas de moldeo y técnicas de micrograbado. Como apreciarán los expertos en la técnica, la técnica utilizada puede depender de la composición y la forma del sustrato.

La composición y la geometría del sustrato pueden variar con su uso. En algunas realizaciones, el sustrato incluye una estructura plana tal como un portaobjetos, chip, microchip y/o matriz. Como tal, la superficie de un sustrato puede tener la forma de una capa plana. En algunas realizaciones, el sustrato incluye una o más superficies de una celda de flujo. El término "celda de flujo", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una cámara que comprende una superficie sólida a través de la cual pueden fluir uno o más reactivos fluidos. Se describen ejemplos de células de flujo y sistemas fluidicos relacionados y plataformas de detección que pueden usarse fácilmente en los sistemas, métodos y composiciones de la presente memoria para sustratos puede usarse. La "Guía de Detección de Microesferas" de Bangs Laboratories, Fishers Ind., es una guía útil. En ciertas realizaciones, las microesferas incluyen microesferas magnéticas o perlas. Las perlas no necesitan ser esféricas; se pueden utilizar partículas irregulares. Alternativa o adicionalmente, las perlas pueden ser porosas. Ilustrativamente, los tamaños de las perlas pueden variar desde nanómetros, es decir, 100 nm, hasta milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose las perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones se pueden usar perlas más pequeñas o más grandes.

En algunas realizaciones, el sustrato o su superficie no es plana, como la superficie interna o externa de un tubo o recipiente. En algunas realizaciones, el sustrato incluye una o más microesferas o perlas. Por "microesferas" o "perlas" o "partículas" o equivalentes gramaticales en la presente memoria, se entiende partículas pequeñas discretas. Las composiciones de perlas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, plásticos, cerámicas, vidrio, poliestireno, metilostireno, polímeros acrílicos, materiales paramagnéticos, sol de toria, grafito de carbono, dióxido de titanio, látex o dextranos reticulados tales como Sefarosa, celulosa, nylon, micelas reticuladas y teflón, así como cualesquiera otros materiales descritos en la presente memoria para sustratos puede usarse. La "Guía de Detección de Microesferas" de Bangs Laboratories, Fishers Ind., es una guía útil. En ciertas realizaciones, las microesferas incluyen microesferas magnéticas o perlas. Las perlas no necesitan ser esféricas; se pueden utilizar partículas irregulares. Alternativa o adicionalmente, las perlas pueden ser porosas. Ilustrativamente, los tamaños de las perlas pueden variar desde nanómetros, es decir, 100 nm, hasta milímetros, es decir, 1 mm, prefiriéndose las perlas de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 200 micrómetros, y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 micrómetros, aunque en algunas realizaciones se pueden usar perlas más pequeñas o más grandes.

Los métodos ejemplares para unir un polinucleótido a una superficie incluyen hacer reaccionar un polinucleótido modificado con NH₂ con una superficie de sustrato recubierta con epoxisilano o recubierta con isotiocianato; hacer reaccionar un polinucleótido succinilado con una superficie de sustrato recubierta con aminosilano; hacer reaccionar un polinucleótido modificado con disulfuro con una superficie de sustrato recubierta con mercaptosilano; y hacer reaccionar un polinucleótido modificado con hidrazida con una superficie de sustrato recubierta con aldehído o

recubierta con epoxisilano. Los métodos ejemplares para acoplar un catalizador a un nucleótido incluyen formar un enlace amida entre un nucleótido modificado con base de propragilamino y el catalizador usando una reacción de formación de enlace amida mediada por un reactivo de acoplamiento de péptido tal como tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU), N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI), o N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC).

El sustrato 510 incluye opcionalmente un detector óptico (no ilustrado específicamente) operable para detectar uno o más fotones emitidos por la o las moléculas quimioluminogénicas que responden a la presencia del catalizador 530 y el nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido 522, por ejemplo, A, al que está acoplado el catalizador 530. Se describen sustratos y detectores ejemplares en otra parte de la presente memoria. El catalizador 530 es operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón, opcionalmente con la facilitación de una o más moléculas reactivas, como se describe en otra parte de la presente memoria. En algunas realizaciones, el catalizador 530 también puede ser escindible del nucleótido seleccionado, por ejemplo, A, por ejemplo, exponiendo el catalizador 530 y el nucleótido seleccionado a una o más moléculas reactivas adecuadas para escindir el acoplamiento entre el catalizador 530 y el nucleótido, con el fin de facilitar la detección del nucleótido seleccionado. Los polímeros, sustratos, catalizadores, acoplamientos, moléculas quimioluminogénicas, moléculas reactivas, reacciones quimioluminogénicas y circuitería de detección ejemplares se describen en otra parte de la presente memoria, por ejemplo, con referencia a las FIGS. 1A-1C.

Como se ilustra en la FIG. 5, la composición 500 además puede incluir, o ponerse en contacto con, una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 540 que emiten fotones respectivamente que responden a las interacciones con el catalizador 530. Por ejemplo, el catalizador 530 puede unirse o interactuar de otra manera adecuadamente con una molécula quimioluminogénica seleccionada 540', que hace que la molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 540' en la FIG. 5. Opcionalmente, la composición 500 incluye además una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 530 y las moléculas quimioluminogénicas 540 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. Como se ilustra en la FIG. 5, después de la interacción con el catalizador 530 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 540 obtengan un estado excitado 540', dichos estados excitados pueden decaer emitiendo un fotón correspondiente, como se representa en la FIG. 5 por las líneas discontinuas de la molécula 540" y la flecha con "λ" que representa la emisión de fotones. En base a la emisión de fotones, se puede detectar la presencia del nucleótido seleccionado, por ejemplo, A, por ejemplo, utilizando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón, tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el catalizador 530 interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 540, causando así la emisión de una correspondiente pluralidad de fotones, aumentando así la detectabilidad del nucleótido seleccionado, tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12. En base a la presencia detectada del nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido 522, por ejemplo, A, se puede determinar la presencia del nucleótido correspondiente del primer polinucleótido 521 con el que se encuentra hibridado ese nucleótido seleccionado, por ejemplo, T. Por consiguiente, al detectar la presencia de diferentes nucleótidos en el segundo nucleótido 522, se puede determinar la secuencia de al menos una porción del primer nucleótido 521.

Alternativamente, la supresión de la quimioluminiscencia se puede usar para detectar la presencia de nucleótidos en polinucleótidos. Por ejemplo, las FIGS. 6A-6C ilustran esquemáticamente composiciones alternativas para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La composición 600 ilustrada en la FIG. 6 incluye el sustrato 610; primer nucleótido 621 acoplado a la superficie 611 del sustrato 610 e incluye una pluralidad de nucleótidos; segundo polinucleótido 622 que incluye una pluralidad de nucleótidos, por ejemplo, ACCATTA, que se hibridan con una pluralidad correspondiente de nucleótidos del primer polinucleótido 621, por ejemplo, con TGGTAAT del primer polinucleótido 621; catalizador 630 acoplado a un primer nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido; y el apantallador 650 acoplado a un segundo nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido 622, por ejemplo, A, a través del acoplamiento 652. El sustrato 610 incluye opcionalmente un detector óptico (no ilustrado específicamente) operable para detectar uno o más fotones emitidos por una o más moléculas quimioluminogénicas que responden a la presencia del catalizador 630 en ausencia del apantallador 650. Los sustratos y detectores ejemplares se describen en otra parte de la presente memoria. El catalizador 630 es operable para hacer que una molécula quimioluminogénica emita un fotón en ausencia del apantallador 650, opcionalmente con la facilitación de una o más moléculas reactivas, como se describe en otra parte de la presente memoria. Como se ilustra en la FIG. 6A, aunque la interacción con el catalizador 630 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 640 obtengan un estado excitado 640', el apantallador 650 inhibe que dichos estados excitados emitan un fotón correspondiente, y en su lugar hace que la molécula en estado excitado decaiga sin emisión de fotones, como se representa en la FIG. 6A por las líneas discontinuas de la molécula 640". En base a la emisión inhibida de fotones, se puede detectar la presencia de un segundo nucleótido seleccionado, por ejemplo, A, por ejemplo, utilizando una circuitería adecuada configurada para detectar la inhibición de fotones tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el apantallador 650 también puede ser escindible del segundo nucleótido seleccionado, por ejemplo, A, por ejemplo, exponiendo el apantallador 650 y el segundo nucleótido seleccionado a una o más moléculas reactivas adecuadas para escindir el acoplamiento entre el apantallador y ese nucleótido, para facilitar la detección de ese nucleótido. Los polímeros, sustratos, catalizadores, acoplamientos, moléculas

quimioluminogénicas, moléculas reactivas, reacciones quimioluminogénicas y circuitería de detección ejemplares se describen en otra parte de la presente memoria, por ejemplo, con referencia a las FIGS. 1A-1C. De manera análoga a la descrita en otra parte de la presente memoria, la composición 600 puede incluir además una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 640 y opcionalmente puede incluir una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 630 y las moléculas quimioluminogénicas 640 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos en ausencia del apantallador 650. Basándose en la inhibición de la emisión de fotones que se produce por la interacción entre el apantallador 650 y las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 640', se puede detectar la presencia del nucleótido seleccionado, por ejemplo, A, usando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En base a la presencia detectada del segundo nucleótido seleccionado del segundo polinucleótido 622, por ejemplo, A, se puede determinar la presencia del nucleótido correspondiente del primer polinucleótido 621 con el que se hibrida ese nucleótido seleccionado, por ejemplo, T. Por consiguiente, al detectar la presencia de diferentes nucleótidos en el segundo nucleótido 622, se puede determinar la secuencia de al menos una porción del primer nucleótido 621.

Obsérvese que el catalizador 630 puede proporcionarse en cualquier ubicación adecuada que esté lo suficientemente cerca del apantallador 650 de modo que el apantallador 650 pueda inhibir la emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas 640 que de lo contrario pueden resultar de interacciones entre el catalizador 630 y las moléculas quimioluminogénicas 640. Como tal, no es necesario que el catalizador 630 esté acoplado necesariamente al segundo polinucleótido 622. Por ejemplo, la FIG. 6B ilustra una composición alternativa 600' en la que el catalizador 630 está acoplado al primer polinucleótido 621, y la FIG. 6C ilustra otra composición alternativa 600'' en la que el catalizador 630 está acoplado a la superficie 611 del sustrato 610.

Una secuencia de etapas ilustrativa que puede usarse para detectar secuencialmente la presencia de una pluralidad de nucleótidos en un polinucleótido y, por lo tanto, para determinar la secuencia de ese polinucleótido, se describirá ahora con referencia a las FIGS. 7 y 8A-8M. La FIG. 7 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos usando un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Las FIGS. 8A-8M ilustran esquemáticamente composiciones para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

El método 700 ilustrado en la FIG. 7 incluye proporcionar un primer polinucleótido para ser secuenciado y acoplado a un sustrato (701). Por ejemplo, el primer polinucleótido 821 ilustrado en la composición 800 de la FIG. 8A se puede acoplar a la superficie 811 del sustrato 810 usando cualquier acoplamiento adecuado proporcionado en la presente memoria o conocido de otra manera en la técnica. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido (702). Por ejemplo, el segundo polinucleótido 822 ilustrado en la FIG. 8A puede hibridarse con el primer polinucleótido 821 usando cualquier técnica adecuada proporcionada en la presente memoria o conocida de otro modo en la técnica. Aunque la FIG. 8A ilustra que el segundo polinucleótido 822 tiene la secuencia CATTa hibridada con la secuencia GTAAT del primer polinucleótido 821, debe apreciarse que el primer y segundo polinucleótidos pueden tener cualquier secuencia respectiva adecuada que hibrida entre sí.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye además poner en contacto el segundo nucleótido con una polimerasa y una pluralidad de nucleótidos (703). Un primer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un primer resto, un segundo subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un segundo resto, un tercer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un tercer resto y un cuarto subconjunto de la pluralidad de los nucleótidos pueden incluir un cuarto resto o ningún resto (703). Por ejemplo, en la realización ilustrada en la FIG. 8A, la composición 800 se pone en contacto con la polimerasa 860 que se acopla con y se une al primer polinucleótido 821 y al segundo polinucleótido 822 de tal manera que sea operable para añadir un nucleótido al segundo polinucleótido 822 basado en la secuencia del primer polinucleótido 821. La composición 800 también se pone en contacto con una pluralidad de nucleótidos que se pueden acoplar a uno o más restos diferentes entre sí para facilitar la distinción de la presencia de un nucleótido particular en el segundo polinucleótido 822 de los otros nucleótidos en ese polinucleótido. En un ejemplo ilustrativo, no limitativo, el nucleótido C 870 se puede acoplar al primer resto 871 mediante el primer acoplamiento 872; el nucleótido A 880 puede acoplarse al segundo resto 881 a través del segundo acoplamiento 882; el nucleótido T 890 puede acoplarse al tercer resto 891 a través del tercer acoplamiento 892; y el nucleótido G puede dejarse "en blanco" sin estar acoplado a ningún resto, o alternativamente puede estar acoplado a un cuarto resto a través de un cuarto acoplamiento (no ilustrado específicamente). Debe apreciarse que cualquier nucleótido que no sea G puede dejarse alternativamente "en blanco" en lugar de G. Los restos a los que están acoplados los nucleótidos, o los acoplamientos entre ellos, o tanto los restos como los nucleótidos, pueden seleccionarse para facilitar la identificación del nucleótido particular que se ha añadido al segundo polinucleótido 822, por ejemplo, usando una serie de etapas en las que los nucleótidos acoplados a ciertos restos están expuestos a catalizadores acoplados a ciertos restos que pueden interactuar con los restos de solo cierto subconjunto o subconjuntos de los nucleótidos o pueden escindirse selectivamente de solo ciertos cierto subconjunto o subconjuntos de los nucleótidos, de una manera tal como se proporciona en la presente memoria.

Como se ilustra en la FIG. 7, el método 700 también incluye añadir un nucleótido de la pluralidad de nucleótidos al segundo polinucleótido basándose en la secuencia del primer polinucleótido (704). Por ejemplo, la polimerasa 860 ilustrada en la FIG. 8A puede ser operable para añadir otro nucleótido al segundo polinucleótido 822 basándose en la secuencia del primer polinucleótido 821, por ejemplo, agrega C 870 al segundo polinucleótido 822 basándose en la G

presente en la secuencia del primer polinucleótido 821, como se ilustra en la FIG. 8B. Como se indicó anteriormente, el nucleótido C 870 se acopla al resto 871 mediante el acoplamiento 872. Después de añadir el nucleótido C 870 al segundo polinucleótido 822, la polimerasa 860 se puede eliminar por lavado.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto (705). Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 8B, la composición 800 puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 831 mediante el acoplamiento 832. El resto 831 del catalizador 830 se acopla al resto 871 del nucleótido C 870, acoplando así el catalizador 830 al segundo polinucleótido 822. El resto 831 del catalizador 830 y el resto 871 del nucleótido C 870 se pueden seleccionar de modo que, si se hubiera añadido un nucleótido distinto de C al segundo polinucleótido 822 basándose en la secuencia del primer polinucleótido 821, el resto 831 puede no acoplarse necesariamente al resto de ese otro nucleótido. Dicho de otro modo, los restos 831 y 871 pueden seleccionarse para acoplarse entre sí y no necesariamente para acoplarse con uno o más restos distintos. Además, o alternativamente, y como se describe con mayor detalle a continuación, el acoplamiento 872 o el resto 871 del nucleótido C 870 puede seleccionarse opcionalmente para permitir la escisión selectiva del catalizador 830 del nucleótido C durante una etapa posterior, lo que puede facilitar aún más la detección de nucleótidos C. El exceso de catalizador 830 que no se acopló al nucleótido C 870 puede eliminarse por lavado.

El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (706). Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 8C, la composición 800 puede ponerse en contacto con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 840. El catalizador puede interactuar adecuadamente con una molécula quimioluminogénica seleccionada 840' de la pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 840, lo que hace que esa molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado, como se representa por las líneas punteadas de la molécula 840' en la FIG. 8C. Opcionalmente, también se pueden proporcionar una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador 830 y las moléculas quimioluminogénicas 840 para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos. Como se ilustra en la FIG. 8C, después de la interacción con el catalizador 830 y la o las moléculas reactivas opcionales hace que las moléculas quimioluminogénicas 840 obtengan un estado excitado 840', tales estados excitados pueden decaer a un estado fundamental, como se representa en la FIG. 8C por las líneas discontinuas de la molécula 840", emitiendo un fotón correspondiente, como se representa por la flecha con "λ".

El método 700 ilustrado en la FIG. 7 incluye la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (707). Por ejemplo, en la realización ilustrada en la FIG. 8C, se puede detectar la emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 840', por ejemplo, usando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el catalizador 830 interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas 840, causando así la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones, aumentando así la detectabilidad del nucleótido C 870, tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12. Obsérvese que si el nucleótido que se había añadido al segundo polinucleótido 822 había sido un nucleótido distinto de C, y por lo tanto estaba acoplado a un resto distinto del primer resto 871, entonces el resto 831 acoplado al catalizador 830 puede no haberse acoplado necesariamente al resto 871; como tal, los fotones pueden no emitirse necesariamente durante la etapa 705 o detectarse durante la etapa 706 para ese nucleótido; dicha ausencia de fotones también se puede detectar y utilizar para identificar el nucleótido que se ha añadido al segundo nucleótido 822.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto (708). Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 8D, la composición 800 puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 836 mediante el acoplamiento 833. Sin embargo, debido a que el resto 871 del nucleótido C 870 ya está acoplado al resto 831 del catalizador 830, o porque el resto 871 del nucleótido C 870 no se acopla al resto 836 del catalizador 830, o ambos, el resto 836 no se acopla al nucleótido C 870 en esta realización ilustrativa. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (709), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (710), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. Obsérvese que debido a que el nucleótido C 870 permanece acoplado al catalizador 830 a través de los restos 871 y 831 durante las etapas 708-710, la emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 840' puede detectarse de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 706-707.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye además exponer el nucleótido a una molécula de corte (711). Por ejemplo, la FIG. 8E ilustra la puesta en contacto de la composición 800 con las moléculas 841 que pueden escindir selectivamente uno o más restos catalíticos determinados de uno o más restos de nucleótidos determinados, pero sustancialmente no escinden el resto 831 del catalizador 830 del resto 871 del nucleótido C 870. Las moléculas de corte ejemplares incluyen trishidroxipropilfosfina (THP) y triscarboxietilfosfina (TCEP), aunque pueden usarse otras adecuadamente dependiendo de la naturaleza de la unión entre el catalizador y el nucleótido. Por ejemplo, la escisión de enlaces disulfuro u otros grupos de escisión reductora se puede lograr mediante un agente reductor. La reducción de un enlace disulfuro da como resultado la liberación del resto del catalizador del resto nucleótido, por ejemplo, un hapteno o conjugado de hapteno. Los agentes reductores útiles en la práctica de las realizaciones como se describe en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, compuestos de fosfina, fosfinas solubles en agua, fosfinas que contienen nitrógeno y sales y derivados de las mismas, ditioeritritol (DTE),

5 ditiotreitól (DTT) (isómeros *cis* y *trans*, respectivamente, de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiolbutano), 2-mercaptoetanol o β -mercaptoetanol (BME), 2-mercaptoetanol o aminoetanotiol, glutatión, tioglicolato o ácido tioglicólico, 2,3-dimercaptopropanol y tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), ácido tris(hidroximetil)fosfina (THP) y ácido β -[tris (hidroximetil)fosfina] propiónico (THPP). En algunas realizaciones, un agente reductor usado para escindir un enlace

10 disulfuro que acopla un catalizador a un nucleótido como se describe en la presente memoria es DTT. En algunas realizaciones, la concentración de un reactivo reductor, por ejemplo, DTT, utilizada para escindir un enlace disulfuro es de al menos 1 a 1.000 mM, al menos 20 a 800 mM, al menos 40 a 500 mM, y preferiblemente al menos 50 a 200 mM. En algunas realizaciones, un agente reductor usado para escindir un enlace disulfuro que acopla un catalizador a un nucleótido como se describe en la presente memoria es un reactivo de fosfina, un reactivo de fosfina

15 soluble en agua, un reactivo de fosfina que contiene nitrógeno y sales y derivados del mismo. Los reactivos de fosfina ejemplares incluyen, pero no están limitados a, TCEP, THP y los descritos en la publicación de patente de EE. UU. 2009/0325172 tales como triarilfosfinas, trialquilfosfinas, fosfinas que contienen sulfonato y que contienen carboxilato y fosfinas solubles en agua derivatizadas. En algunas realizaciones, la concentración de una fosfina utilizada para escindir un enlace disulfuro es al menos 0,5-500 mM, al menos 5 a 50 mM, y preferiblemente al menos 10 a 40 mM. Los métodos y composiciones como se describen en la presente memoria no están limitados por ningún grupo de escisión particular y las alternativas serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica y se consideran dentro del alcance de la presente descripción.

El método 700 ilustrado en la FIG. 7 puede incluir además exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (712), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700

20 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (713), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 puede incluir detectar el nucleótido que se añadió en la etapa 704 en base a la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones en las etapas 707, 710 o 713 o una combinación de los mismos (714). Por ejemplo, sin conocer necesariamente *a priori* la identidad del nucleótido

25 seleccionado añadido en la etapa 704, basándose en la detección en la etapa 707 de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al quinto resto en la etapa 705 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 706, se puede determinar que el nucleótido se acopló durante la etapa 705 al catalizador 730. Además, en base a la detección en la etapa 713 de emisión de fotones después de exponer el nucleótido a la molécula de corte en la etapa 711 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 712, se puede determinar que el nucleótido permaneció acoplado durante la etapa 711 al catalizador 730. En base a estas detecciones, y al conocimiento de la compatibilidad de los restos 831 y 871 y la acción posterior de la molécula de corte 841, se puede determinar que el nucleótido es C 870.

Debe apreciarse que para cualquier secuencia dada del primer polinucleótido 821, es aproximadamente tan probable que la polimerasa 860 agregue G, T, A o C al segundo polinucleótido 822 durante la etapa 704. Las etapas 705-714

35 pueden usarse de manera análoga para detectar nucleótidos distintos de C. Por ejemplo, en la composición alternativa ejemplar 800' ilustrada en la FIG. 8F, se añadió el nucleótido A 880 al segundo polinucleótido alternativo 822' en base a la secuencia del primer polinucleótido alternativo 821'.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto (705), de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la FIG. 8B. Por ejemplo, como

40 se ilustra en la FIG. 8F, la composición alternativa 800' puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 831 a través del acoplamiento 832. El resto 831 del catalizador 830 se acopla al resto 881 del nucleótido A 880, acoplado así el catalizador 830 al segundo polinucleótido 822. Puede seleccionarse el resto 831 del catalizador 830 y el resto 881 del nucleótido A 880 de manera que, si se hubiera añadido un nucleótido distinto de A al segundo polinucleótido 822 basándose en la secuencia del primer polinucleótido 821, el resto 831 puede no acoplarse necesariamente al resto de ese otro nucleótido. Dicho de otro modo, los restos 831 y 881 pueden seleccionarse para acoplarse entre sí y no necesariamente para acoplarse con uno o más restos distintos. Sin embargo, en la realización

45 ilustrada, el resto 831 puede seleccionarse para acoplarse tanto con el resto 871 del nucleótido C como con el resto 881 del nucleótido A. Por ejemplo, el resto 831 puede incluir estreptavidina, el resto 871 puede incluir biotina o un derivado de biotina, y el resto 881 puede incluir una biotina o un derivado de biotina que tiene una reactividad diferente que la biotina o el derivado de biotina del resto 871. Los nucleótidos A y C pueden distinguirse entre sí en función de las diferentes reactividades de la biotina o derivados de biotina acoplados a los mismos. Por ejemplo, el resto 871 del nucleótido C 870 se puede seleccionar para permitir la escisión selectiva del catalizador 830 del nucleótido C durante la etapa 711, o el resto 881 del nucleótido A 880 se puede seleccionar para permitir la escisión selectiva del catalizador 830 del nucleótido A durante la etapa 711, cualquiera de los cuales puede facilitar aún más la distinción del nucleótido C del nucleótido A. Alternativamente, los restos 871 y 881 de los nucleótidos A y C pueden ser iguales entre sí, pero los respectivos acoplamientos 872 y 882 pueden tener capacidades de escisión diferentes entre sí, facilitando así la escisión selectiva del catalizador 830 del nucleótido C o del nucleótido A durante la etapa 711 y facilitando así la distinción del nucleótido C del nucleótido A.

50

55

El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (706) y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (707), por ejemplo, como se describió anteriormente con referencia a la FIG. 8C y como se ilustra en la FIG. 8G. El método 700 también puede incluir exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto (708). Por ejemplo, de manera análoga

60

a la descrita anteriormente con referencia a la FIG. 8D, la composición 800 puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 836 mediante el acoplamiento 833. Sin embargo, debido a que el resto 881 del nucleótido A 880 ya está acoplado al resto 831 del catalizador 830, o porque el resto 881 del nucleótido A 880 no se acopla al resto 836 del catalizador 830, o ambos, el resto 836 no se acopla al nucleótido A 880 en esta realización ilustrativa. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (709), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (710), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 incluye además exponer el nucleótido a una molécula de corte (711) de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la FIG. 8E. Por ejemplo, la FIG. 8H ilustra la puesta en contacto de la composición 800' con las moléculas 841 que pueden escindir selectivamente uno o más restos del catalizador determinados de uno o más restos de nucleótidos determinados. Sin embargo, mientras que el nucleótido C 870 permaneció acoplado al catalizador 830 a través de los restos 871 y 831 durante la etapa 711, la FIG. 8H ilustra que la molécula de corte 841 escinde el resto 831 del catalizador 830 del resto 881 del nucleótido A 880. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 puede incluir además exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (712), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (713), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. Una ausencia de emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 840', como resultado de una ausencia del catalizador 830, puede detectarse de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 706-707.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 puede incluir detectar el nucleótido que se añadió en la etapa 704 en base a la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones en las etapas 707, 710 o 713 o una combinación de los mismos (714). Por ejemplo, sin conocer necesariamente *a priori* la identidad del nucleótido seleccionado añadido en la etapa 704, basándose en la detección en la etapa 707 de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al quinto resto en la etapa 705 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 706, se puede determinar que el nucleótido se acopló durante la etapa 705 al catalizador 730. Además, en base a la detección en la etapa 713 de una ausencia de fotones después de exponer el nucleótido a la molécula de corte en la etapa 711 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 712, se puede determinar que el nucleótido fue escindido durante la etapa 711 del catalizador 730. En base a estas dos detecciones, y al conocimiento de la compatibilidad de los restos 831 y 871 y la acción de la molécula de corte 841, se puede determinar que el nucleótido es A 880.

Como otro ejemplo más, en la composición alternativa ejemplar 800" ilustrada en la FIG. 8K, el nucleótido T 890 se añadió al segundo polinucleótido alternativo 822" sobre la base de la secuencia del primer polinucleótido alternativo 821".

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto (705), de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 8B y 8F. Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 8I, la composición alternativa 800" puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 831 mediante el acoplamiento 832. Sin embargo, el resto 831 del catalizador 830 no se acopla al resto 891 del nucleótido A 880, y como tal, el catalizador 830 no se acopla al segundo polinucleótido 822 durante la etapa 705. Por ejemplo, el resto 831 puede incluir estreptavidina, y el resto 891 puede incluir digoxigenina o antidigoxigenina. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (706) y detectar la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (707), por ejemplo, como se describió anteriormente con referencia a la FIG. 8C. Debido a que el catalizador 830 no está presente durante la etapa 706, en este ejemplo puede detectarse una ausencia de fotones durante la etapa 707. El método 700 también puede incluir exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto (708). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la FIG. 8D, y como se ilustra en la figura 8J, una composición alternativa 800" puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 836 mediante el acoplamiento 833. El resto 891 del nucleótido T 890 se acopla al resto 836 del catalizador 830. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (709), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (710), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. Como se ilustra en la FIG. 8K, basándose en la presencia del catalizador 830 durante la etapa 709, las moléculas quimioluminogénicas excitadas 840' emiten fotones que son detectables en la etapa 710.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 incluye además exponer el nucleótido a una molécula de corte (711) de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la FIG. 8E. Por ejemplo, la FIG. 8L ilustra la puesta en contacto de la composición 800" con las moléculas 841 que pueden escindir selectivamente uno o más restos del catalizador determinados de uno o más restos de nucleótidos determinados. Sin embargo, el nucleótido T 890 permanece acoplado al catalizador 830 a través de los restos 891 y 836 durante la etapa 711 porque las moléculas de corte 841 sustancialmente no escinden el resto 891 del resto 836. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 puede incluir además exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (712), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión

de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (713), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. La emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 840', como resultado de la presencia del catalizador 830, puede detectarse de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 706-707.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 puede incluir detectar el nucleótido que se añadió en la etapa 704 en base a la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones en las etapas 707, 710 o 713 o una combinación de los mismos (714). Por ejemplo, sin conocer necesariamente *a priori* la identidad del nucleótido seleccionado añadido en la etapa 704, basándose en la detección en la etapa 707 de una ausencia de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al quinto resto en la etapa 705 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 706, se puede determinar que el nucleótido no se acopló durante la etapa 705 al catalizador 730. Además, basándose en la detección en la etapa 710 de la emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al sexto resto en la etapa 708 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 709, se puede determinar que el nucleótido se acopló durante la etapa 709 al catalizador 730. Además, en base a la detección en la etapa 713 de fotones después de exponer el nucleótido a la molécula de corte en la etapa 711 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 712, se puede determinar que el nucleótido no se escindió durante la etapa 711 del catalizador 730. En base a estas detecciones, y al conocimiento de la compatibilidad de los restos 831, 836, y 891 y la acción posterior de la molécula de corte 841, se puede determinar que el nucleótido es T 890.

Como otro ejemplo más, en la composición alternativa ejemplar 800''' ilustrada en la FIG. 8M, se añadió el nucleótido G 899 al segundo polinucleótido alternativo 822''' basándose en la secuencia del primer polinucleótido alternativo 821'''.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 7, el método 700 incluye exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto (705), de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 8B y 8F. Por ejemplo, la composición alternativa 800'' puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 831 mediante el acoplamiento 832. Sin embargo, el nucleótido G no incluye un resto al que el resto 831 del catalizador 830 pueda acoplarse, y como tal, el catalizador 830 no se acopla al segundo polinucleótido 822 durante la etapa 705. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (706) y detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (707), por ejemplo, como se describió anteriormente con referencia a la FIG. 8C. Debido a que el catalizador 830 no está presente durante la etapa 706, en este ejemplo se puede detectar una ausencia de fotones durante la etapa 707. El método 700 también puede incluir exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto (708). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 8D y 8J, la composición alternativa 800''' puede ponerse en contacto con el catalizador 830 acoplado al resto 836 mediante el acoplamiento 833. Si embargo, el nucleótido G no incluye un resto al que se puede acoplar el resto 836 del catalizador 830, y como tal, el catalizador 830 no se acopla al segundo polinucleótido 822 durante la etapa 708. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (709), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (710), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. Debido a que el catalizador 830 no está presente durante la etapa 709, la ausencia de fotones puede ser detectada durante la etapa 710 en este ejemplo.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 incluye además exponer el nucleótido a una molécula de corte (711) de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 8E y 8L. Por ejemplo, la composición 800''' puede ponerse en contacto con las moléculas 841 que pueden escindir selectivamente uno o más restos del catalizador determinados de uno o más restos de nucleótidos determinados. Sin embargo, debido a que el nucleótido G 899 no está acoplado al catalizador 830, las moléculas de corte 841 no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la composición 800'''. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 puede incluir además exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (712), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706. El método 700 ilustrado en la FIG. 7 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (713), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707. Se puede detectar una ausencia de emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 840', como resultado de la ausencia del catalizador 830 durante la etapa 712, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 706-707.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 7, el método 700 puede incluir detectar el nucleótido que se añadió en la etapa 704 en base a la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones en las etapas 707, 710 o 713 o una combinación de los mismos (714). Por ejemplo, sin conocer necesariamente *a priori* la identidad del nucleótido seleccionado añadido en la etapa 704, basada en la detección en la etapa 707 de una ausencia de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al quinto resto en la etapa 705 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 706, se puede determinar que el nucleótido no se acopló durante la etapa 705 al catalizador 730. Además, basándose en la detección en la etapa 710 de una ausencia de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al catalizador acoplado al sexto resto en la etapa 708 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 709, se puede determinar que el nucleótido no se acopló durante la etapa 709 al catalizador 730. En base a estas detecciones, y al conocimiento de la ausencia de un resto acoplado al nucleótido G 899, se puede determinar que el nucleótido es G 899.

Como se ilustra en la FIG. 7, las etapas 703-714 pueden repetirse cualquier número adecuado de veces para diferentes nucleótidos que se agregan al segundo nucleótido, por ejemplo, en base a la secuencia del primer nucleótido. En algunas realizaciones, antes de repetir la etapa 703, se puede realizar una etapa adicional para escindir cualquier resto, acoplamiento y catalizador del nucleótido añadido durante la implementación previa de las etapas 703-714, de modo que la polimerasa con la que se pone en contacto la composición puede añadir fácilmente un nuevo nucleótido al segundo nucleótido.

Además, obsérvese que el o los catalizadores a los que se expone el nucleótido durante las etapas 705 y 708 pueden ser, pero no necesariamente, iguales entre sí. Por ejemplo, el catalizador al que se expone el nucleótido durante la etapa 705 puede incluir un primer catalizador, y el catalizador al que se expone el nucleótido durante la etapa 708 puede incluir un segundo catalizador que sea igual o diferente al primer catalizador. Además, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante las etapas 706, 709 y 712 pueden ser, pero no necesariamente, iguales entre sí. Por ejemplo, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 706 pueden incluir un primer tipo de moléculas quimioluminogénicas, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 709 pueden incluir un segundo tipo de moléculas quimioluminogénicas que son iguales o diferentes al primer tipo de moléculas quimioluminogénicas, y las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 712 pueden incluir un tercer tipo de moléculas quimioluminogénicas que son iguales o diferentes al primer o segundo tipo de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo ilustrativo, el nucleótido se expone a un primer catalizador en la etapa 705 y a las primeras moléculas quimioluminogénicas en la etapa 706 que interactúan con el primer catalizador, y se expone a un segundo catalizador en la etapa 708 y a las segundas moléculas quimioluminogénicas en la etapa 709 que interactúan con el segundo catalizador, pero no con el primer catalizador. Otras permutaciones son posibles.

Debe apreciarse que las etapas descritas anteriormente con referencia a la FIG. 7 y las FIGS. 8A-8M se puede adaptar fácilmente para incluir el uso de un apantallador como se ilustra en las FIGS. 6A-6C para inhibir la quimioluminiscencia. La FIG. 9 ilustra un método alternativo para detectar la presencia de nucleótidos usando un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

El método 900 ilustrado en la FIG. 9 incluye proporcionar un primer polinucleótido para ser secuenciado y acoplado a un sustrato (901). Por ejemplo, el primer polinucleótido 621 ilustrado respectivamente en las composiciones 600, 600' o 600" de las FIGS. 6A-6C se puede acoplar a la superficie 611 del sustrato 610 usando cualquier acoplamiento adecuado proporcionado en la presente memoria o conocido en la técnica. El método 900 ilustrado en la FIG. 9 también incluye hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido (902). Por ejemplo, el segundo polinucleótido 622 ilustrado en las FIGS. 6A-6C puede hibridarse con el primer polinucleótido 621 usando cualquier técnica adecuada proporcionada en la presente memoria o conocida de otro modo en la técnica. Aunque las FIGS. 6A-6C ilustran que el segundo polinucleótido 622 tiene la secuencia ACCATTA hibridada con la secuencia TGGTAAT del primer polinucleótido 621, debe apreciarse que el primer y segundo polinucleótidos pueden tener cualquier secuencia respectiva adecuada que se hibrida entre sí.

Además, el método 900 ilustrado en la FIG. 9 incluye proporcionar un catalizador acoplado suficientemente cerca del segundo polinucleótido de manera que un apantallador acoplado al segundo polinucleótido pueda inhibir la emisión de fotones de las moléculas quimioluminiscentes que interactúan con el catalizador (902'). Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 6A, el catalizador 630 puede acoplarse al segundo polinucleótido 622. Como otro ejemplo, ilustrado en la FIG. 6B, el catalizador 630 puede acoplarse al primer polinucleótido 621. Como otro ejemplo, ilustrado en la FIG. 6C, el catalizador 630 puede acoplarse a la superficie 611 del sustrato 610. Debe apreciarse que el catalizador 630 puede acoplarse a cualquier región adecuada del segundo polinucleótido 622, o a cualquier región adecuada del primer polinucleótido 621, o a cualquier región adecuada de la superficie 611, o acoplarse lo suficientemente cerca del segundo polinucleótido 622 de manera que el apantallador 650 (que puede acoplarse al segundo polinucleótido 622 en una etapa posterior) pueda inhibir la emisión de fotones de las moléculas quimioluminiscentes 640 que interactúan con el catalizador 630.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 9, el método 900 incluye además poner en contacto el segundo nucleótido con una polimerasa y una pluralidad de nucleótidos (903). Un subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un primer resto, un segundo subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un segundo resto, un tercer subconjunto de la pluralidad de nucleótidos puede incluir un tercer resto y un cuarto subconjunto de la pluralidad de los nucleótidos pueden incluir un cuarto resto o ningún resto (903). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 703 de la FIG. 7 y la FIG. 8A, la composición puede ponerse en contacto con una polimerasa que se acopla y une al primer y segundo polinucleótidos de tal manera que sea operable para añadir un nucleótido al segundo polinucleótido basado en la secuencia del primer polinucleótido. La composición también se puede poner en contacto con una pluralidad de nucleótidos que se pueden acoplar a uno o más restos diferentes entre sí para facilitar la distinción de la presencia de un nucleótido particular en el segundo polinucleótido de los otros nucleótidos en ese polinucleótido. Los restos a los que se acoplan los nucleótidos, o los acoplamientos entre ellos, o tanto los restos como los nucleótidos, se pueden seleccionar para facilitar la identificación del nucleótido particular que se ha añadido al segundo polinucleótido, por ejemplo, usando una serie de etapas en las que los nucleótidos acoplados a ciertos restos están expuestos a apantalladores acoplados a ciertos restos que pueden interactuar con los restos de solo ciertos subconjuntos de los nucleótidos o pueden escindirse selectivamente de solo ciertos subconjuntos de los nucleótidos, de una manera tal como se proporciona en la presente memoria.

Como se ilustra en la FIG. 9, el método 900 también incluye añadir un nucleótido de la pluralidad de nucleótidos al segundo polinucleótido basado en la secuencia del primer polinucleótido (904). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 704 de la FIG. 7 y las FIGS. 8A y 8B, la polimerasa puede ser operable para añadir otro nucleótido al segundo polinucleótido basado en la secuencia del primer polinucleótido, por ejemplo, agrega C al segundo polinucleótido basado en el G presente en la secuencia del primer polinucleótido, basado en la secuencia ejemplar del primer nucleótido 621 ilustrado en las FIGS. 6A-6C. De manera análoga a la ilustrada en la FIG. 8A, el nucleótido C se puede acoplar a un resto determinado mediante un cierto acoplamiento. Después de añadir el nucleótido C al segundo polinucleótido, la polimerasa se puede eliminar por lavado.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 9, el método 900 incluye exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un quinto resto (905). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 705 de la FIG. 7 y la FIG. 8B, la composición puede ponerse en contacto con un apantallador acoplado a un quinto resto mediante un quinto acoplamiento. Dependiendo de los restos particulares a los que están acoplados respectivamente el nucleótido y el apantallador, esos restos pueden acoplarse entre sí. En un ejemplo ilustrativo, el resto del apantallador puede acoplarse al resto del nucleótido C, acoplando así el apantallador al segundo polinucleótido. Los restos del apantallador y el nucleótido, respectivamente, se pueden seleccionar de manera que si se hubiera añadido un nucleótido distinto de C al segundo polinucleótido basado en la secuencia del primer polinucleótido, el resto del apantallador puede no acoplarse necesariamente al resto de ese otro nucleótido. Dicho de otra manera, el resto del apantallador y el resto del nucleótido C pueden seleccionarse para acoplarse entre sí y no necesariamente acoplarse con uno o más restos. Además, o alternatively, y como se describe con mayor detalle en la presente memoria, el acoplamiento o resto del nucleótido C puede seleccionarse opcionalmente para permitir la escisión selectiva del apantallador del nucleótido C durante una etapa posterior, lo que puede facilitar aún más la detección del nucleótido C. El exceso de apantallador que no se acopló al nucleótido C puede eliminarse por lavado.

El método 900 ilustrado en la FIG. 9 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (906). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706 de la FIG. 7 y la FIG. 8C, y también como se ilustra en las FIGS. 6A-6C, la composición puede ponerse en contacto con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas. El catalizador puede interactuar adecuadamente con una molécula quimioluminogénica seleccionada de la pluralidad de moléculas quimioluminogénicas, lo que puede hacer que esa molécula quimioluminogénica tenga un estado excitado. Opcionalmente, también se pueden proporcionar una o más moléculas reactivas (no ilustradas específicamente) que pueden facilitar la interacción entre el catalizador y las moléculas quimioluminogénicas para hacer que las moléculas quimioluminogénicas emitan fotones respectivos en ausencia del apantallador. Sin embargo, aunque la interacción con el catalizador y la o las moléculas reactivas opcionales puede hacer que las moléculas quimioluminogénicas obtengan un estado excitado, el apantallador acoplado al nucleótido seleccionado puede inhibir que dichos estados excitados emitan un fotón correspondiente.

El método 900 ilustrado en la FIG. 9 incluye la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (907). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707 de la FIG. 7 y la FIG. 8C, se puede detectar una ausencia de emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado, por ejemplo, usando una circuitería adecuada configurada para detectar el fotón tal como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B. En algunas realizaciones, el catalizador interactúa con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas, y por lo tanto causaría la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones en ausencia del apantallador, aumentando así la detectabilidad del nucleótido C, como se describe adicionalmente más adelante con referencia a la FIG. 12. Obsérvese que si el nucleótido que se había añadido al segundo polinucleótido hubiera sido un nucleótido distinto de C y, por lo tanto, estuviera acoplado a un resto distinto del primer resto, entonces el resto acoplado al apantallador puede no acoplarse necesariamente al primer resto; como tal, los fotones pueden emitirse durante la etapa 905 o detectarse durante la etapa 906 para ese nucleótido; dicha emisión de fotones también puede detectarse y usarse para identificar el nucleótido que se ha añadido al segundo nucleótido.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 9, el método 900 incluye exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un sexto resto (908). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 708 de la FIG. 7 y la FIG. 8D, la composición puede ponerse en contacto con el apantallador acoplado a un sexto resto mediante un sexto acoplamiento. En una realización ilustrativa, como el resto del nucleótido C ya está acoplado al resto del apantallador, o como el resto del nucleótido C no se acopla al sexto resto del apantallador, o ambos, el sexto resto del apantallador no se acopla al nucleótido C en esta realización ilustrativa. El método 900 ilustrado en la FIG. 9 también incluye exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (909), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 906. El método 900 ilustrado en la FIG. 9 también incluye la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (910), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 907. Obsérvese que debido a que el nucleótido C permanece acoplado al apantallador a través del primer y quinto restos durante las etapas 908-710, se puede detectar una ausencia de emisión de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 906-707.

Haciendo referencia nuevamente a la FIG. 9, el método 900 incluye además exponer el nucleótido a una molécula de corte (911). Por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 711 de la FIG. 7 y la FIG. 8E, la composición puede ponerse en contacto con moléculas que pueden escindir selectivamente uno o más

restos de apantallador determinados de uno o más restos de nucleótidos determinados, pero, en esta realización ilustrativa, no escinde sustancialmente el quinto resto del apantallador del primer resto del nucleótido C. El método 900 ilustrado en la FIG. 9 puede incluir además exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas (912), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 906. El método 900 ilustrado en la FIG. 9 también incluye detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (913), por ejemplo, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 907.

Haciendo referencia todavía a la FIG. 9, el método 900 puede incluir detectar el nucleótido que se agregó en la etapa 904 en base a la detección de la emisión de fotones o la ausencia de fotones en las etapas 907, 910 o 913 o una combinación de los mismos (914). Por ejemplo, sin conocer necesariamente *a priori* la identidad del nucleótido seleccionado añadido en la etapa 904, en base a la detección en la etapa 907 de una ausencia de emisión de fotones después de exponer el nucleótido al apantallador acoplado al quinto resto en la etapa 905 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 906, se puede determinar que el nucleótido se acopló durante la etapa 905 al apantallador. Además, en base a la detección en la etapa 913 de una ausencia de emisión de fotones después de exponer el nucleótido a la molécula de corte en la etapa 911 y las moléculas quimioluminogénicas en la etapa 912, se puede determinar que el nucleótido permaneció acoplado durante la etapa 911 al apantallador. En base a estas detecciones, y al conocimiento de la compatibilidad de los restos respectivos a los que se acoplan el nucleótido y el apantallador y la acción posterior de la molécula de corte, se puede determinar que el nucleótido es C.

Debe apreciarse que para cualquier secuencia dada del primer polinucleótido, es aproximadamente tan probable que la polimerasa agregue G, T, A o C al segundo polinucleótido durante la etapa 904. Las etapas 905-914 pueden usarse de manera análoga para detectar nucleótidos distintos de C, de la manera descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 8F-8M.

Además, obsérvese que el o los apantalladores a los que se expone el nucleótido durante las etapas 905 y 908 pueden ser, pero no necesariamente, iguales entre sí. Por ejemplo, el apantallador al que se expone el nucleótido durante la etapa 905 puede incluir un primer apantallador, y el apantallador al que se expone el nucleótido durante la etapa 908 puede incluir un segundo apantallador que es igual o diferente al primer apantallador. Además, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante las etapas 906, 909 y 912 pueden ser, pero no necesariamente, iguales entre sí. Por ejemplo, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 906 pueden incluir un primer tipo de moléculas quimioluminogénicas, las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 909 pueden incluir un segundo tipo de moléculas quimioluminogénicas que son iguales o diferentes al primer tipo de moléculas quimioluminogénicas, y las moléculas quimioluminogénicas a las que se expone el nucleótido durante la etapa 912 pueden incluir un tercer tipo de moléculas quimioluminogénicas que son iguales o diferentes al primer o segundo tipo de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo ilustrativo, el nucleótido se expone a un primer apantallador en la etapa 905 y a las primeras moléculas quimioluminogénicas en la etapa 906 que interactúan con el primer apantallador, y se expone a un segundo apantallador en la etapa 908 y a las segundas moléculas quimioluminogénicas en la etapa 909 que interactúan con el segundo apantallador, pero no con el primer apantallador. Otras permutaciones son posibles.

Sistemas ejemplares

Ahora se describirán sistemas ejemplares para detectar la presencia de subunidades de polímeros con referencia a las FIGS. 10A-10B y 11A-11B.

Las FIGS. 10A-10B ilustran esquemáticamente sistemas que incluyen circuitería de detección configurada para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. El sistema 1000 ilustrado en la FIG. 10A incluye el sustrato 1010, el polímero 1020 que incluye una pluralidad de subunidades 1021 y acoplado a la superficie 1011 del sustrato 1010, el catalizador 1030 acoplado a la subunidad seleccionada 1021' y la circuitería configurada para detectar los fotones emitidos por las moléculas quimioluminogénicas 1040 con las que se puede poner en contacto el sistema 1000. En la realización ilustrada, la circuitería incluye el circuito de detección 1050 y el detector óptico 1051 dispuesto a una distancia espaciada del sustrato 1010. El detector óptico 1051 está configurado para generar una señal eléctrica basada en la emisión de fotones o la ausencia de fotones dentro del campo de visión del detector óptico 1051, ilustrado esquemáticamente en la FIG. 10A usando las líneas de punto de guion, y para proporcionar dicha señal eléctrica al circuito de detección 1050 para su análisis. Por ejemplo, el circuito de detección 1050 puede configurarse para detectar la presencia de la subunidad 1021' del polímero 1020 en base a la detección de fotones (o ausencia de los mismos) emitidos por las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 1040' a medida que se desintegran en moléculas de estado fundamental 1040" con emisión de fotones, representado por la flecha y λ .

El detector óptico 1051 puede incluir cualquier dispositivo adecuado configurado para generar una señal eléctrica o basada en fibra óptica basada en fotones recibidos (o no recibidos) por el dispositivo. Como un ejemplo, el detector óptico 1051 puede incluir un sensor de píxeles activos (APS) que incluye una matriz de fotodetectores amplificados configurados para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos por los fotodetectores. Los APS se pueden basar en la tecnología complementaria de semiconductores de óxido de metal (CMOS) conocida en la técnica. Los detectores basados en CMOS pueden incluir transistores de efecto de campo (FET), por ejemplo, transistores de efecto de campo de semiconductores de óxido de metal (MOSFET). En realizaciones particulares, se puede usar un

generador de imágenes CMOS que tiene un diodo de avalancha de fotón único (CMOS-SPAD), por ejemplo, para distinguir fluoróforos usando imaginaria de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM). Los ejemplos de sistemas basados en CMOS se describen en US 2008/0037008 A1; Giraud et al., Biomedical Optics Express 1: 1302-1308 (2010); y Stoppa et al., IEEE European Solid-State Device Conference (ESSCIRC), Atenas, Grecia, IEEE, pp. 204-207 (2009). Otros dispositivos de detección útiles que se pueden usar incluyen, por ejemplo, los descritos en US 7.329.860 y US 2010/0111768 A1.

Como otro ejemplo, el detector óptico 1051 puede incluir un fotodiodo, tal como un fotodiodo de avalancha. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un dispositivo de carga acoplada (CCD). Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un detector de fotones criogénico. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un diodo emisor de luz (LED) con polarización inversa. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un fotorresistor. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un fototransistor. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir una célula fotovoltaica. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un tubo fotomultiplicador. Como otro ejemplo más, el detector óptico 1051 puede incluir un fotoconductor de punto cuántico o fotodiodo. Cualquier otro dispositivo adecuado configurado para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos (o no recibidos) puede incluirse en el detector óptico 1051.

El circuito de detección 1050 puede incluir cualquier combinación adecuada de hardware y software en comunicación operativa con el detector óptico 1051 para recibir la señal eléctrica o basada en fibra óptica del mismo, y configurado para detectar la subunidad 1021' del polímero 1020 en función de dicha señal, por ejemplo, basado en el detector óptico 1051 que detecta uno o más fotones de moléculas quimioluminiscentes excitadas 1040'. Por ejemplo, el circuito de detección 1050 puede incluir una memoria y un procesador acoplado a la memoria (no ilustrado específicamente). La memoria también puede almacenar datos sobre acoplamientos entre subunidades de polímeros y catalizadores, por ejemplo, datos que indican que se puede esperar que se emitan fotones si está presente la subunidad 121'. La memoria puede almacenar instrucciones para hacer que el procesador reciba la señal del detector óptico 1051 y para detectar la subunidad 1021' basada en el mismo. Por ejemplo, las instrucciones pueden hacer que el procesador determine, en base a la señal del detector óptico 1051, que se están emitiendo fotones dentro del campo de visión del detector óptico 1051; que determine, en base a los datos, que se puede esperar que se emitan fotones si está presente la subunidad 1021'; y que determine, en base a ambas de esas determinaciones, que la subunidad 1021' está presente.

También se pueden incluir instrucciones y datos más complejos en la memoria del circuito de detección. Por ejemplo, en realizaciones como las descritas anteriormente con referencia a las FIGS. 7-9, en las que el polímero incluye un segundo polinucleótido que se hibrida con un primer polinucleótido a secuenciar, la memoria del circuito de detección 1050 puede almacenar instrucciones que hacen que el procesador controle o monitoree de otra forma de manera apropiada la exposición del segundo nucleótido a nucleótidos, catalizadores, apantalladores, moléculas quimioluminogénicas o moléculas de corte o cualquier combinación de los mismos en las etapas apropiadas durante el método 700 ilustrado en la FIG. 7 o durante el método 900 ilustrado en la FIG. 9. Por ejemplo, el procesador puede estar en comunicación operativa con uno o más dispensadores de nucleótidos, catalizadores, apantalladores, moléculas quimioluminogénicas o moléculas de corte para controlar o monitorizar un momento o cantidad de exposición del segundo nucleótido a dichos nucleótidos, catalizadores, apantalladores, moléculas quimioluminogénicas o moléculas de corte. La memoria también puede almacenar datos sobre acoplamientos entre diferentes nucleótidos y catalizadores o apantalladores, y datos que indican que se puede esperar que los fotones se emitan o estén ausentes después de la exposición a dichos catalizadores o apantalladores o después de la exposición a moléculas de corte, si está presente un nucleótido en particular.

El sistema alternativo 1000' ilustrado en la FIG. 10B incluye el sustrato alternativo 1010', polímero 1020 que incluye una pluralidad de subunidades 1021 y acoplado a la superficie 1011 del sustrato 1010, catalizador 1030 acoplado a la subunidad seleccionada 1021' y circuitería alternativa configurada para detectar fotones emitidos por moléculas quimioluminogénicas 1040 con las que puede ponerse en contacto el sistema 1000. En la realización ilustrada, la circuitería alternativa incluye el circuito de detección alternativo 1050' y el detector óptico alternativo 1051' dispuesto en el sustrato alternativo 1010'. El detector óptico alternativo 1051' está configurado para generar una señal eléctrica basada en la emisión de fotones o la ausencia de fotones dentro del campo de visión del detector óptico 1051', ilustrado esquemáticamente en la FIG. 10B usando las líneas de punto de guion, y para proporcionar dicha señal eléctrica al circuito de detección 1050' para su análisis. Por ejemplo, el circuito de detección 1050' puede configurarse para detectar la presencia de la subunidad 1021' del polímero 1020 en base a la detección de fotones (o ausencia de los mismos) emitidos por las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 1040' a medida que se desintegran en moléculas en estado fundamental 1040" con la emisión de fotones, representada por la flecha y λ .

El circuito de detección alternativo 1050' y el detector óptico alternativo 1051' respectivamente pueden configurarse sustancialmente de manera análoga al circuito de detección 1050 y el detector óptico 1051 descritos anteriormente con referencia a la FIG. 10A. En una realización ilustrativa, el detector óptico 1051' puede incluir un sensor de píxeles activos (APS) que incluye una matriz de fotodetectores amplificados configurados para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos por los fotodetectores. Los APS se pueden basar en la tecnología complementaria de semiconductores de óxido de metal (CMOS) conocida en la técnica. Los detectores basados en CMOS pueden incluir transistores de efecto de campo (FET), por ejemplo, transistores de efecto de campo de semiconductores de óxido de metal (MOSFET). En otra realización ilustrativa, el detector óptico 1051' puede incluir un CCD.

Debe apreciarse que los sistemas 1000 y 1000' pueden adaptarse fácilmente para su uso con apantalladores, por ejemplo, tal como se describe anteriormente con referencia a las FIGS. 3, 4, 6A-6B y 9. Además, debe apreciarse que los sistemas 1000 y 1000' pueden modificarse adecuadamente para detectar subunidades de una pluralidad de polímeros usando quimioluminiscencia en paralelo entre sí. Por ejemplo, las FIGS. 11A-11B ilustran esquemáticamente sistemas que incluyen circuitería de detección configurada para detectar la presencia de subunidades de polímeros en matrices de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción.

El sistema 1100 ilustrado en la FIG. 11A incluye el sustrato 1110, una pluralidad de polímeros 1120 que cada uno puede incluir una subunidad respectiva 1121 y acoplada a la superficie 1111 del sustrato 1110, un catalizador (no ilustrado específicamente) acoplado a la subunidad seleccionada 1121 y circuitería configurada para detectar fotones emitidos por moléculas quimioluminogénicas (no ilustrado específicamente) con el cual se puede poner en contacto el sistema 1100. En la realización ilustrada, la circuitería incluye el circuito de detección 1150, y una pluralidad de detectores ópticos 1151 dispuestos a una distancia espaciada del sustrato 1110 y en comunicación operativa con el circuito de detección 1150. Los detectores ópticos 1151 están configurados para generar una señal eléctrica basada en la emisión de fotones o ausencia de fotones dentro del campo de visión de ese detector óptico 1151, ilustrado esquemáticamente en la FIG. 11A usando las líneas de punto de guion y para proporcionar dicha señal eléctrica al circuito de detección 1150 para su análisis. Por ejemplo, el circuito de detección 1150 puede configurarse para detectar la presencia de la subunidad 1121 de cada polímero 1120 en base a la detección de fotones (o ausencia de los mismos) emitidos por moléculas quimioluminogénicas en estado excitado (no ilustradas específicamente) a medida que se desintegran en moléculas en estado fundamental con emisión de fotones. El circuito de detección 1150 y los detectores ópticos 1151, respectivamente, pueden configurarse sustancialmente de forma análoga como circuito de detección 1050 y detector óptico 1051 descritos anteriormente con referencia a la FIG. 10A. La memoria del circuito de detección 1150 puede incluir instrucciones que hacen que el procesador del circuito de detección 1150 reciba una señal respectiva de cada detector óptico 1151 y detecte la presencia de la subunidad 1121 en cada polímero 1120.

Obsérvese que se puede proporcionar cualquier número adecuado de detectores ópticos 1151 para facilitar la detección de subunidades de polímeros 1120 ilustrados en la FIG. 11A. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede incluir una pluralidad de detectores ópticos 1151, cada uno correspondiente a un polímero respectivo 1120. En otras realizaciones, se puede incluir una pluralidad de detectores ópticos 1151, cada uno correspondiente a una pluralidad de polímeros 1120. Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 11A, uno o más de los detectores ópticos 1151 pueden incluir una pluralidad de polímeros 1120 dentro de su campo de visión. En otras realizaciones más, se puede incluir un solo detector óptico 1151, que incluye cada uno de los polímeros 1120 dentro de su campo de visión.

El sistema alternativo 1100' ilustrado en la FIG. 11B incluye el sustrato 1110', una pluralidad de polímeros (no ilustrados específicamente) que cada uno puede incluir una subunidad respectiva 1121 y acoplada a la superficie del sustrato alternativo 1110', un catalizador (no ilustrado específicamente) acoplado a la subunidad 1121 seleccionada, y circuitería configurada para detectar fotones emitidos por moléculas quimioluminogénicas (no ilustradas específicamente) con las que se puede poner en contacto el sistema 1100'. En la realización ilustrada, la circuitería incluye el circuito de detección 1150', y una pluralidad de detectores ópticos 1151' dispuestos en el sustrato 1110' y en comunicación operativa con el circuito de detección 1150'. Los detectores ópticos 1151' están configurados cada uno para generar una señal eléctrica basada en la emisión de fotones o la ausencia de fotones dentro del campo de visión de ese detector óptico 1151', ilustrado esquemáticamente en la FIG. 11B usando las líneas de punto de guion, y para proporcionar dicha señal eléctrica al circuito de detección 1150' para su análisis. Por ejemplo, el circuito de detección 1150' puede configurarse para detectar la presencia de la subunidad 1121 de cada polímero basado en la detección de fotones (o ausencia de los mismos) emitidos por moléculas quimioluminogénicas en estado excitado (no ilustradas específicamente) a medida que se desintegran en moléculas en estado fundamental con la emisión de fotones. El circuito de detección 1150' y los detectores ópticos 1151' respectivamente pueden configurarse sustancialmente de forma análoga al circuito de detección 1050' y detector óptico 1051' descritos anteriormente con referencia a la FIG. 10B. En una realización ilustrativa, cada detector óptico 1151' puede incluir un sensor de píxeles activos (APS) que incluye una matriz de fotodetectores amplificados configurados para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos por los fotodetectores. Los APS se pueden basar en la tecnología complementaria de semiconductores de óxido de metal (CMOS) conocida en la técnica. Los detectores basados en CMOS pueden incluir transistores de efecto de campo (FET), por ejemplo, transistores de efecto de campo de semiconductores de óxido de metal (MOSFET). En otra realización ilustrativa, cada detector óptico 1151' puede incluir un CCD. La memoria del circuito de detección 1150' puede incluir instrucciones que hacen que el procesador del circuito de detección 1150' reciba una señal respectiva de cada detector óptico 1151' y detecte la presencia de la subunidad 1121 en cada polímero.

Obsérvese que se puede proporcionar cualquier número adecuado de detectores ópticos 1151' para facilitar la detección de las subunidades 1121 de los polímeros ilustrados en la FIG. 11B. Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 11B, en algunas realizaciones, se puede incluir una pluralidad de detectores ópticos 1151', cada uno correspondiente a un polímero respectivo. En otras realizaciones, se puede incluir una pluralidad de detectores ópticos 1151', cada uno correspondiente a una pluralidad de polímeros. O, por ejemplo, uno o más de los detectores ópticos 1151' pueden incluir una pluralidad de polímeros dentro de su campo de visión. En otras realizaciones más, se puede incluir un solo detector óptico 1151', que incluye cada uno de los polímeros dentro de su campo de visión. Además, debe apreciarse que los sistemas 1100 y 1100' se pueden adaptar fácilmente para su uso con apantalladores, por ejemplo, tal como

se describe anteriormente con referencia a las FIGS. 3, 4, 6A-6B y 9.

En una realización ilustrativa, el detector óptico 1151' puede incluir un sensor de píxeles activos (APS) que incluye una matriz de fotodetectores amplificados configurados para generar una señal eléctrica basada en fotones recibidos por los fotodetectores. Los APS se pueden basar en la tecnología complementaria de semiconductores de óxido de metal (CMOS) conocida en la técnica. Los detectores basados en CMOS pueden incluir transistores de efecto de campo (FET), por ejemplo, transistores de efecto de campo de semiconductores de óxido de metal (MOSFET). En otra realización ilustrativa, el detector óptico 1051' puede incluir un CCD.

Tiempo de vida ejemplar y efectos catalíticos

Obsérvese que los tiempos de vida respectivos de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado pueden afectar si esas moléculas están dentro del campo de visión de un detector óptico apropiado, por ejemplo, el detector 1051, 1051', 1151 o 1151' ilustrados respectivamente en las FIGS. 10A, 10B, 11A u 11B. Por ejemplo, si el tiempo de vida es relativamente largo, entonces las moléculas en estado excitado pueden transportarse (por ejemplo, por difusión o por flujo direccional) fuera del campo de visión del detector óptico antes de emitir un fotón. En algunas realizaciones, el campo de visión del detector óptico y las moléculas quimioluminogénicas se coseleccionan de manera tal que los tiempos de vida respectivos de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado son lo suficientemente cortos como para emitir fotones sustancialmente dentro del campo de visión de un detector óptico apropiado. En una realización ilustrativa no limitante, la molécula quimioluminogénica se selecciona de modo que tenga un tiempo de vida en estado excitado del orden de μs , dando como resultado una extensión espacial de emisión de aproximadamente 500 nm o menos en condiciones de difusión a temperatura ambiente. Por ejemplo, se puede esperar que el luminol tenga un tiempo de vida en estado excitado que dé como resultado una extensión espacial de emisión de aproximadamente 200-400 nm en condiciones de difusión a temperatura ambiente.

Además, como se mencionó adicionalmente más arriba, los catalizadores proporcionados en la presente memoria pueden interactuar con una pluralidad de moléculas quimioluminogénicas (que también pueden denominarse emisores), causando así la emisión de una pluralidad correspondiente de fotones e incrementando así la detectabilidad de una subunidad de polímero. La relación señal/ruido (S/N), o SNR, de una señal tal como puede ser generada por un detector óptico apropiado, por ejemplo, el detector 1051, 1051', 1151 o 1151', se puede expresar de la siguiente manera:

$$SNR = \frac{N(t/\tau)Q_rQ_cQ_e}{\sqrt{N(t/\tau)(1+X)Q_rQ_cQ_e + Dt + N_r^2}}$$

dónde N es el número de polinucleótidos idénticos (clonales) a los que se agrega un nucleótido seleccionado; t es el tiempo de integración del sensor óptico (que también puede denominarse tiempo de adquisición de datos); τ es el tiempo de recambio del catalizador (que también se puede denominar la inversa de la tasa de recambio del catalizador y tiene unidades de tiempo); la relación t/τ puede referirse como el recambio del emisor, por ejemplo, cuántas veces se recambia el catalizador durante el tiempo de integración; Q_r es la eficiencia de reacción de la reacción catalítica, por ejemplo, la fracción de interacciones catalíticas entre el catalizador y la molécula quimioluminogénica que causan la emisión de un fotón; Q_c es la eficiencia de recolección del sensor óptico, por ejemplo, la fracción de fotones emitidos que son capturados por el sensor óptico; Q_e es la denominada eficiencia cuántica del sensor óptico, por ejemplo, la fracción de fotones recibidos por el sensor que produce una señal eléctrica; X es la comunicación cruzada entre sensores ópticos, por ejemplo, la fracción de fotones que recibió un sensor óptico no deseado; D es la corriente oscura del sensor óptico; y N_r es el ruido de lectura (ruido electrónico) del sensor óptico.

La FIG. 12 ilustra una gráfica de la relación S/N calculada en función del recambio para moléculas quimioluminogénicas (emisores) que tienen diferentes eficiencias cuánticas entre sí, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. Las relaciones S/N ilustradas en la FIG. 12 se basaron en una suposición de $N = 1.000$, $t = 1$ segundo, $Q_c = 30\%$, $Q_e = 40\%$, $X = 50\%$, $N_r = 5$ electrones/segundo, $D = 15$ electrones/segundo, y $Q_r = 1\%$, 2% , 5% , 10% , 20% , 50% o 100% . El valor de τ se varió entre 1 segundo y 0,001 segundos de tal manera que el recambio del emisor (la relación t/τ , correspondiente al eje x de la FIG. 12) variaba entre 1 y 1.000. Para lograr una relación S/N de aproximadamente 30 o más en un solo marco (señal única), se puede entender a partir de la FIG. 12 que al menos 1% de eficiencia de reacción (Q_r) con un tiempo de recambio catalítico τ de aproximadamente 1,0 ms o menos puede ser útil. Además, se puede entender a partir de la FIG. 12 que incluso para moléculas quimioluminogénicas que tienen una eficiencia de reacción (Q_r) del 100% , un recambio de emisor mayor de 10 puede ser útil para lograr una relación S/N de aproximadamente 30 o mayor en un solo marco (señal única). Sin embargo, debe apreciarse que se pueden usar adecuadamente otras relaciones S/N. En un ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 5 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 10 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 15 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 20 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 25 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 30 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de

aproximadamente 35 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 40 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 45 o más. En otro ejemplo no limitante, se puede usar adecuadamente una relación S/N de aproximadamente 50 o más.

5 Ejemplos

Ahora, se describirán algunos resultados ejemplares obtenidos usando diferentes catalizadores y moléculas quimioluminogénicas con polinucleótidos con referencia a las FIGS. 13A-15.

En un ejemplo, las FIGS. 13A-13E ilustran imágenes obtenidas durante un método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción. Se acoplaron una pluralidad de polinucleótidos a una superficie de sustrato, en donde al menos algunos de los polinucleótidos incluían secuencias diferentes entre sí. Se hibridó un segundo polinucleótido con cada uno de los polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato. Los polinucleótidos se pusieron en contacto con una polimerasa y con una solución que incluía los nucleótidos A, G, T y C. De estos, solo el nucleótido C se acopló a un resto de biotina. Dependiendo de la secuencia del polinucleótido particular acoplado a la superficie del sustrato, se añadió A, G, T o C al polinucleótido hibridado con ese polinucleótido particular, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 701-704 de método 700 ilustrado en la FIG. 7. La polimerasa y los nucleótidos sin reaccionar se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se expusieron entonces a una solución que incluía peroxidasa de rábano picante (HRP) acoplada a un resto de estreptavidina de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 705 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Para los polinucleótidos a los que se había añadido el nucleótido C, el resto de biotina de ese nucleótido C se acopló al resto de estreptavidina de HRP, acoplando así la HRP a ese nucleótido C. El exceso de HRP se eliminó por lavado. Los polinucleótidos se expusieron entonces a la molécula quimioluminogénica luminol de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706 del método 700 ilustrado en la FIG. 7.

Posteriormente, la HRP se escindió del nucleótido C, la HRP escindida y el luminol se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se pusieron nuevamente en contacto con una polimerasa y con una solución que incluía los nucleótidos A, G, T y C, nuevamente solo con el nucleótido C acoplado a un resto de biotina. Dependiendo de la secuencia del polinucleótido particular acoplado a la superficie del sustrato, se añadió A, G, T o C al polinucleótido hibridado con ese polinucleótido particular. Debido a que las secuencias de los diversos polinucleótidos eran diferentes entre sí, el nucleótido C puede haberse añadido a diferentes polinucleótidos que en el ciclo anterior. La polimerasa y los nucleótidos sin reaccionar se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se expusieron entonces a una solución que incluía peroxidasa de rábano picante (HRP) acoplada a un resto de estreptavidina de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 705 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Para los polinucleótidos a los que se había añadido el nucleótido C, el resto de biotina de ese nucleótido C se acopló al resto de estreptavidina de HRP, acoplando así la HRP a ese nucleótido C. El exceso de HRP se eliminó por lavado. Los polinucleótidos se expusieron entonces a la molécula quimioluminogénica luminol de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Tales ciclos de adición de nucleótidos, acoplamiento del nucleótido C a HRP y exposición de los polinucleótidos al luminol se repitieron varias veces.

Las imágenes ilustradas en las FIGS. 13A-13E se obtuvieron usando una cámara CCD dispuesta a una distancia espaciada del sustrato de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 10A y 11A. La cámara CCD detectó fotones emitidos como resultado de interacciones entre el luminol y la HRP de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707 ilustrada en la FIG. 7. La ganancia de la cámara CCD fue igual a 10, y el tiempo de integración t para cada imagen fue de aproximadamente 1 segundo. La imagen ilustrada en la FIG. 13A corresponde a un primer ciclo tal como se describió anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 13A corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. La imagen ilustrada en la FIG. 13B corresponde a un segundo ciclo tal como se describe anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 13B corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 13B están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en la FIG. 13A.

La imagen ilustrada en la FIG. 13C corresponde a un tercer ciclo como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 13C corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 13C están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en la FIG. 13A o la FIG. 13B. La imagen ilustrada en la FIG. 13D corresponde a un cuarto ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 13D corresponden a ubicaciones en las que se agregó un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para

polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 13D están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en las FIGS. 13A, 13B o 13C.

5 La imagen ilustrada en la FIG. 13E corresponde a un ciclo de "reinicio" que sigue al primer, segundo, tercer y cuarto ciclos. Durante el ciclo de "reinicio", los polinucleótidos que se hibridaron con el polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato se eliminaron por lavado, y posteriormente se realizó un primer ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 13E corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos
10 acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que las secuencias de los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato permanecieron constantes entre los ciclos primero a cuarto y el ciclo de reinicio, se esperaría que los puntos brillantes resultantes del ciclo de reinicio estuvieran aproximadamente en la misma ubicación que en la FIG. 13A, que parece ser el caso.

15 En otro ejemplo, las FIGS. 14A-14E ilustran imágenes obtenidas durante otro método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción. Se acoplaron una pluralidad de polinucleótidos a una superficie de sustrato, en donde al menos algunos de los polinucleótidos incluían secuencias diferentes entre sí. Se hibridó un segundo polinucleótido con cada uno de los polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato. Los polinucleótidos se pusieron en contacto entonces con una polimerasa y con una solución que incluía los nucleótidos A, G, T y C. De estos, solo el nucleótido
20 C se acopló a un resto de biotina. Dependiendo de la secuencia del nucleótido particular acoplado a la superficie del sustrato, se añadió A, G, T o C al polinucleótido hibridado con ese polinucleótido particular, de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las etapas 701-704 de método 700 ilustrado en la FIG. 7. La polimerasa y los nucleótidos sin reaccionar se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se expusieron entonces a una solución que incluye luciferasa de Gaussia acoplada a un resto de estreptavidina de manera análoga a la descrita anteriormente
25 con referencia a la etapa 705 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Para los polinucleótidos a los que se había añadido el nucleótido C, el resto de biotina de ese nucleótido C se acopló al resto de estreptavidina de la luciferasa de Gaussia, acoplando así la luciferasa de Gaussia al nucleótido C. El exceso de luciferasa de Gaussia se eliminó por lavado. Los polinucleótidos se expusieron entonces a la molécula quimioluminogénica d-luciferina de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706 del método 700 ilustrado en la FIG. 7.

30 Posteriormente, la luciferasa de Gaussia se escindió del nucleótido C, la luciferasa de Gaussia escindida y la d-luciferina se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se pusieron nuevamente en contacto con una polimerasa y con una solución que incluía los nucleótidos A, G, T y C, nuevamente solo con el nucleótido C acoplado a un resto de biotina. Dependiendo de la secuencia del polinucleótido particular acoplado a la superficie del sustrato, se añadió A, G, T o C al polinucleótido hibridado con ese polinucleótido particular. Debido a que las secuencias de los diversos
35 polinucleótidos fueron diferentes entre sí, el nucleótido C puede haberse añadido a diferentes polinucleótidos que en el ciclo anterior. La polimerasa y los nucleótidos sin reaccionar se eliminaron por lavado, y los polinucleótidos se expusieron entonces a una solución que incluía luciferasa de Gaussia acoplada a un resto de estreptavidina de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 705 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Para los polinucleótidos a los que se había añadido el nucleótido C, el resto de biotina de ese nucleótido C se acopló al resto de estreptavidina de la luciferasa de Gaussia, acoplando así la luciferasa de Gaussia a ese nucleótido C. Entonces,
40 se eliminó por lavado el exceso de luciferasa de Gaussia. Los polinucleótidos se expusieron entonces a la molécula quimioluminogénica d-luciferina de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 706 del método 700 ilustrado en la FIG. 7. Tales ciclos de adición de nucleótidos, acoplamiento del nucleótido C a la luciferasa de Gaussia y exposición de los polinucleótidos a la d-luciferina se repitieron varias veces.

45 Las imágenes ilustradas en las FIGS. 14A-14E se obtuvieron usando una cámara CCD dispuesta a una distancia espaciada del sustrato de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 10A y 11A. La cámara CCD detectó fotones emitidos como resultado de interacciones entre la d-luciferina y la luciferasa de Gaussia de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a la etapa 707 ilustrada en la FIG. 7. La ganancia de la cámara CCD fue igual a 8, y el tiempo de integración t para cada imagen fue de aproximadamente 1 segundo. La
50 imagen ilustrada en la FIG. 14A corresponde a un primer ciclo tal como se describe anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 14A corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. La imagen ilustrada en la FIG. 14B corresponde a un segundo ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la
55 FIG. 14B corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 14B están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en la FIG. 14A.

60 La imagen ilustrada en la FIG. 14C corresponde a un tercer ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 14C corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a

la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 14C están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en la FIG. 14A o la FIG. 14B. La imagen ilustrada en la FIG. 14D corresponde a un cuarto ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 14D corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 14D están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en las FIGS. 14A, 14B o 14C.

La imagen ilustrada en la FIG. 14E corresponde a un quinto ciclo tal como se ha descrito anteriormente. Como tales, los puntos brillantes en la FIG. 14E corresponden a ubicaciones en las que se añadió un nucleótido C al polinucleótido que se hibridó con otro polinucleótido acoplado a la superficie del sustrato, es decir, para polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato para los que el siguiente nucleótido en la secuencia era G. Debido a que los diversos polinucleótidos acoplados a la superficie del sustrato tienen secuencias diferentes entre sí, se puede ver que al menos algunos de los puntos brillantes en la FIG. 14E están en ubicaciones diferentes que los puntos brillantes en las FIGS. 14A, 14B, 14C o 14D.

La FIG. 15A ilustra una imagen obtenida durante otro método ilustrativo para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción. Más específicamente, la imagen se obtuvo de manera análoga a la descrita anteriormente con referencia a las FIGS. 14A-14E, por ejemplo, acoplando el nucleótido C a la luciferasa de *Gaussia* y exponiendo los polinucleótidos a la d-luciferina. La FIG. 15B ilustra una gráfica de la intensidad de píxeles en función de la distancia en la imagen de la FIG. 15A, de acuerdo con una realización ejemplar de la presente descripción. Más específicamente, las intensidades (valores grises) de los píxeles que se encuentran aproximadamente a lo largo de la línea de puntos ilustrada en la FIG. 15A se representaron gráficamente en función de la distancia. Se puede ver que los píxeles correspondientes a los tres puntos brillantes tenían intensidades de aproximadamente 2.500-2.700 unidades. Sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que las regiones de la FIG. 15B que tienen intensidades de menos de aproximadamente 500 unidades, o menos de aproximadamente 400 unidades, corresponden a regiones sin quimioluminiscencia significativa y, por lo tanto, pueden corresponder al ruido. Como tal, se puede estimar que la relación S/N de las intensidades de los tres puntos brillantes con respecto al ruido están en el rango de aproximadamente 5 a 6,75 en este ejemplo. Por lo tanto, puede entenderse que incluso con relaciones S/N relativamente bajas, por ejemplo, de aproximadamente 5, puede obtenerse fácilmente información utilizable sobre la secuencia de un nucleótido. Además, sin desear estar limitado por ninguna teoría, se cree que las regiones de la FIG. 15B que tienen intensidades de entre aproximadamente 500 unidades y aproximadamente 1.000 unidades corresponden a regiones con bajos niveles de quimioluminiscencia que no se corresponden necesariamente con ubicaciones en las que se ha añadido el nucleótido C a un polinucleótido.

Realizaciones alternativas adicionales

En una realización no limitante, el SBS basado en quimioluminiscencia se puede realizar usando una celda de flujo CMOS integrada. En un ejemplo no limitante, los nucleótidos y las formas modificadas de luciferasa se pueden acoplar entre sí a través de restos de hapteno, y usarse para la discriminación de nucleótidos (detección de nucleótidos) en un esquema de secuenciación de SBS quimioluminiscente. Pero debe apreciarse que se pueden usar otros catalizadores, por ejemplo, como se describe en otra parte de la presente memoria. Por ejemplo, se puede acoplar un catalizador a un nucleótido que se ha incorporado en un polinucleótido, por ejemplo, mediante restos de hapteno, y se puede usar una solución de moléculas quimioluminogénicas para la discriminación de nucleótidos en un esquema de secuenciación SBS quimioluminiscente. Alternativamente, el catalizador se puede inmovilizar en sitios de una celda de flujo con patrón y los nucleótidos acoplarse a apantalladores de quimioluminiscencia, por ejemplo, a través de restos de hapteno. En otro ejemplo más, el catalizador se puede unir a un primer nucleótido, tal como un cebador de secuenciación, y los nucleótidos acoplarse a apantalladores de luminiscencia, por ejemplo, a través de restos de hapteno. También se proporcionan composiciones, sistemas y métodos para SBS basado en quimioluminiscencia en un actuador de gotas.

La FIG. 16 ilustra una vista lateral en sección transversal de un ejemplo de una celda de flujo 1600 que se utiliza para proporcionar un esquema SBS luminiscente sustancialmente libre de iluminación, es decir, SBS que no necesariamente debe incluir el uso de una fuente de iluminación, sino que puede usar luz emitido por moléculas quimioluminogénicas en estado excitado para detectar la presencia de nucleótidos en un polinucleótido. La celda de flujo 1600 puede incluir una celda de flujo CMOS integrada que puede estar libre de iluminación. Por ejemplo, la celda de flujo 1600 está diseñada para generar quimioluminiscencia espacialmente localizada a partir de moléculas quimioluminogénicas en estado excitado, y para detectar dicha quimioluminiscencia utilizando un sensor CMOS integrado sin la necesidad de una fuente de iluminación separada, tal como un láser o una lámpara.

En la realización no limitativa ilustrada en la FIG. 16, la celda de flujo 1600 incluye un sustrato inferior 1610 y un sustrato superior 1612 que están separados entre sí por espaciadores 1614. El sustrato inferior 1610 puede incluir, por ejemplo, un sustrato de vidrio, sustrato plástico, sustrato CMOS u otro sustrato adecuado. En un ejemplo no

limitante, el sustrato 1610 incluye un sustrato de dióxido de silicio (SiO_2) al que está acoplado el circuito CMOS 1640. El sustrato superior 1612 puede incluir, por ejemplo, un sustrato de vidrio, sustrato de plástico u otro sustrato adecuado. En un ejemplo no limitativo, el sustrato superior 1612 tiene un grosor de aproximadamente 0,4 mm, aunque pueden usarse otros grosores adecuados, por ejemplo, un grosor entre aproximadamente 0,1 mm y aproximadamente 2 mm, o entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 1 mm. En un ejemplo no limitativo, los espaciadores 1614 incluyen espaciadores adhesivos que tienen una altura de aproximadamente 100 μm , aunque se pueden usar otros grosores adecuados, por ejemplo, un grosor entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 1 mm, o entre aproximadamente 50 μm y aproximadamente 500 μm . En consecuencia, hay un espacio entre el sustrato inferior 1610 y el sustrato superior 1612, que forma, por ejemplo, una cámara de secuenciación 1616 en la celda de flujo 1600. La cámara de secuenciación 1616 puede incluir un canal de flujo que es suministrado por entradas o salidas 1618 que están definidas, por ejemplo, a través del sustrato superior 1612, aunque debe apreciarse que las entradas o salidas 1618 pueden definirse adecuadamente en, a través o entre uno o más de sustrato 1610, sustrato 1612 o espaciadores 1614. El líquido puede fluir hacia adentro o hacia afuera de la cámara de secuenciación 1616 usando cualquier combinación adecuada de entradas o salidas 1618. Además, la celda de flujo 1600 se puede diseñar en patrones para definir una o más cámaras de secuenciación 1616, cada una de las cuales puede tener una o más entradas o salidas correspondientes 1618 y se puede configurar para recibir uno o más cebadores de nucleótidos 1622 correspondientes, tal como se describe adicionalmente más adelante.

En ciertas realizaciones, se puede disponer una capa hidrófila 1620 sobre, o se puede proporcionar como parte de, el sustrato inferior 1610 y al menos parcialmente ubicada dentro de la cámara de secuenciación 1616. La capa hidrófila 1620 puede incluir cualquier material hidrófilo adecuado para conducir la química de SBS basada en la superficie en la celda de flujo 1600. La capa hidrófila 1620 puede tener un grosor, por ejemplo, de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm de grosor, aunque se pueden usar adecuadamente otros grosores, por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1 mm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 20 μm , o de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm. En un ejemplo, la capa hidrófila 1620 incluye un recubrimiento de gel de poliacrilamida, tal como una mezcla de norborneno (o norbornileno o norcanfeno) y poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida), también conocido como PAZAM. En otro ejemplo, la capa hidrófila 1620 incluye poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida-co-acrilonitrilo), también conocida como PAZAM-PAN. En algunas realizaciones, el PAZAM y/o el PAZAM-PAN se pueden modificar para que respondan térmicamente, formando así un gel de poliacrilamida que responde térmicamente. Se pueden encontrar más detalles sobre PAZAM con referencia a George et al., Publicación de Patente de EE. UU. No. 2014/0079923.

Una pluralidad de cebadores oligonucleotídicos 1622 se inmovilizan en la capa hidrófila 1620 en la cámara de secuenciación 1616. Los cebadores oligonucleotídicos 1622 pueden incluir cebadores de captura a los que se pueden hibridar y amplificar fragmentos de ADN monocatenarios para formar grupos de moldes de ADN clonales para SBS. Los fragmentos de ADN monocatenarios pueden definir un primer polinucleótido a secuenciar; un segundo polinucleótido se puede hibridar con el primer polinucleótido y añadir nucleótidos al segundo polinucleótido en base a la secuencia del primer polinucleótido. Las identidades de tales nucleótidos del segundo polinucleótido se pueden determinar, por ejemplo, usando una o más de las composiciones, sistemas y métodos proporcionados en la presente memoria.

En la realización ilustrada en la FIG. 16, la celda de flujo ejemplar 1600 también incluye un dispositivo CMOS, tal como un sensor de imagen CMOS 1640 que está acoplado mecánicamente y ópticamente a, o se proporciona como parte de, el sustrato inferior 1610. El sensor de imagen CMOS 1640 puede incluir una matriz de píxeles 1642 que respectivamente están dirigidos hacia uno correspondiente de los cebadores de oligonucleótidos 1622. El sensor de imagen CMOS 1640 puede incluir, por ejemplo, cualquier sensor de imagen CMOS estándar. En un ejemplo, el sensor de imagen CMOS 1640 se puede montar en, acoplar a, o proporcionar como parte de una placa de circuito impreso (PCB) 1650.

En la celda de flujo 1600, la señal generada por la reacción SBS se genera por quimioluminiscencia y no necesita necesariamente radiación de excitación. La falta de radiación de excitación puede obviar la necesidad de un filtro de bloqueo y cortinas de luz, por lo tanto, simplificando en gran medida la estructura de la celda de flujo CMOS integrada (por ejemplo, celda de flujo 1600) y eliminando una responsabilidad significativa de los diseños basados en fotoluminiscencia basados en fluorescencia, que pueden requerir un filtro de bloqueo de la luz para reducir la radiación de fondo de una fuente de luz de excitación, y también la necesidad de proteger ese filtro de la química de secuenciación. Por lo tanto, en comparación con las celdas de flujo basadas en fotoluminiscencia que pueden incluir filtros de bloqueo de la luz complejos y cortinas de luz y una fuente de iluminación, un aspecto de la celda de flujo 1600 es que utiliza un esquema de detección basado en quimioluminiscencia, que en algunas realizaciones puede presentar ausencia de filtros de bloqueo, pocas o ninguna cortina de luz y la ausencia de fuentes de iluminación, lo que proporciona de esta manera un diseño relativamente más simple y de menor costo que se puede utilizar en SBS.

En algunas realizaciones, el catalizador fotoluminiscente es la luciferasa de *Gaussia*. Por ejemplo, en una reacción ejemplar, la luciferasa de *Gaussia* cataliza la oxidación del sustrato quimioluminogénico coelenterazina a coelenteramida en una reacción que produce luz y dióxido de carbono. La coelenteramida es la molécula emisora de luz que se encuentra en muchos organismos acuáticos en siete filos. La enzima luciferasa de *Gaussia* se puede proporcionar en dos formas modificadas (1) un tipo "flash" y (2) un tipo "brillante", puede tener una eficiencia cercana al 90%. Como tal, la enzima luciferasa de *Gaussia* puede usarse para la discriminación de nucleótidos en un esquema

de secuenciación de SBS quimioluminiscente, tal como se describe en la presente memoria, por ejemplo, con referencia a las FIGS. 17 y 18.

La FIG. 17 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 1700 de discriminación de base en un esquema de secuenciación SBS quimioluminiscente utilizando, por ejemplo, la celda de flujo 1600 de la FIG. 16. La FIG. 18 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método 1700 de la FIG. 17. En una realización ilustrativa, el método 1700 usa nucleótidos completamente funcionalizados (ff) marcados con hapteno (ffa, fft, ffC y ffG), y enzimas "flash" y "brillantes" de luciferasa de Gaussia (Glu) marcadas con hapteno para la detección y discriminación de un evento de incorporación de nucleótidos. En un ejemplo no limitativo, el método 1700 utiliza fft (fft-DIG) marcado con digoxigenina (DIG) y Glu "brillante" marcada con un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) específico para DIG (por ejemplo, antiDIG-Glu (brillo)) para detectar la incorporación de fft, ffa marcado con Ni-NTA (ffa-NiNTA, donde NTA es ácido nitrilotiacético que, cuando se quela con Ni, se une a histidina) y Glu "flash" (His-Glu (flash)) marcada con histidina para detectar la incorporación de ffa, y ffC marcado con biotina (ffC-biotina) y Glu "brillante" marcado con estreptavidina (strep-Glu (brillante)) para detectar la incorporación de ffC. El nucleótido ffG puede ser "oscuro", por ejemplo, no es necesario que ffG se marque necesariamente para la detección. Otros esquemas de marcaje y otros pares de haptenos pueden ser análogos a los descritos en otra parte de la presente memoria. Con referencia ahora a la FIG. 17, el método 1700 incluye, pero no está limitado a, las siguientes etapas.

En la etapa 1710, los nucleótidos se incorporan respectivamente en polinucleótidos, por ejemplo, las cadenas complementarias en crecimiento, por ejemplo, se incorporan en un segundo polinucleótido hibridado con un primer polinucleótido que se hibrida con uno correspondiente de los cebadores de secuenciación 1622 ilustrados en la FIG. 16, usando una polimerasa (no ilustrada específicamente) en un ciclo SBS. El nucleótido incorporado en uno de dichos segundos polinucleótidos puede ser fft-DIG, ffa-NiNTA, ffC-biotina o ffG, dependiendo de la secuencia particular del primer polinucleótido correspondiente. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18. Debe apreciarse que los nucleótidos incorporados en diferentes segundos polinucleótidos pueden ser diferentes entre sí, en base a las diferentes secuencias de los primeros polinucleótidos.

En la etapa 1715, se realiza un primer proceso de tinción que incluye añadir un catalizador a, o eliminar un catalizador de, al menos un nucleótido incorporado. En un proceso de tinción ejemplar, se realiza la etapa 1715 usando antiDIG-Glu (brillante) e His-Glu (flash) para detectar la incorporación de nucleótidos A y T. Por ejemplo, una primera solución de tinción que incluye antiDIG-Glu (brillante) e His-Glu (flash) puede fluir a través de la celda de flujo 1600. La formación de complejos entre cualquier nucleótido fft-DIG incorporado y anti-DIG-Glu (brillante) tiñe selectivamente el grupo correspondiente con la forma de "brillante" de la enzima luciferasa de Gaussia. De manera similar, la formación de complejos entre los nucleótidos ffa-NiNTA incorporados e His-Glu (flash) tiñe selectivamente un grupo con la enzima luciferasa. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18.

En la etapa 1720, se captura una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo no limitante, se captura una primera imagen para la detección tanto de señales antiDIG-Glu (brillante) como His-Glu (flash). Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una primera imagen (p. ej., IMG1) para la detección tanto de señales antiDIG-Glu (brillante) como His-Glu (flash) durante o después del flujo de una solución de moléculas quimioluminogénicas apropiadas (por ejemplo, una solución de coelenterazina o derivado de coelenterazina) a través de la celda de flujo 1600 para generar una señal quimioluminiscente localizada. En un ejemplo no limitante, la primera imagen se captura utilizando un tiempo de integración de 1 segundo. La primera imagen captura tanto una señal de emisión flash generada por la formación de un complejo de unión ffa-NiNTA/His-Glu (flash) (correspondiente a la incorporación de un nucleótido A en un segundo polinucleótido correspondiente) como una señal de emisión de brillo generada por la formación de un complejo de unión fft-Dig/antiDIG-Glu (brillante) (correspondiente a la incorporación de un nucleótido T en un segundo polinucleótido correspondiente). Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18.

En la etapa 1725, se captura una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo no limitante, se captura una segunda imagen para discriminar la A incorporada de T. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una segunda imagen (por ejemplo, IMG2) para discriminar la A incorporada de T. La segunda la imagen se captura después del tiempo de integración ejemplar de 1 segundo utilizado para capturar la primera imagen. Obsérvese que la señal de emisión flash, correspondiente a la incorporación de un nucleótido A, tiene un tiempo de vida relativamente limitado, típicamente menos de un segundo. Posteriormente, la señal de emisión flash se puede extinguir después de la captura de la primera imagen y, como tal, en la segunda imagen, se captura sustancialmente solo la señal de emisión de brillo generada por la formación del complejo de unión fft-DIG/antiDIG-Glu (brillante) (correspondiente a la incorporación de un nucleótido T en un segundo polinucleótido correspondiente). Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18.

En la etapa 1730, se realiza un segundo proceso de tinción que incluye añadir un catalizador a, o eliminar un catalizador de, al menos un nucleótido incorporado. En un ejemplo, se realiza un segundo proceso de tinción que usa strep-Glu (brillante) para detectar la incorporación de un nucleótido C. Por ejemplo, una segunda solución de tinción que incluye strep-Glu (brillante) fluye a través de la celda de flujo 1600. La formación de complejos entre los nucleótidos de ffC-biotina incorporados y strep-Glu (brillante) tiñe selectivamente un grupo con la forma de "brillo" de la enzima luciferasa de Gaussia. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18.

En la etapa 1735, se captura una tercera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En una realización ilustrativa, se captura una tercera imagen para la detección de una señal de estrep-Glu (brillante) de los nucleótidos C incorporados además de la señal antiDIG-Glu (brillante) de los nucleótidos T incorporados. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una tercera imagen (por ejemplo, IMG3). Se detecta una nueva señal de brillo mediante la formación de un complejo de unión ffC-biotina/estrep-Glu (brillante) e indica la incorporación de un nucleótido C en un segundo polinucleótido correspondiente después o durante el flujo de una solución de moléculas quimioluminogénicas apropiadas a través de la celda de flujo 1600 para generar una señal quimioluminiscente localizada. La señal de brillo de la incorporación de un nucleótido T capturado previamente en las imágenes primera (etapa 1720) y segunda (etapa 1725) también se captura en esta tercera etapa de formación de imágenes. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18. Obsérvese que en algunas realizaciones, IMG3 se puede capturar después de un retraso mayor de aproximadamente 1 segundo después de la etapa 1730, de modo que cualquier señal flash resultante de la introducción adicional de las moléculas quimioluminogénicas se puede extinguir antes de la captura de IMG3, de modo que sustancialmente solo se incluyen las señales de brillo de la incorporación de C y T en IMG3. Alternativamente, se puede obtener IMG3 inmediatamente después de la etapa 1730, para capturar tanto la señal flash de la incorporación de A como las señales de brillo de la incorporación de C y T. A este respecto, obsérvese que dicha imagen se puede usar en lugar de, o además de, la primera imagen en la etapa 1720 que captura tanto señales de flash como de brillo; se puede obtener una imagen adicional, por ejemplo, una cuarta imagen, posteriormente, después de que se extinga la señal flash.

En la etapa 1740, las lecturas automáticas de nucleótidos se realizan utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera, segunda y tercera imagen. En este ejemplo, la incorporación de A se detecta como una señal de emisión flash, y la incorporación de T se detecta como una señal de emisión de brillo en la primera imagen y A se discrimina de T en la segunda imagen en base a la ausencia de la señal de emisión flash en la segunda imagen. La incorporación de C se detecta como una señal de brillo en la tercera imagen, y se discrimina de T en base a la ausencia de la señal de brillo de C en la primera imagen. La incorporación de G se determina en base a la falta de una señal de emisión en las imágenes 1 a 3. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18, en forma de una tabla de verdad en la que el "1" en cada fila significa que el nucleótido en esa columna corresponde a una señal brillante (ya sea de brillo o flash) en la imagen correspondiente.

En la etapa de decisión 1745, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1700 continúa con la etapa 1750. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1700 finaliza.

En una etapa 1750, se realiza una reacción de desbloqueo para eliminar un grupo de bloqueo en cada uno de los nucleótidos incorporados para facilitar la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. El método 1700 vuelve a la etapa 1710. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 18.

En otro ejemplo, la incorporación de un nucleótido C se detecta como una señal flash en la tercera imagen. En este ejemplo, se usa una enzima Estrep-Glu (flash) en la etapa 1730 y se usa un tiempo de integración ejemplar de 1 segundo en la etapa 1735.

En otro ejemplo, la quimioluminiscencia basada en luminol se puede usar para la secuenciación de SBS acoplando un catalizador (por ejemplo, HRP o un complejo Ni-NTA) a un nucleótido o nucleótidos completamente funcionalizados (ffN), por ejemplo, después de que el ffN se incorpore a un polinucleótido de una manera tal como se describe en otra parte de la presente memoria. Cada ffN genera múltiples átomos de oxígeno singlete que interactúan con el exceso de luminol en la celda de flujo para generar luz.

En una realización ilustrativa, la FIG. 19 muestra una porción de la celda de flujo 1600 de la FIG. 16 y representa un ejemplo de otro esquema de SBS 1900 quimioluminiscente no limitante, en el que se usa un catalizador acoplado a un nucleótido para generar una señal quimioluminiscente. En este ejemplo, las cadenas de molde de ADN 1910 (por ejemplo, las cadenas de molde de ADN 1910a y 1910b) formadas en un proceso de amplificación en racimo se inmovilizan en la capa hidrófila 1620 a través del cebador oligonucleotídico 1622 (no mostrado). La cadena de molde de ADN 1910a es una cadena de molde de un primer grupo clonal y la cadena de molde de ADN 1910b es una cadena de molde en un segundo grupo clonal. Hibridados a las cadenas de molde de ADN 1910 están los cebadores de secuenciación 1915, por ejemplo, segundos polinucleótidos a los que se puede añadir un nucleótido basado en la secuencia de la cadena molde de ADN correspondiente 1910a o 1910b.

En un ciclo de SBS ejemplar, los cebadores de secuenciación 1915 se extienden y se incorpora un nucleótido 1920 basado en la secuencia de la cadena molde de ADN 1910a y se incorpora un nucleótido 1925 basado en la secuencia de la cadena molde de ADN 1910b, por ejemplo, usando las polimerasas correspondientes (no específicamente ilustrado). El nucleótido 1925 está acoplado al catalizador 1930, por ejemplo, acoplado un resto acoplado al nucleótido 1925 a un resto acoplado al catalizador 1930. Una solución de moléculas quimioluminogénicas 1935 fluye en la celda de flujo 1600. En un ejemplo no limitante, las moléculas quimioluminogénicas 1935 incluyen luminol y el catalizador 1930 incluye un complejo de Ni-NTA biocompatible que es un catalizador para la reacción de luminol. El catalizador 1930 acoplado al nucleótido incorporado 1925 desencadena la descomposición de H_2O_2 (que puede fluir en la celda de flujo 1600, no se muestra) al oxígeno singlete (O) 1940 y agua (no se muestra). El O singlete 1940 reacciona con el exceso de moléculas quimioluminogénicas 1935, que generan luz que responde a la interacción con el O singlete. En ciertas realizaciones, la luz solo es generada por las moléculas quimioluminogénicas 1935 dentro de

una cierta distancia del catalizador 1930, por ejemplo, por las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 1935b. En base a los valores publicados, el radio aproximado de la zona de reacción (denotado por un círculo discontinuo) alrededor de cada centro de catalizador se estima en aproximadamente 200-400 nm. La luz de las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado emisoras 1935b dentro de la zona de reacción se puede recoger, por ejemplo, mediante un píxel 1642 correspondiente del sensor de imagen CMOS 1640. En este ejemplo, la emisión de luz se detecta sustancialmente solo en el píxel 1642 correspondiente cerca del molde de ADN 1910b con el nucleótido 1925 acoplado al catalizador 1930. Obsérvese que tal esquema de detección basado en quimioluminiscencia, una ausencia de radiación de excitación también puede reducir o eliminar una señal de fondo óptico y puede mejorar la relación señal/ruido (S/N) del sensor CMOS. Además, obsérvese que se pueden usar adecuadamente sensores ópticos que no sean sensores CMOS, tal como se describe en otra parte de la presente memoria.

La FIG. 20 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 2000 de discriminación de nucleótidos en un esquema de secuenciación de SBS quimioluminiscente usando, por ejemplo, la celda de flujo 1600 de la FIG. 16. La FIG. 21 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método 2000 de la FIG. 20. El método 2000 usa un catalizador acoplado a un nucleótido incorporado y una molécula quimioluminogénica para la detección y discriminación de un evento de incorporación de nucleótidos. Los catalizadores ejemplares pueden incluir, pero no están limitados a, catalizadores de Fe, Cu o Ni biomiméticos, tales como un complejo Ni-NTA. Para más detalles sobre compuestos ejemplares que pueden usarse como catalizadores, véase Daeid et al., "Synthetic porphyrins/metalloporphyrins which mimic states in catalytic cycle of cytochrome P-450 and peroxidases", *Pure and Applied Chemistry* 65 (7): 1541-1548 (1993) y Xu et al., "Manganese Porphyrin-dsDNA Complex: A Mimicking Enzyme for Highly Efficient Bioanalysis", *Analytical Chemistry* 85: 3374-3379 (2013). En un ejemplo, el método 2000 usa un catalizador acoplado a nucleótidos ffT (ffT-Cat), un catalizador acoplado a nucleótidos ffA a través de un enlace disulfuro (SS) escindible (ffA-SS-Cat) y nucleótidos ffC marcados con biotina (ffC-Biotina). El nucleótido ffG puede ser "oscuro", por ejemplo, ffG no está marcado para la detección, o puede incluir otro resto adecuado tal como se proporciona adicionalmente en la presente memoria. Se pueden usar otros acoplamientos o haptenos adecuados tales como los descritos en la presente memoria. Haciendo referencia ahora a la FIG. 20, el método 2000 incluye, pero no está limitado a, las siguientes etapas.

En la etapa 2010, los nucleótidos se incorporan en polinucleótidos, por ejemplo, en cadenas complementarias en crecimiento, por ejemplo, en segundos polinucleótidos que se hibridan con un primer polinucleótido que se hibrida con uno correspondiente de los cebadores de secuenciación 1622 ilustrados en la FIG. 16, usando una polimerasa (no ilustrada específicamente), en un ciclo SBS. En la realización ilustrada, el nucleótido particular incorporado en el segundo polinucleótido puede ser ffT-Cat, ffA-SS-Cat, ffC-biotina o ffG oscuro, dependiendo de la secuencia particular del primer polinucleótido con el que se hibrida el segundo polinucleótido. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21.

En la etapa 2015, se captura una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo, se captura una primera imagen para la detección de nucleótidos A o T incorporados. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una primera imagen (por ejemplo, IMG1) para la detección de nucleótidos A o T incorporados después o durante el flujo de una solución de moléculas quimioluminogénicas a través de la celda de flujo 1600 para generar una señal quimioluminiscente ubicada en todos los sitios (grupos) con incorporación de A o T. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21.

En la etapa 2020, se realiza al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado. En un ejemplo no limitativo, una solución que incluye estreptavidina-catalizador (Estrep-Cat) y un escindidor de disulfuro (escindidor de SS) fluye a través de la celda de flujo 1600. Los escindidores de disulfuro adecuados incluyen, pero no están limitados a, agentes reductores fuertes tales como trishidroxipropilfosfina (THP), triscarboxietilfosfina (TCEP), varias otras fosfinas orgánicas y 2-mercaptoetanol. La formación de complejos ejemplares entre los nucleótidos de ffC-biotina incorporados y Estrep-Cat identifica selectivamente sitios (agrupaciones) con incorporación de C. El escindidor de SS escinde el enlace disulfuro en los nucleótidos ffA-SS-Cat incorporados y elimina eficazmente el catalizador de los nucleótidos A, eliminando así las señales quimioluminiscentes que pueden generarse a partir de esos sitios. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21. Debe apreciarse que no es necesario que el escindidor de SS y el catalizador unido a un hapteno, tal como estreptavidina, se añadan simultáneamente entre sí, sino que pueden añadirse en cualquier orden adecuado.

En la etapa 2025, se captura una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo, se captura una segunda imagen para la detección de nucleótidos C incorporados. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una segunda imagen (por ejemplo, IMG2) para la detección de nucleótidos C incorporados después o durante el flujo de una solución de moléculas quimioluminogénicas a través de la celda de flujo 1600 para generar una señal quimioluminiscente ubicada en todos los sitios con incorporación de C. También se captura una señal quimioluminiscente de la incorporación de un nucleótido T. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21.

En la etapa 2030, las lecturas automáticas de nucleótidos se realizan utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera y la segunda imagen. En este ejemplo, se detecta la incorporación de A y T en la primera

imagen. La incorporación de C y T se detecta en la segunda imagen. Debido a que el escindidor de SS fluyó a través de la celda de flujo en la etapa 2020, la señal de los nucleótidos A incorporados está ausente en la segunda imagen. La incorporación de G se determina en base a la ausencia de una señal de emisión en las imágenes 1 y 2. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21, en la forma de una tabla de verdad en la que el "1" en cada fila significa que el nucleótido en esa columna corresponde a una señal brillante (correspondiente a la presencia del catalizador) en la imagen correspondiente.

En una etapa de decisión 2035, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2000 continúa con la etapa 2040. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2000 finaliza.

En la etapa 2040, se realiza una reacción de desbloqueo para eliminar un grupo de bloqueo en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. El método 2000 vuelve a la etapa 2010. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 21.

La FIG. 22 muestra un ejemplo de un esquema SBS quimioluminiscente 2200 que es una alternativa al esquema SBS de la FIG. 19, y en el que el catalizador se inmoviliza en cada sitio de una celda de flujo con patrón y los nucleótidos se acoplan a los apantalladores de luminiscencia correspondientes. En este ejemplo, el catalizador 2230 se inmoviliza en la capa hidrófila 1620 sobre el sustrato inferior 1610. El nucleótido 2220 se acopla a un apantallador de luminiscencia (Q) 2210. El apantallador de luminiscencia 2210 puede incluir, por ejemplo, una pequeña molécula orgánica tal como BHQ, DABCYL, DNP o QSY-1; otros apantalladores ejemplares se describen en otra parte de la presente memoria. La luz es generada sustancialmente solo por las moléculas quimioluminogénicas 2235 dentro de una cierta distancia del catalizador 2230 donde no hay incorporación de nucleótidos, por ejemplo, por las moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 2235b en el molde de ADN 2210b. Se suprime la intensidad en los sitios con la incorporación del nucleótido 2220 con el apantallador de luminiscencia 2210 acoplado al mismo (por ejemplo, en el molde de ADN 2210a). El esquema basado en el apantallador ofrece el potencial de discriminación de cuatro colores basado en un nivel único de supresión por el apantallador Q utilizado para cada nucleótido. Por ejemplo, un nucleótido no está acoplado a un apantallador, y los otros tres nucleótidos, respectivamente, están acoplados a apantalladores con una diferente eficiencia entre sí. Por lo tanto, el brillo de cada sitio proporciona información sobre qué nucleótido se está incorporando. También son posibles esquemas basados en escisión y parpadeo similares a los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la discriminación de un color se puede usar de la manera que se describe en otra parte de la presente memoria.

La FIG. 23 muestra un ejemplo de un esquema SBS quimioluminiscente 2300 que es otra alternativa al esquema SBS de la FIG. 19, y en el que el catalizador está unido al cebador de secuenciación y los nucleótidos están acoplados a los apantalladores de luminiscencia correspondientes. En este ejemplo, el catalizador 2330 se inmoviliza en los cebadores de secuenciación 2315. El nucleótido 2320 se acopla al apantallador de luminiscencia 2310. La luz solo es generada por las moléculas quimioluminogénicas 2335 dentro de una cierta distancia del catalizador 2330 donde no hay incorporación de un nucleótido con el que se acopla el apantallador 2310, por ejemplo, mediante moléculas quimioluminogénicas en estado excitado 2335b en el molde de ADN 2310b. Se suprime la intensidad en los sitios con incorporación del nucleótido 2320 con el apantallador de luminiscencia 2310 acoplado al mismo (en el molde de ADN 2310a). El esquema de SBS quimioluminiscente 2300 es un esquema con un rendimiento relativamente alto y fácil de fabricar, en el que el catalizador se puede unir al cebador de secuenciación y cada nucleótido puede estar marcado con un apantallador de luminiscencia.

Debe apreciarse que los esquemas de detección basados en quimioluminiscencia descritos actualmente no se limitan a la tecnología de celdas de flujo. Los esquemas de detección basados en quimioluminiscencia se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones de fluidos digitales. Por ejemplo, la FIG. 24 ilustra una vista en sección transversal lateral de un ejemplo de un actuador de gotas 2400 que usa quimioluminiscencia para proporcionar un esquema de SBS luminiscente sustancialmente libre de luz. El actuador de gotas 2400 puede incluir un dispositivo de fluidos digital integrado basado en CMOS que carece de iluminación. Es decir, el actuador de gotas 2400 puede configurarse para generar quimioluminiscencia localizada espacialmente y detectar dicha quimioluminiscencia usando un sensor CMOS integrado.

El actuador de gotas 2400 incluye un sustrato inferior 2410 y un sustrato superior 2412 que están separados por un espacio de operaciones de gotas 2414. El espacio de operaciones de gotas 2414 contiene fluido de relleno 2416. El fluido de relleno 2416 es, por ejemplo, aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de relleno de hexadecano. El sustrato superior 2412 puede incluir una disposición de electrodos de operación de gotas 2418 (por ejemplo, electrodos de humectación eléctrica). El sustrato inferior 2410 puede incluir un plano de referencia a tierra o un electrodo (no mostrado). Las operaciones de gotas se realizan adyacentes a los electrodos de operaciones de gotitas 2418 en una superficie de operaciones de gotas.

Además, el detector CMOS 2440 se puede integrar en el sustrato inferior 2410, y la capa hidrófila 2420 se puede disponer encima del detector CMOS 2440. El detector CMOS 2440 y la capa hidrófila 2420 se pueden configurar de forma análoga al detector CMOS 1640 y la capa hidrófila 1620 descritas anteriormente con referencia a la FIG. 16. Por ejemplo, el detector CMOS 2440 puede incluir píxeles 2442. Debido a que los esquemas de detección basados en quimioluminiscencia no necesitan iluminación a través del sustrato superior 2412 sobre la capa hidrófila 2420, las características que no son ópticamente transparentes pueden instalarse en el sustrato superior 2412. Por ejemplo, en

el actuador de gotas 2400, se pueden instalar electrodos adicionales de operación de gotas 2418 en, o proporcionarse como parte de, el sustrato superior 2412 en la vecindad de la capa hidrófila 2420 para ayudar a la humectación eléctrica a través de la superficie de la capa hidrófila 2420.

La FIG. 25 ilustra un método para detectar la presencia de nucleótidos usando en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. En un ejemplo, el método 2500 ilustrado en la FIG. 25 puede realizarse usando la celda de flujo 1600 de la FIG. 16. La FIG. 26 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método 2500 de la FIG. 25.

En una realización ilustrativa, el método 2500 usa nucleótidos completamente funcionalizados (ff) marcados con hapteno (ffA, ffT, ffC y ffG), y la enzima luciferasa de Gaussia (Glu) marcada con hapteno, por ejemplo, la forma "brillante" de Glu, para la detección y discriminación de un evento de incorporación de nucleótidos. En un ejemplo no limitante, el método 2500 utiliza ffT marcado con digoxigenina (DIG) (ffT-DIG) y Glu marcada con un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) específico para DIG (por ejemplo, antiDIG-Glu) para detectar la incorporación de ffT, ffA marcado con destiobiotina (ffA-Destiobiotina), ffC marcado con biotina (ffC-Biotina) y Glu marcada con estreptavidina (estrep-Glu) para detectar la incorporación de ffC y ffT. El nucleótido ffG puede ser "oscuro", por ejemplo, no es necesario que ffG se marque necesariamente para la detección. Otros esquemas de marcaje y otros pares de haptenos pueden ser análogos a los descritos en otra parte de la presente memoria. Haciendo referencia ahora a la FIG. 25, el método 2500 incluye, pero no está limitado a, las siguientes etapas.

En la etapa 2510, los nucleótidos se incorporan respectivamente en polinucleótidos, por ejemplo, las cadenas complementarias en crecimiento, por ejemplo, se incorporan en un segundo polinucleótido hibridado con un primer polinucleótido que se hibrida con uno correspondiente de los cebadores de secuenciación 1622 ilustrados en la FIG. 16, usando una polimerasa (no ilustrada específicamente) en un ciclo SBS. El nucleótido incorporado en uno de dichos segundos polinucleótidos puede ser ffT-DIG, ffA-Destiobiotina, ffC-Biotina o ffG, dependiendo de la secuencia particular del primer polinucleótido correspondiente. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26. Debe apreciarse que los nucleótidos incorporados en diferentes segundos polinucleótidos pueden ser diferentes entre sí, en base a las diferentes secuencias de los primeros polinucleótidos.

En la etapa 2515, se realiza un primer proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado. En un ejemplo no limitativo, se realiza un primer proceso de tinción ejemplar que usa estrep-Glu para detectar la incorporación de nucleótidos A y C. Por ejemplo, una primera solución de tinción que incluye estrep-Glu puede fluir a través de la celda de flujo 1600. La formación de complejos entre cualquier nucleótido ffA-Destiobiotina incorporado y cualquier nucleótido ffC-Biotina incorporado y estrep-Glu tiñe selectivamente los grupos correspondientes con la enzima luciferasa de Gaussia. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

En la etapa 2520, se captura una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo ilustrativo, se captura una primera imagen para la detección de señales de Glu resultantes de la unión de estrep-Glu a ambos nucleótidos ffA-Destiobiotina incorporados y nucleótidos ffC-Biotina incorporados. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una primera imagen (por ejemplo, IMG1) para la detección de señales de Glu que resultan de la unión de estrep-Glu a ambos nucleótidos incorporados ffA-Destiobiotina y nucleótidos incorporados ffC-Biotina, después o durante el flujo de una solución de moléculas quimioluminogénicas apropiadas a través de la celda de flujo 1600 para generar una señal quimioluminiscente localizada. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

En la etapa 2525, se realiza un segundo proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado. En un ejemplo, se realiza un segundo proceso de tinción usando antiDIG-Glu y un exceso de biotina para detectar la incorporación de nucleótidos T y A. Por ejemplo, una segunda solución de tinción que incluye antiDIG-Glu y exceso de biotina fluye a través de la celda de flujo 1600. La formación de complejos entre los nucleótidos ffT-DIG incorporados y antiDIG-Glu tiñe selectivamente un grupo con la enzima luciferasa de Gaussia. Además, el exceso de biotina causa la disociación de estrep-Glu de ffA-destiobiotina, pero no causa sustancialmente la disociación de estrep-Glu de ffC-biotina. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

En la etapa 2530, se captura una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas. En un ejemplo, se captura una segunda imagen para la detección de una señal antiDIG-Glu de nucleótidos T incorporados además de la señal de estrep-Glu de nucleótidos C incorporados. Por ejemplo, usando el detector CMOS 1640 de la celda de flujo 1600, se captura una segunda imagen (por ejemplo, IMG2) después o durante el flujo de moléculas quimioluminogénicas. La señal previa como en IMG1 se detecta mediante la formación de un complejo de unión ffC-Biotina/estrep-Glu (brillante) e indica la incorporación de un nucleótido C en un segundo polinucleótido correspondiente, y nuevamente aparece en IMG2. Una nueva señal causada por la formación de un complejo de unión ffT-DIG/antiDIG-Glu aparece en IMG2, mientras que la señal en IMG1 correspondiente a un complejo ffA-destiobiotina/estrep-Glu desaparece como resultado de la disociación de dicho complejo resultante del flujo de exceso de biotina. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

En la etapa 2535, las lecturas automáticas de nucleótidos se realizan utilizando un software de bioinformática basado

en al menos la primera y la segunda imagen. En este ejemplo, la incorporación de A se detecta como una señal que aparece en la primera imagen pero no en la segunda imagen, la incorporación de T se detecta como una señal que está ausente en la primera imagen y presente en la segunda imagen, la incorporación de C se detecta como una señal tanto en la primera como en la segunda imagen, y la incorporación de G se determina en base a la ausencia de una señal tanto en la primera como en la segunda imagen. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26 en la forma de una tabla de verdad en la que el "1" en cada fila significa que el nucleótido en esa columna corresponde a una señal brillante (ya sea de brillo o flash) en la imagen correspondiente.

En la etapa de decisión 2540, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2500 continúa con la etapa 2545. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2500 finaliza.

En una etapa 2545, se realiza una reacción de desbloqueo para eliminar un grupo de bloqueo en cada uno de los nucleótidos incorporados para facilitar la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. El método 2500 vuelve a la etapa 2510. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

La FIG. 27 ilustra otro método ejemplar más para detectar la presencia de nucleótidos usando en un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La FIG. 27 puede implementarse usando cualquier composición o dispositivo adecuado, que incluye, pero no está limitado a, las composiciones y dispositivos proporcionados en la presente memoria.

En la etapa 2710, los nucleótidos se incorporan respectivamente en polinucleótidos, por ejemplo, las cadenas complementarias en crecimiento, por ejemplo, se incorporan en un segundo polinucleótido hibridado con un primer polinucleótido. Debe apreciarse que los nucleótidos incorporados en diferentes segundos polinucleótidos pueden ser diferentes entre sí, en base a las diferentes secuencias de los primeros nucleótidos. En la etapa 2715, se realiza al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador o apantallador a, o eliminar catalizador o apantallador de, al menos un nucleótido incorporado de cualquier manera adecuada, que incluye, pero no está limitado a, los proporcionados en la presente memoria. En la etapa 2720, al menos la primera y la segunda imagen se capturan en presencia de moléculas quimioluminogénicas de cualquier manera adecuada, que incluye, pero no está limitada a, las proporcionadas en la presente memoria. Obsérvese que la primera y la segunda imagen pueden tomarse en cualquier orden adecuado entre sí y en relación con el al menos un proceso de tinción de la etapa 2715. En la etapa 2725, las lecturas automáticas de nucleótidos se realizan utilizando software de bioinformática basado en al menos la primera y la segunda imagen de cualquier manera adecuada, incluyendo, pero no limitado a, las que se proporcionan en la presente memoria. En la etapa de decisión 2730, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, el método 2700 continúa con la etapa 2735. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2700 finaliza. En una etapa 2735, se realiza una reacción de desbloqueo para eliminar un grupo de bloqueo en cada uno de los nucleótidos incorporados para facilitar la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. El método 2700 vuelve a la etapa 2710. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la FIG. 26.

Debe apreciarse que el método 2700 también representa etapas que se pueden realizar en una variedad de métodos ejemplares diferentes para detectar la presencia de subunidades de polímeros, tales como nucleótidos en polinucleótidos, usando quimioluminiscencia. Por ejemplo, el método 700 descrito adicionalmente más arriba con referencia a la FIG. 7 incluye una etapa de añadir un nucleótido de una pluralidad de nucleótidos a un segundo polinucleótido basado en la secuencia de un primer polinucleótido (etapa 704 del método 700), correspondiente a la incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2710 del método 2700). El método 700 también incluye etapas de exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto (etapa 705 del método 700), exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto (etapa 708 del método 700) y exponer el nucleótido a una molécula de corte (etapa 711 del método 700), cada una de dichas etapas corresponde a realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2715 del método 2700). El método 700 también incluye etapas para detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (etapas 707, 710 y 713 del método 700), que corresponden a la captura de al menos una primera y segunda imagen para la discriminación de bases (etapa 2720 del método 2700). El método 700 también incluye detectar el nucleótido añadido en la etapa 704 en base a la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones al menos en las etapas 707 y 710, o 713 o una combinación de los mismos (etapa 714 del método 700), correspondiente a que las lecturas automáticas de nucleótidos se hacen usando software de bioinformática basado en al menos la primera y la segunda imagen (etapa 2725 del método 2700). Después de la etapa 714 del método 700, se puede determinar si poner en contacto nuevamente el segundo nucleótido con polimerasa y una pluralidad de nucleótidos, lo que corresponde a la decisión de llevar a cabo otro ciclo SBS (etapa 2730 del método 2700). Si es así, se puede realizar una etapa de desbloqueo antes de realizar nuevamente la etapa 703, correspondiente al desbloqueo (etapa 2735 del método 2700).

Como otro ejemplo, el método 900 descrito adicionalmente más arriba con referencia a la FIG. 9 incluye una etapa de añadir un nucleótido de una pluralidad de nucleótidos a un segundo polinucleótido basado en la secuencia de un primer polinucleótido (etapa 904 del método 900), correspondiente a la incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2710 del método 2700). El método 900 también incluye etapas de exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un quinto resto (etapa 905 del método 900), exponer el nucleótido a un apantallador acoplado a un sexto resto (etapa 908 del método 900) y exponer el nucleótido a una molécula de corte (etapa 911 del método 900), cada una de dichas etapas corresponde a realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir un apantallador a, o

eliminar un apantallador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2715 del método 200). El método 900 también incluye etapas para detectar la emisión de fotones o la ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas (etapas 907, 910 y 913 del método 900), que corresponden a la captura de al menos una primera y segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 2720 del método 2700). El método 900 también incluye la

5 detección del nucleótido añadido en la etapa 904 basado en la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones al menos en las etapas 907, 910 o 913 o una combinación de los mismos (etapa 914 del método 900), correspondiente a las lecturas automáticas de nucleótidos que se hacen usando software de bioinformática basado en al menos la primera y segunda imagen (etapa 2725 del método 2700). Después del paso 914 del método 900, se puede determinar si poner en contacto nuevamente el segundo nucleótido con polimerasa y una pluralidad de

10 nucleótidos, lo que corresponde a la decisión de llevar a cabo otro ciclo SBS (etapa 2730 del método 2700). Si es así, se puede realizar una etapa de desbloqueo antes de realizar nuevamente la etapa 903, correspondiente al desbloqueo (etapa 2735 del método 2700).

Como otro ejemplo, el método 1700 descrito adicionalmente más arriba con referencia a la FIG. 17 incluye una etapa de incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 1710 del método 1700), correspondiente a la incorporación

15 de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2710 del método 2700). El método 1700 también incluye las etapas de realizar un primer proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar el catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 1715 del método 1700) y realizar un segundo proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar el catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 1730 del método 1700), correspondiente a

20 realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2715 del método 2700). El método 1700 también incluye las etapas de capturar una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 1720 del método 1700), una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 1725 del método 1700) y una tercera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 1735 del método 1700), correspondientes a la captura de al menos una primera y segunda imagen para la discriminación de bases (etapa 2720 del método 2700). El método 1700 también incluye

25 lecturas automáticas de nucleótidos que se realizan utilizando software de bioinformática basado en al menos la primera, segunda y tercera imagen (etapa 1740 del método 1700), correspondiente a lecturas automáticas de nucleótidos que se realizan utilizando software de bioinformática basado en al menos la primera y segunda imagen (etapa 2725 del método 2700). Al igual que el método 2700, el método 1700 también incluye una decisión de realizar otro ciclo SBS (etapa 1745 del método 1700 y la etapa 2730 del método 2700) y una etapa de desbloqueo (etapa 1750 del método 1700 y etapa 2735 del método 2700).

30

Como otro ejemplo más, el método 2000 descrito adicionalmente más arriba con referencia a la FIG. 20 incluye una etapa de incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2010 del método 2000), correspondiente a la incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2710 del método 200). El método 2000 también incluye las etapas de capturar una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 2015 del método 2000) y capturar una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 2025 del método 2000), correspondiente a la captura de al menos una primera y segunda imagen para la discriminación de bases (etapa 2720 del método 2700). El método 2000 también incluye una etapa de realizar al menos un proceso de tinción que incluye

35 añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado, ilustrativamente, haciendo fluir un catalizador marcado con hapteno, tal como estrep-cat, y una molécula de corte, tal como como solución de escindidor de SS (etapa 2020 del método 2000), correspondiente a realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2715 del método 2700). El método 2000 también incluye lecturas automáticas de nucleótidos que se realizan utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera y la segunda imagen (etapa 2030 del método 2000), correspondiente a lecturas automáticas de nucleótidos que se realizan utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera y

40 segunda imagen (etapa 2725 del método 2700). Al igual que el método 2700, el método 2000 también incluye una decisión de realizar otro ciclo SBS (etapa 2035 del método 2000 y la etapa 2730 del método 2700) y una etapa de desbloqueo (etapa 2040 del método 2000 y la etapa 2735 del método 2700).

45

Como otro ejemplo más, el método 2500 descrito adicionalmente más arriba con referencia a la FIG. 25 incluye una etapa de incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2510 del método 2500), correspondiente a la incorporación de nucleótidos en polinucleótidos (etapa 2710 del método 2700). El método 2500 también incluye las etapas de realizar un primer proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar el catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2515 del método 2500) y realizar un segundo proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar el catalizador de, al menos un nucleótido incorporado (etapa 2525 del método 2500), correspondiente a realizar al menos un proceso de tinción que incluye añadir catalizador a, o eliminar catalizador de,

50 al menos un nucleótido incorporado (etapa 2715 del método 2700). El método 2500 también incluye las etapas de capturar una primera imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 2520 del método 2500) y una segunda imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas (etapa 2530 del método 2500), correspondiente a la captura de al menos una primera y segunda imagen para discriminación de bases (etapa 2720 del método 2700). El método 2500 también incluye las lecturas automáticas de nucleótidos que se hacen utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera y la segunda imagen (etapa 2535 del método 2500), correspondiente a las lecturas automáticas de nucleótidos que se hacen utilizando un software de bioinformática basado en al menos la primera y segunda imagen (etapa 2725 del método 2700). Al igual que el método 2700, el método 2500 también incluye una decisión de realizar otro ciclo SBS (etapa 2540 del método 2500 y la etapa 2730 del método 2700) y una

60

etapa de desbloqueo (etapa 2545 del método 2500 y etapa 2735 del método 2700).

La FIG. 28 ilustra esquemáticamente una composición alternativa para detectar la presencia de subunidades de polímeros usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. En lugar de acoplar un nucleótido incorporado 2810 a un catalizador (por ejemplo, un nucleótido que se marca antes de la incorporación en el polinucleótido 2820, o que se marca a través de un complejo de hapteno después de la incorporación en el polinucleótido 2820), se puede usar una proteína de fusión 2830 de polimerasa y luciferasa. Para más detalles sobre las proteínas de fusión de polimerasa y luciferasa, véase Kobatake et al., "Bioluminescent immunoassay with a protein A-luciferase fusion protein", *Analytical Biochemistry* 208 (2): 300-305 (1 de febrero, 1993). El nucleótido incorporado se puede marcar con un fluoróforo (por ejemplo, marcado antes de la incorporación en el polinucleótido 2820, o marcado a través de un complejo de hapteno después de la incorporación en el polinucleótido 2820), y se puede excitar usando transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Para más detalles sobre BRET, véase Boute et al., "The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET", *Trends in Pharmacological Sciences* 23 (8): 351-354 (1 de agosto, 2002). Dicho esquema puede reducir la necesidad de etapas de tinción adicionales o el uso de nucleótidos que están acoplados a haptenos, catalizadores y/o apantalladores, y también puede obviar la necesidad de fuentes externas de iluminación.

La FIG. 29 ilustra un método ejemplar para detectar la presencia de nucleótidos usando un polinucleótido usando quimioluminiscencia, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente descripción. La FIG. 29 se puede implementar ilustrativamente usando la composición ilustrada en la FIG. 28, pero puede implementarse usando cualquier composición o dispositivo adecuado.

En la etapa 2910, los nucleótidos se incorporan respectivamente en polinucleótidos usando una proteína de fusión catalizador-polimerasa. La FIG. 28 ilustra una proteína de fusión de luciferasa-polimerasa ejemplar, pero debe apreciarse que puede usarse cualquier proteína de fusión adecuada entre polimerasa y un catalizador tal como se describe en la presente memoria. La proteína de fusión puede incorporar los nucleótidos en los polinucleótidos correspondientes, por ejemplo, cadenas complementarias en crecimiento, por ejemplo, en un segundo nucleótido hibridado con un primer nucleótido. Debe apreciarse que los nucleótidos incorporados en diferentes segundos polinucleótidos pueden ser diferentes entre sí, en base a las diferentes secuencias de los primeros polinucleótidos.

En la etapa 2920, se captura al menos una imagen en presencia de moléculas quimioluminogénicas de cualquier manera adecuada, que incluye, pero no está limitado a, las proporcionadas en la presente memoria. En la realización ilustrada en la FIG. 29 y ejemplificada en la FIG. 28, las moléculas quimioluminogénicas interactúan con la porción de catalizado de la proteína de fusión, por ejemplo, interactúan con la luciferasa ilustrada en la FIG. 28, y emiten fotones que responden a dicha interacción. Dichos fotones interactúan entonces con las etiquetas de fluoróforo en los nucleótidos incorporados, haciendo que las etiquetas de fluoróforo emitan fotones que tienen una longitud de onda en base a la cual se puede identificar el nucleótido incorporado respectivo. Se conocen métodos para identificar nucleótidos basados en emisiones de fotones de etiquetas de fluoróforo acopladas a los mismos.

En la etapa 2920, las lecturas automáticas de nucleótidos se hacen utilizando un software de bioinformática basado en la al menos una imagen de cualquier manera adecuada, que incluye, pero no está limitado a, las proporcionadas en la presente memoria. En la etapa de decisión 2925, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, el método 2900 continúa con la etapa 2930. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 2900 finaliza. En una etapa 2930, se realiza una reacción de desbloqueo para eliminar un grupo de bloqueo en cada uno de los nucleótidos incorporados para facilitar la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. El método 2900 vuelve a la etapa 2910.

Otras realizaciones alternativas

Debe tenerse en cuenta que los sistemas y métodos proporcionados en la presente memoria pueden implementarse utilizando varios tipos de entornos de procesador de datos (por ejemplo, en uno o más procesadores de datos) que ejecutan instrucciones (por ejemplo, instrucciones de software) para realizar las operaciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes incluyen la implementación en una única computadora o estación de trabajo de propósito general, o en un sistema en red, o en una configuración cliente-servidor, o en una configuración de proveedor de servicios de aplicaciones. Por ejemplo, los métodos y sistemas descritos en la presente memoria pueden implementarse en muchos tipos diferentes de dispositivos de procesamiento mediante un código de programa que comprende instrucciones de programa que son ejecutables por el subsistema de procesamiento del dispositivo. Las instrucciones del programa de software pueden incluir el código fuente, el código de objeto, el código de máquina o cualquier otro dato almacenado que pueda funcionar para que un sistema de procesamiento realice los métodos y operaciones descritos en la presente memoria. Sin embargo, también se pueden usar otras implementaciones, tales como firmware o incluso hardware diseñado apropiadamente configurado para llevar a cabo los métodos y sistemas descritos en la presente memoria. Por ejemplo, una computadora puede programarse con instrucciones para realizar las diversas etapas de los diagramas de flujo mostrados en las FIGS. 2, 4, 7, 9, 17, 20, 25, 27 o 29.

Se observa además que los sistemas y métodos pueden incluir señales de datos transmitidas a través de redes (por ejemplo, red de área local, red de área amplia, internet, combinaciones de las mismas, etc.), medio de fibra óptica, ondas portadoras, redes inalámbricas, etc. para la comunicación con uno o más dispositivos de procesamiento de

datos. Las señales de datos pueden transportar cualquiera o todos los datos descritos en la presente memoria que se proporcionan a o desde un dispositivo.

Los datos de los sistemas y métodos (por ejemplo, asociaciones, entrada de datos, salida de datos, resultados de datos intermedios, resultados de datos finales, etc.) pueden almacenarse e implementarse en uno o más tipos diferentes de almacenes de datos implementados por computadora, tales como diferentes tipos de dispositivos de almacenamiento y construcciones de programación (por ejemplo, RAM, ROM, memoria Flash, archivos planos, bases de datos, estructuras de datos de programación, variables de programación, construcciones de instrucciones IF-THEN (o tipo similar), etc.). Se observa que las estructuras de los datos describen formatos para su uso en la organización y almacenamiento de datos en bases de datos, programas, memoria u otros medios legibles por computadora para su uso por un programa informático.

Los sistemas y métodos se pueden proporcionar además en muchos tipos diferentes de medios de almacenamiento legibles por computadora, incluyendo los mecanismos de almacenamiento de la computadora (por ejemplo, medios no transitorios, tales como CD-ROM, disquete, RAM, memoria flash, disco duro de la computadora, etc.) que contienen instrucciones (por ejemplo, software) para su uso en la ejecución por parte de un procesador para realizar las operaciones de los métodos e implementar los sistemas descritos en la presente memoria.

Además, los componentes informáticos, los módulos de software, las funciones, los almacenes de datos y las estructuras de datos que se proporcionan en la presente memoria pueden conectarse directa o indirectamente entre sí para permitir el flujo de datos necesarios para sus operaciones. También se observa que un módulo o procesador incluye, pero no está limitado a, una unidad de código que realiza una operación de software y puede implementarse, por ejemplo, como una unidad de código de subrutina, o como una unidad de código de función de software, o como un objeto (como en un paradigma orientado a objetos), o como un applet, o en un lenguaje de script de computadora, o como otro tipo de código de computadora. Los componentes y/o la funcionalidad del software pueden ubicarse en una sola computadora o distribuirse en múltiples computadoras dependiendo de la situación en cuestión.

Aunque anteriormente se han descrito varias realizaciones ilustrativas de la invención, será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse de la invención, como se define por las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, aunque ciertas composiciones, sistemas y métodos se analizan anteriormente con referencia a la detección de la presencia de nucleótidos en polinucleótidos, debe entenderse que las presentes composiciones, sistemas y métodos pueden adaptarse adecuadamente para su uso en la detección de la presencia de cualquier tipo de subunidad de polímero que pueda asociarse con quimioluminiscencia o una ausencia de la misma.

Listado de secuencias

<110> ILLUMINA, INC.

<120> COMPOSICIONES, SISTEMAS Y MÉTODOS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE SUBUNIDADES DE POLÍMEROS USANDO QUIMIOLUMINISCENCIA

<130> 12957-173-228

<140>
<141>

<150> 62/092.693
<151> 16-12-2014

<150> 62/049.883
<151> 12-09-2014

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 1

	atcggattcg ataacagtca atgtaatgac ca	32
	<210> 2	
	<211> 32	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
10	<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
	<400> 2	
	atcggattcg ataacagtcg tggtaatgac ca	32
15	<210> 3	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<221> fuente	
	<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
	<400> 3	
25	atcggattcg ataacagtca tggtaatgac ca	32
	<210> 4	
	<211> 32	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
35	<400> 4	
	atcggattcg ataacagtca ttgtaatgac ca	32
	<210> 5	
	<211> 32	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
45	<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
	<400> 5	
	atcggattcg ataacagtca tagtaatgac ca	32
50	<210> 6	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<221> fuente	
	<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"	
	<400> 6	
60	atcggattcg ataacagtca tcgtaatgac ca	32

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la incorporación de nucleótidos en polinucleótidos que incluye:
 - a) proporcionar un sustrato; y un primer polinucleótido acoplado al sustrato;
 - b) hibridar un segundo polinucleótido con el primer polinucleótido;
 - 5 c) poner en contacto el segundo polinucleótido con una polimerasa y una pluralidad de nucleótidos, un primer subconjunto de los cuales incluye un primer resto, un segundo subconjunto de los cuales incluye un segundo resto, un tercer subconjunto de los cuales incluye un tercer resto y un cuarto subconjunto de los cuales incluye un cuarto resto o ningún resto;
 - d) añadir un nucleótido de la pluralidad de nucleótidos al segundo polinucleótido en base a una secuencia del
10 primer polinucleótido;
 - e) exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un quinto resto;
 - f) exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas;
 - g) detectar la emisión de fotones o una ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas;
 - h) exponer el nucleótido a un catalizador acoplado a un sexto resto;
 - 15 i) exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas;
 - j) detectar la emisión de fotones o una ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas;
 - k) exponer el nucleótido a una molécula de corte;
 - l) exponer el nucleótido a moléculas quimioluminogénicas;
 - m) detectar la emisión de fotones o una ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas; y
 - 20 n) detectar el nucleótido añadido en la etapa d) en base a la detección de la emisión de fotones o ausencia de fotones de las moléculas quimioluminogénicas en las etapas g, j, o m o una combinación de los mismos.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas d) a n) se repiten cualquier número de veces para diferentes nucleótidos que se añaden al segundo polinucleótido.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el catalizador al que se expone el nucleótido durante la etapa e) incluye un primer catalizador y el catalizador al que se expone el nucleótido durante la etapa h) incluye un segundo
25 catalizador que es igual o diferente que el primer catalizador.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno de los primeros y segundos restos es biotina o un derivado de biotina, y en donde el otro de los primeros y segundos restos es estreptavidina.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno de los primeros y segundos restos es digoxigenina, y en donde el otro de los primeros y segundos restos es antidigoxigenina.
30
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el catalizador incluye una enzima.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la enzima incluye una luciferasa, y en donde la molécula quimioluminogénica incluye una luciferina o un derivado de luciferina.
8. El método de la reivindicación 6 en donde la enzima incluye una luciferasa, y en donde la molécula quimioluminogénica incluye coelenterazina o un derivado de coelenterazina.
35
9. El método de la reivindicación 1, en donde el catalizador incluye un generador de peróxido, y en donde la molécula quimioluminogénica incluye luminol o un derivado de luminol.
10. El método de la reivindicación 9 en donde el generador de peróxido incluye una enzima.
11. El método de la reivindicación 9 en donde el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o
40 metalorgánico.
12. El método de la reivindicación 1 en donde el catalizador incluye un generador de peróxido, y en donde la molécula quimioluminogénica incluye acridinio o un derivado de acridinio.
13. El método de la reivindicación 12 en donde el generador de peróxido incluye una enzima; o en donde el generador de peróxido incluye un catalizador metálico, orgánico o metalorgánico.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sustrato está incluido en una celda de flujo o plataforma de tipo matriz.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sustrato incluye un chip CMOS que se ha adaptado para la aplicación de secuenciación.

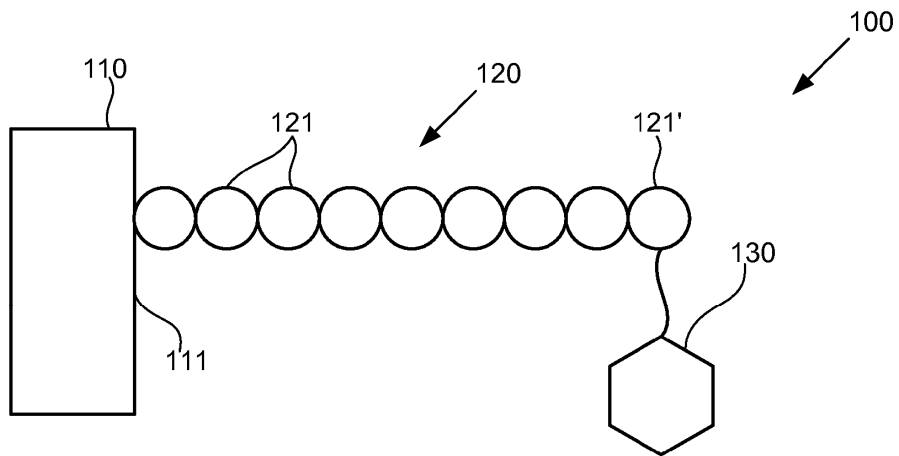


FIG. 1A

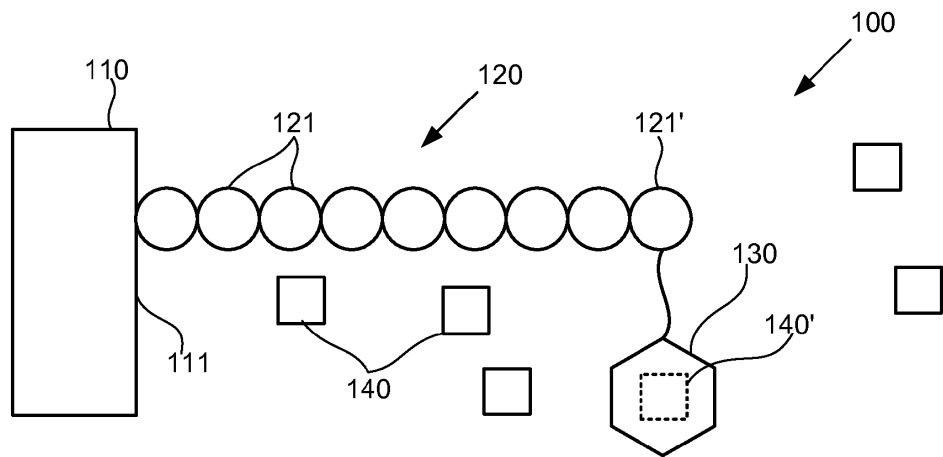


FIG. 1B

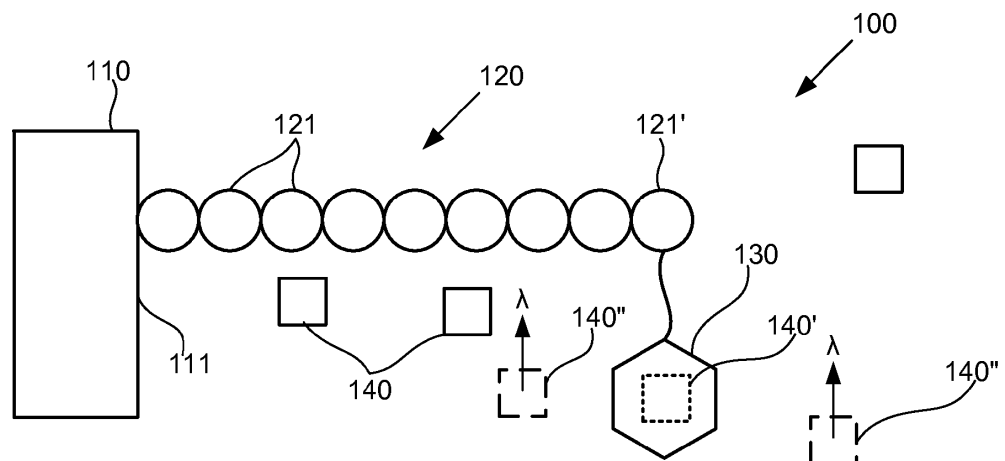


FIG. 1C

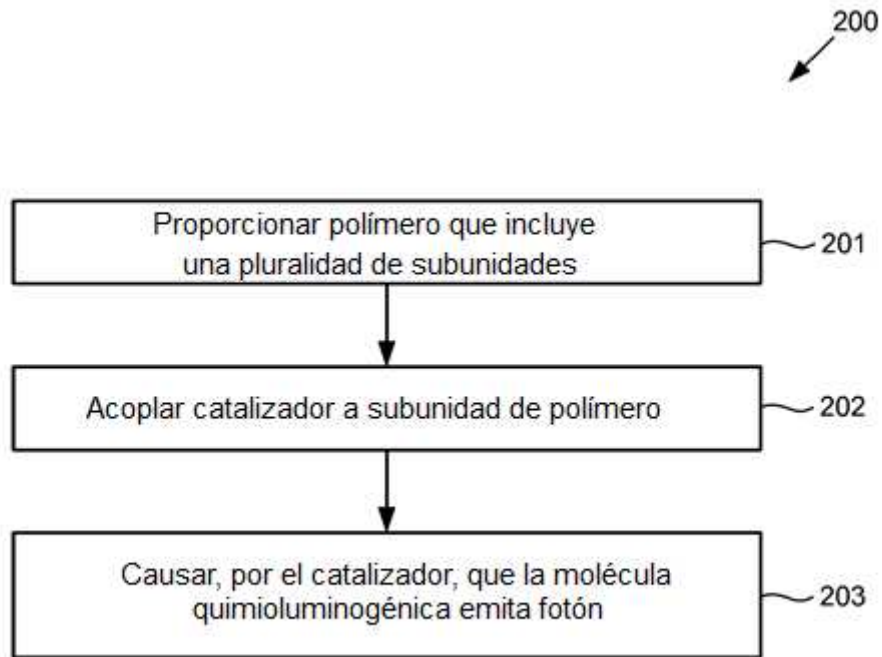


FIG. 2

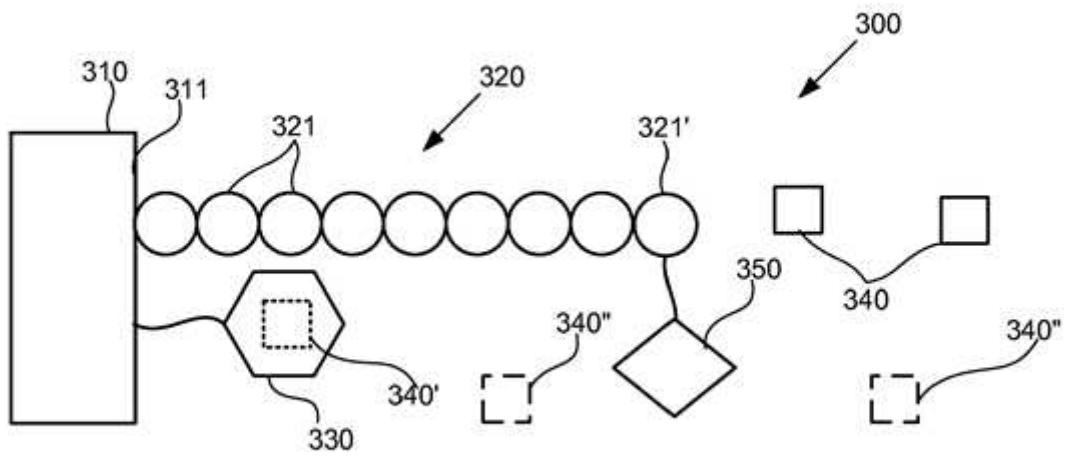


FIG. 3

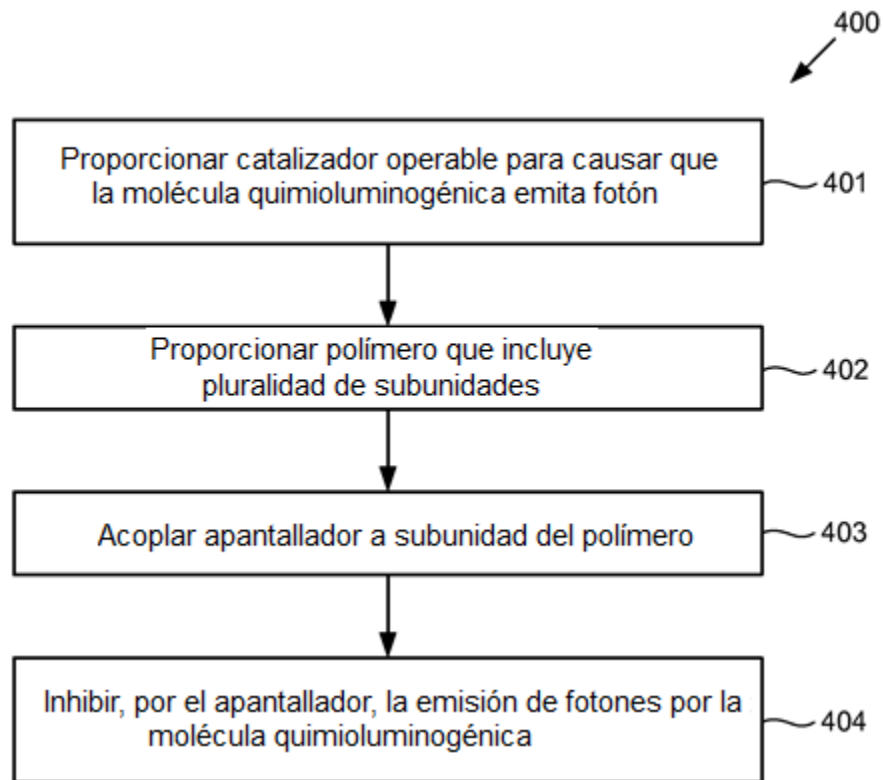


FIG. 4

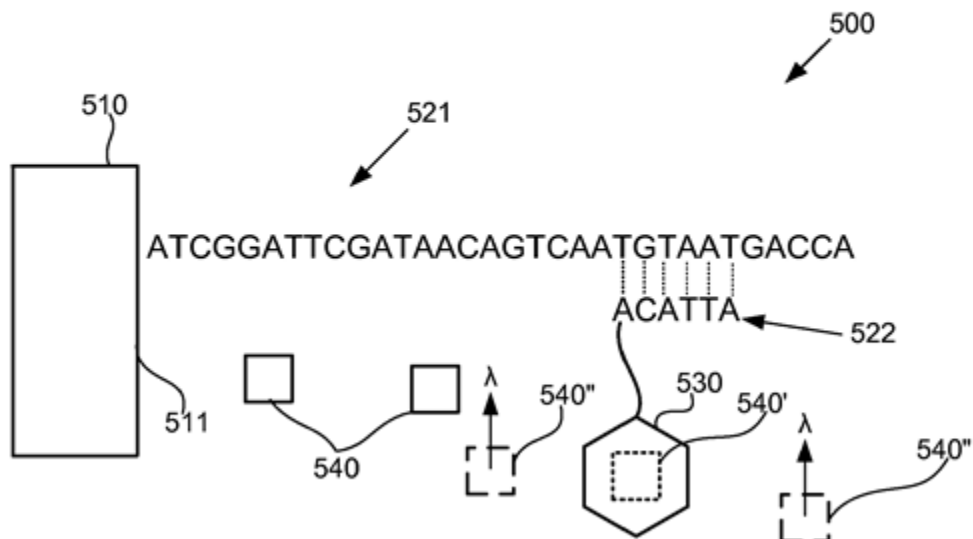


FIG. 5

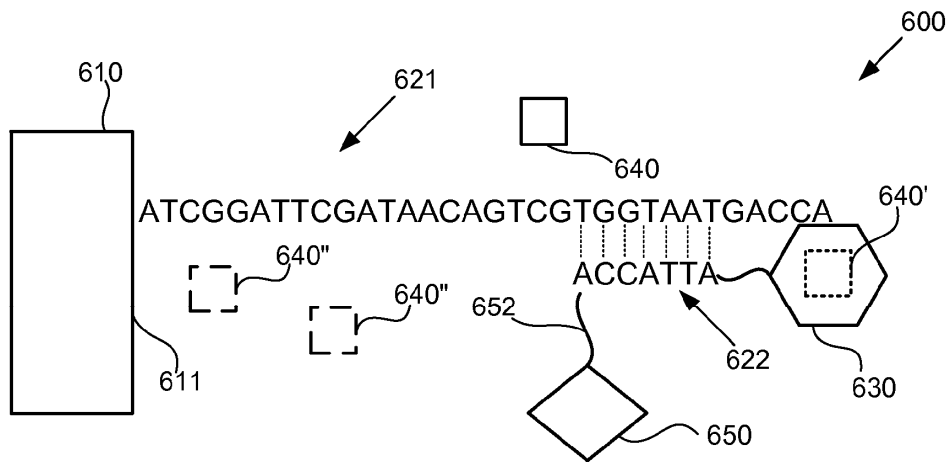


FIG. 6A

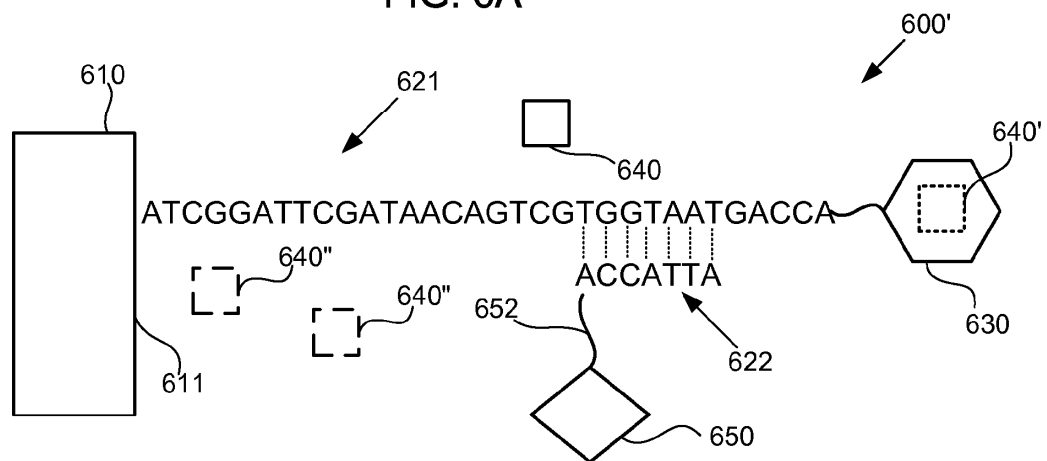


FIG. 6B

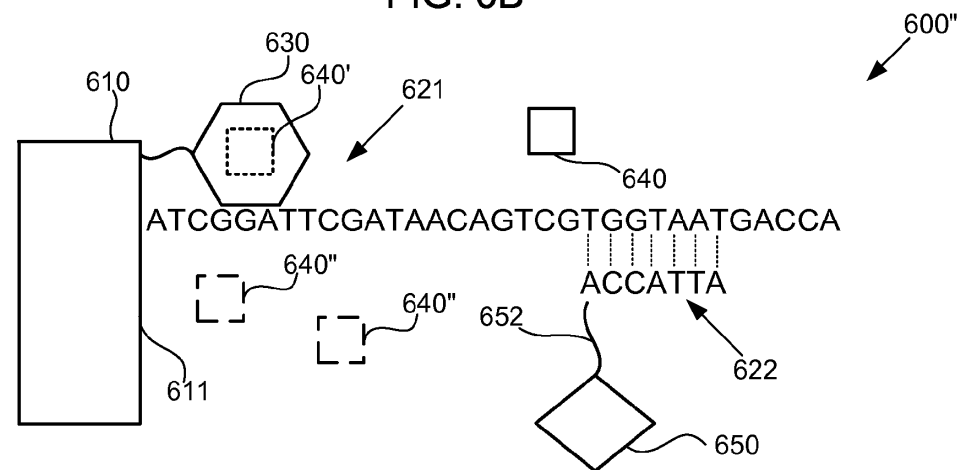


FIG. 6C

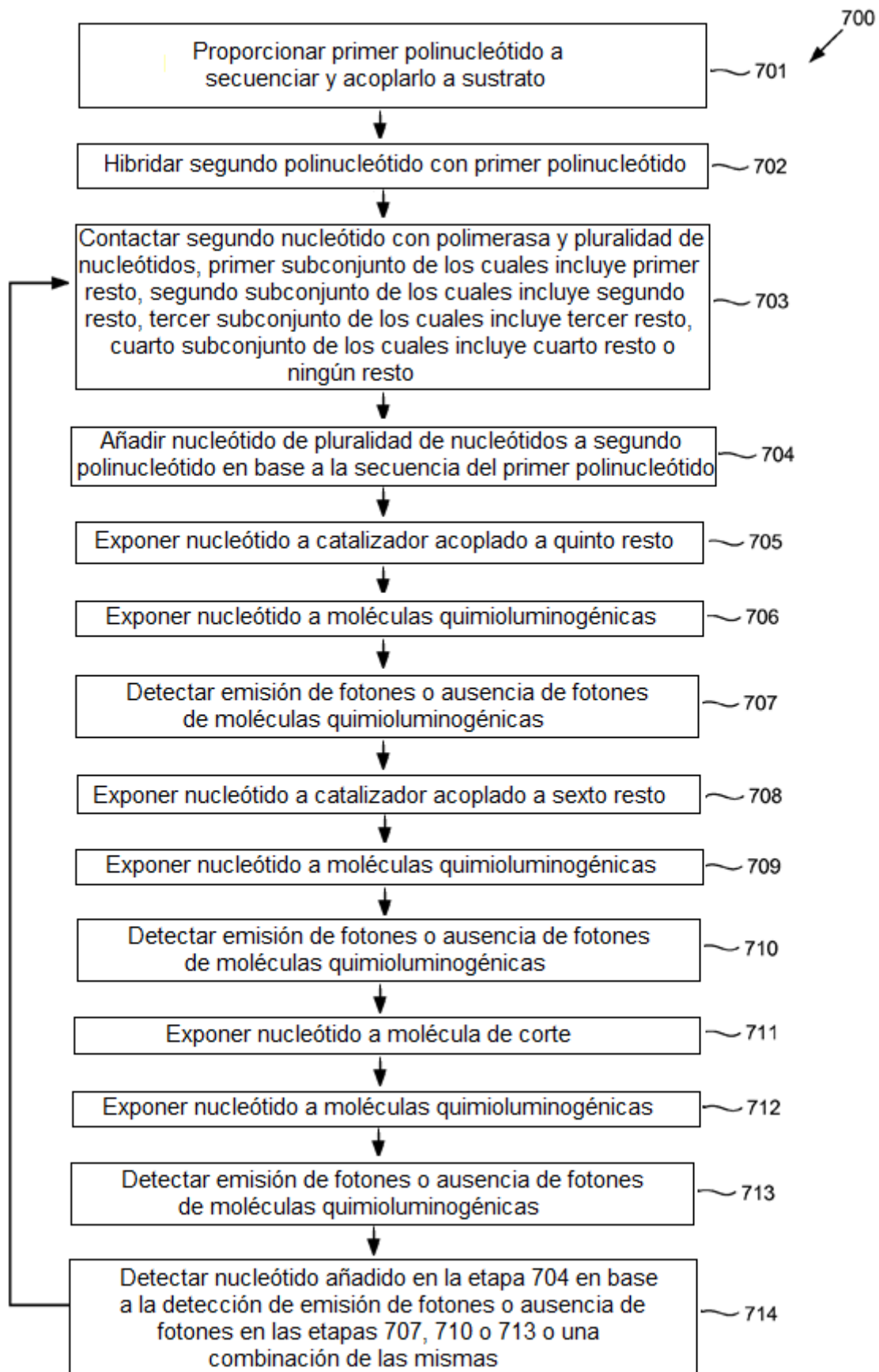


FIG. 7

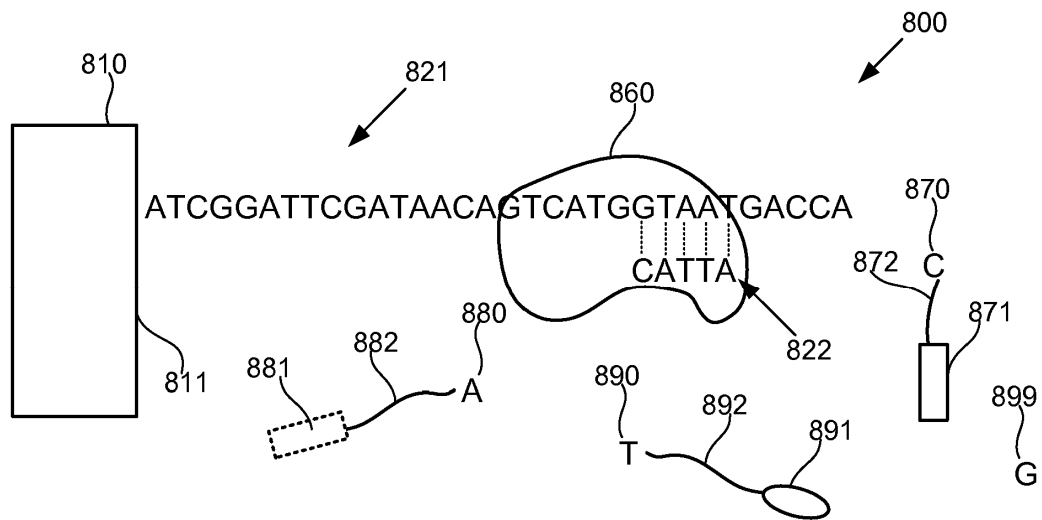


FIG. 8A

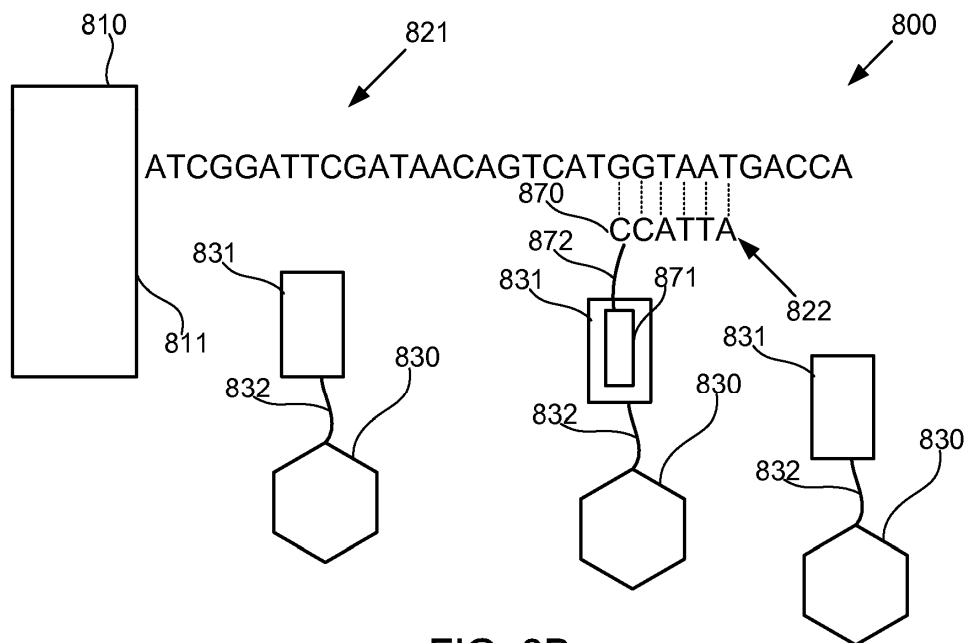


FIG. 8B

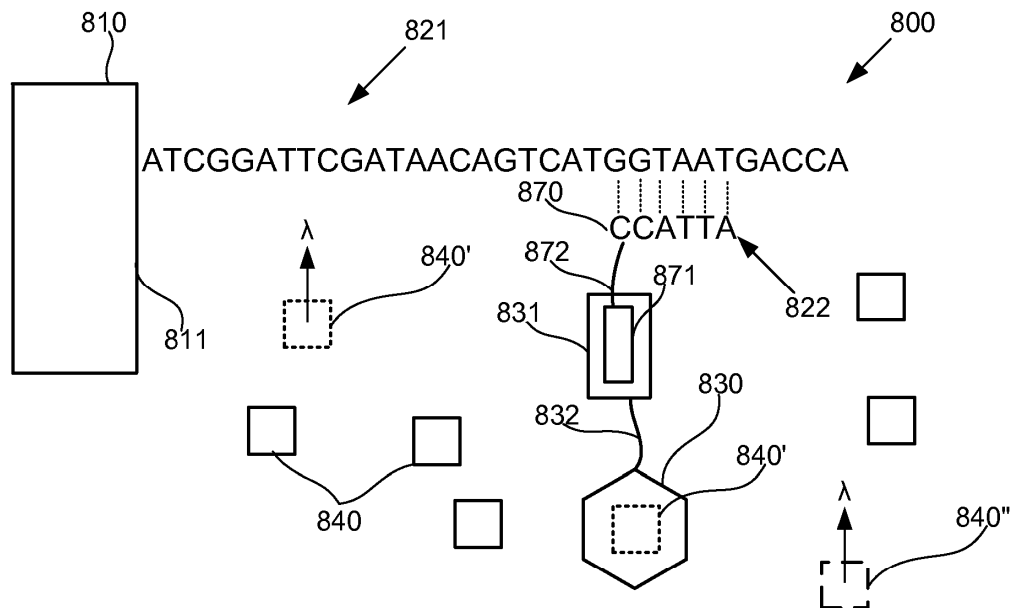


FIG. 8C

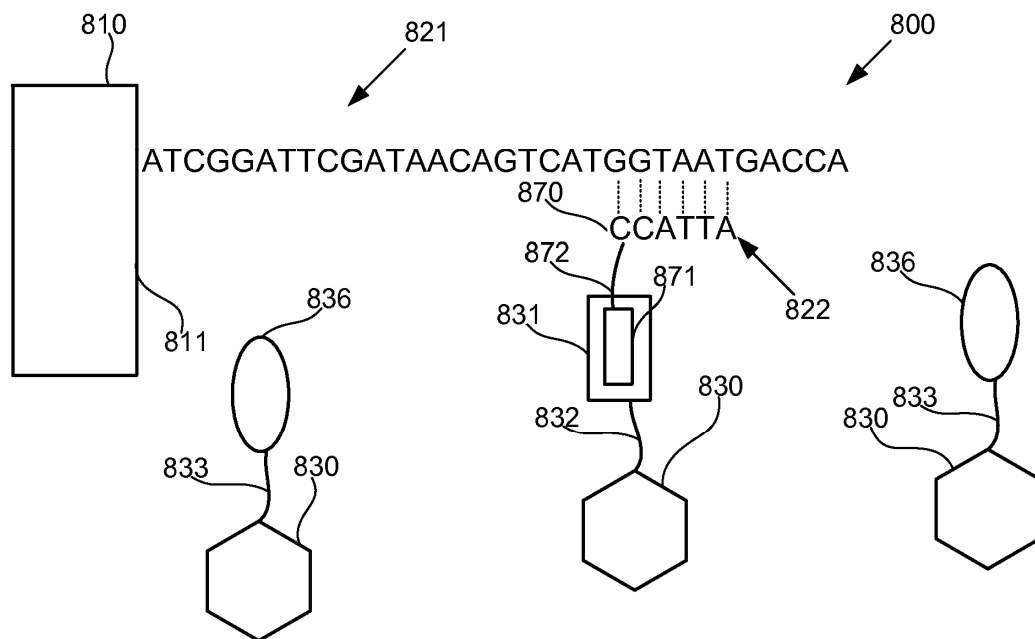


FIG. 8D

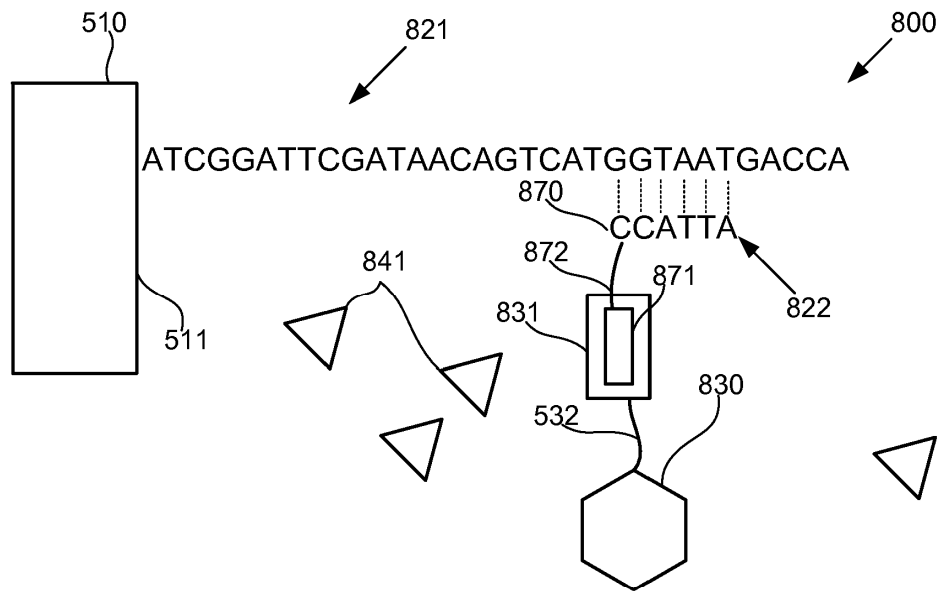


FIG. 8E

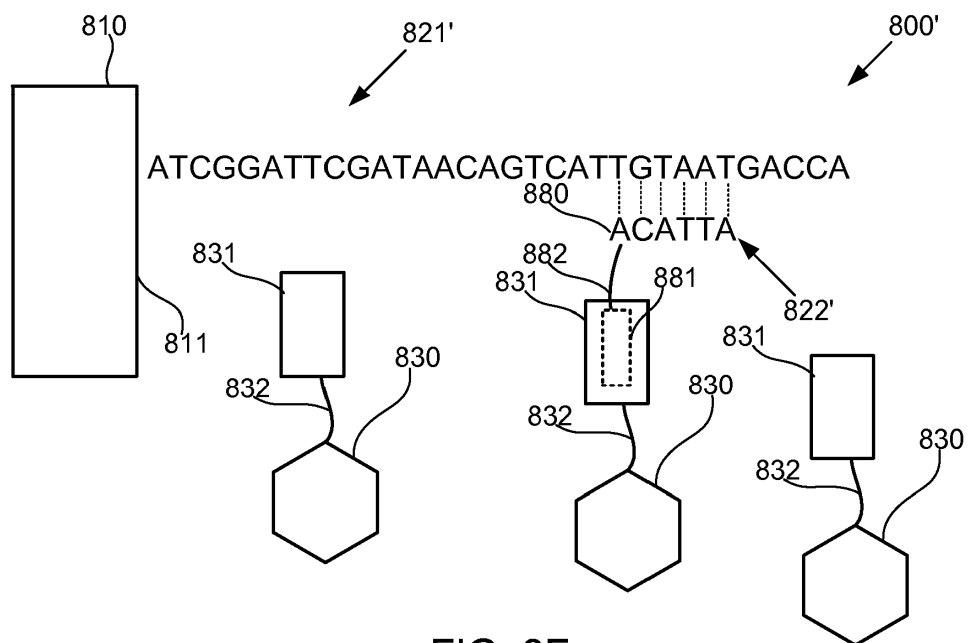


FIG. 8F

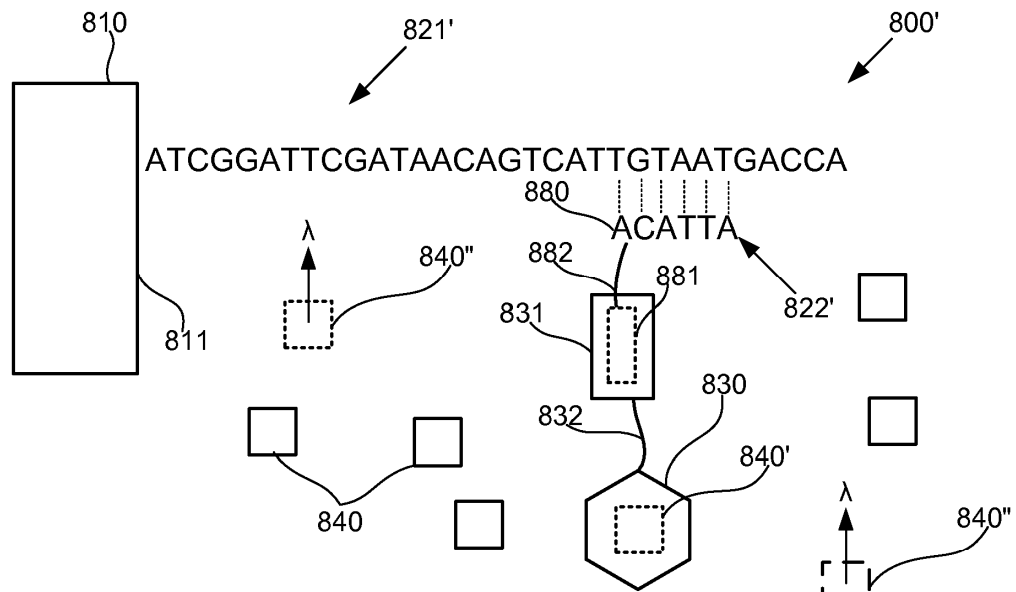


FIG. 8G

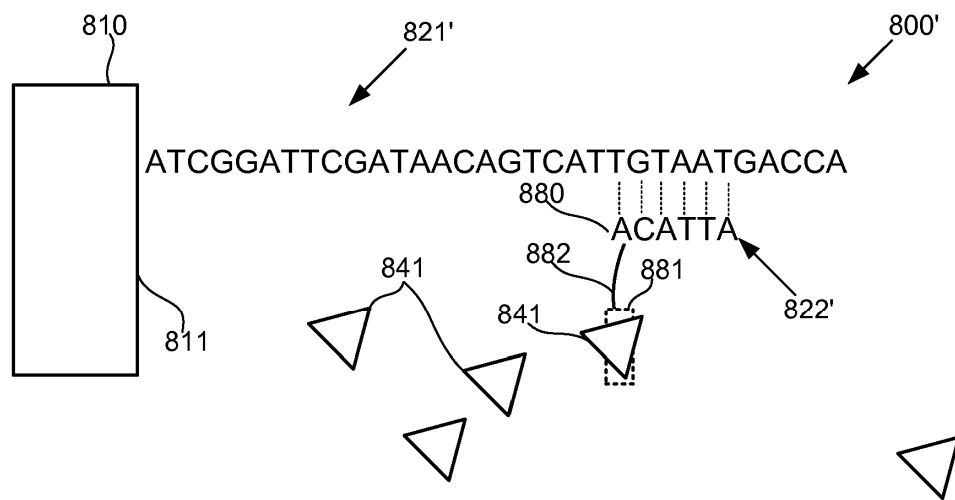


FIG. 8H

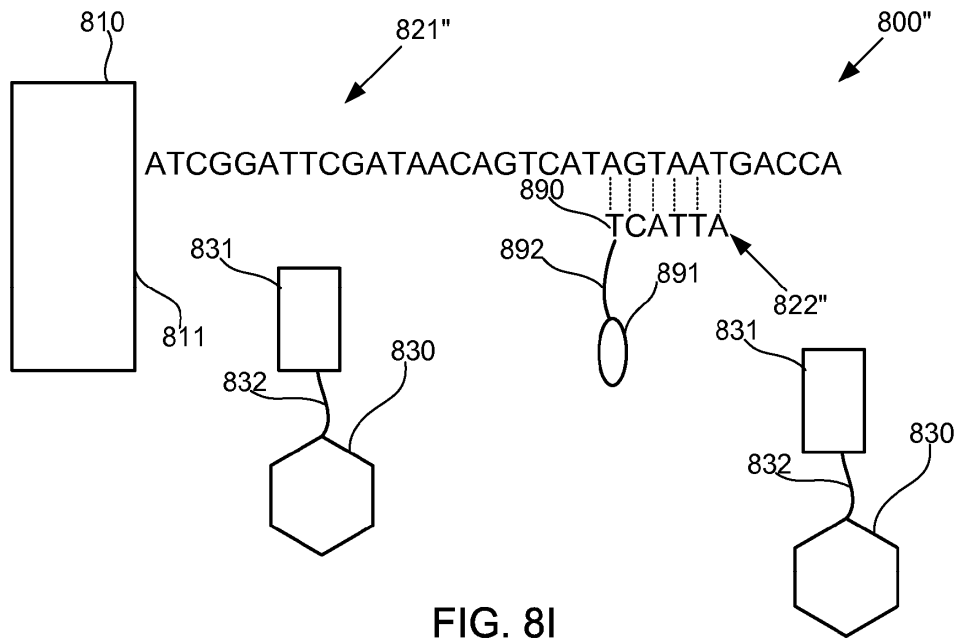


FIG. 8I

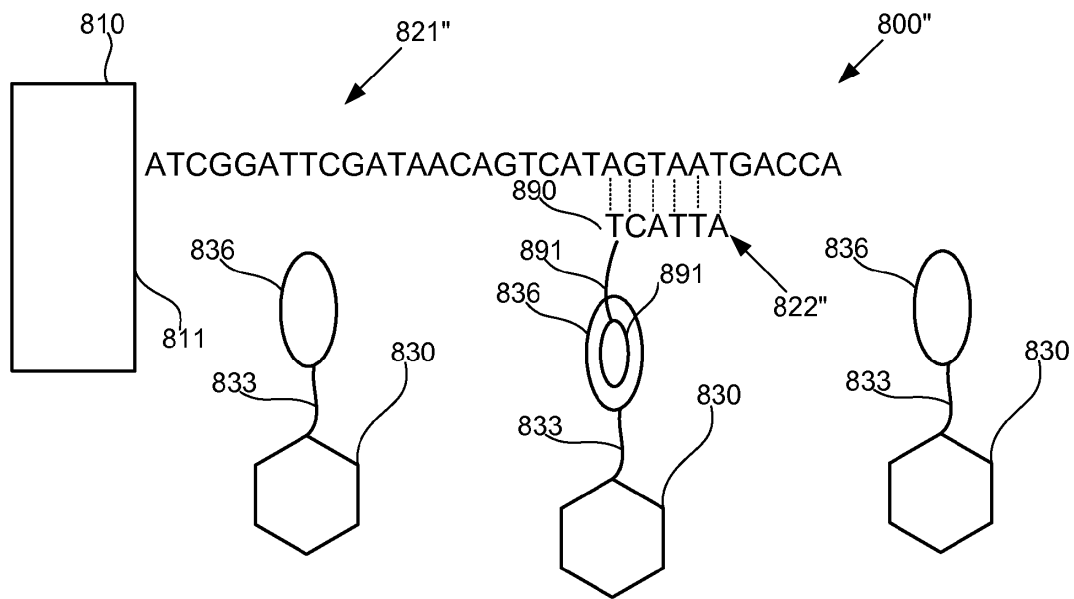


FIG. 8J

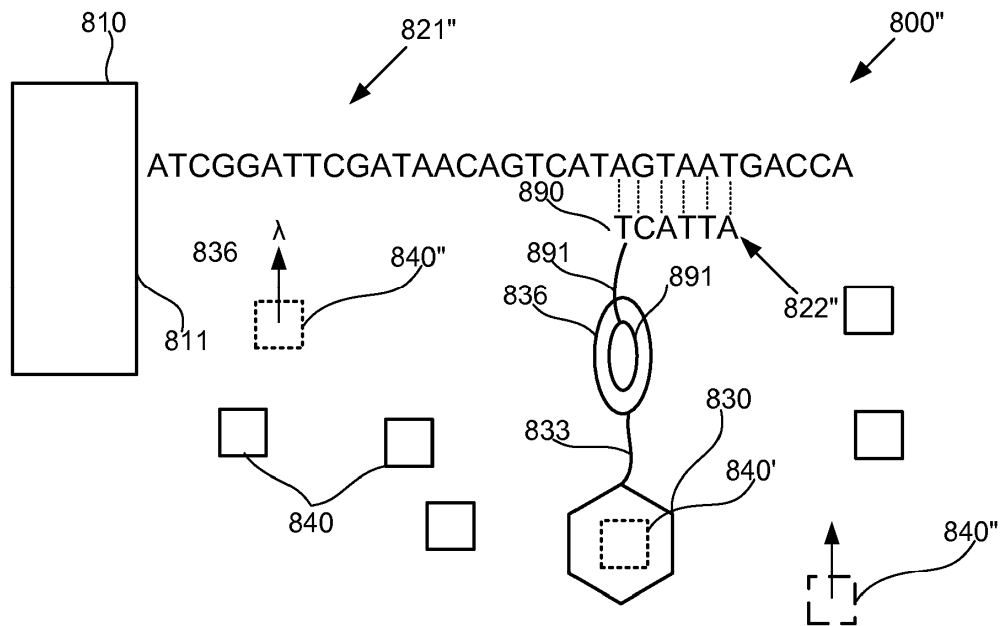


FIG. 8K

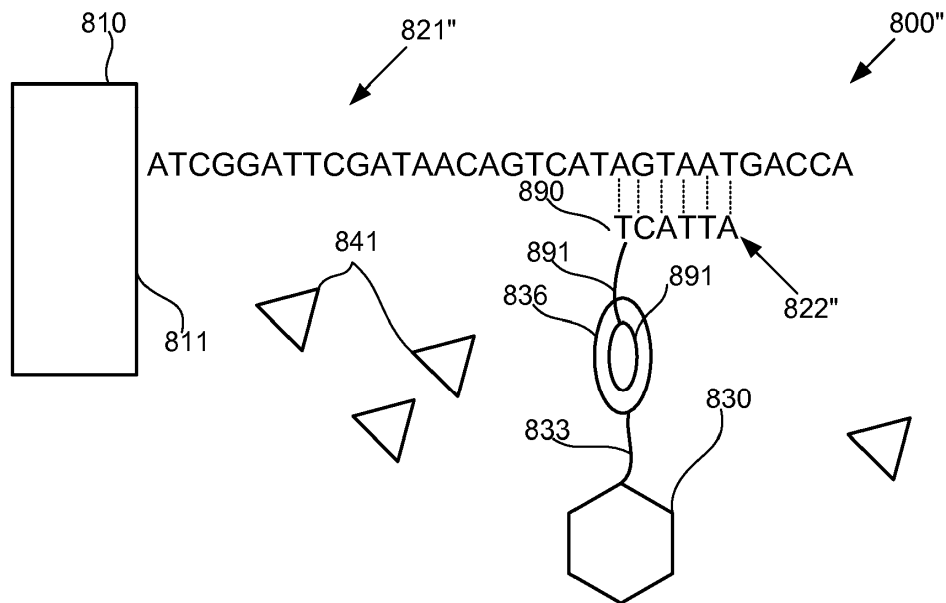


FIG. 8L

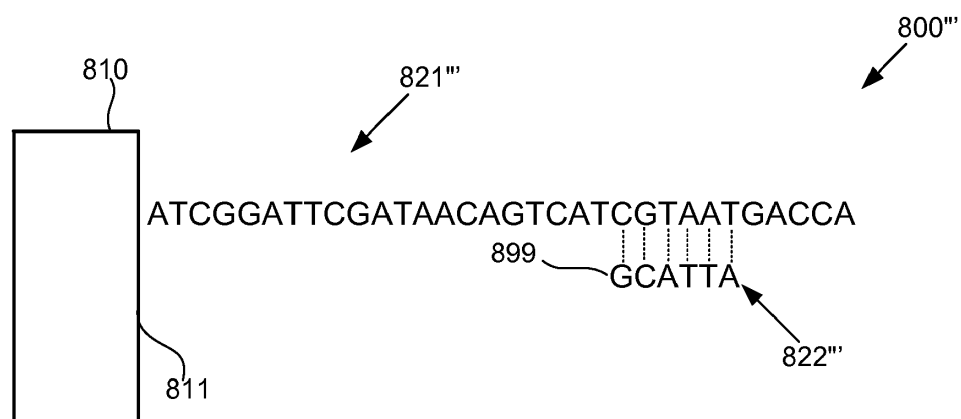


FIG. 8M

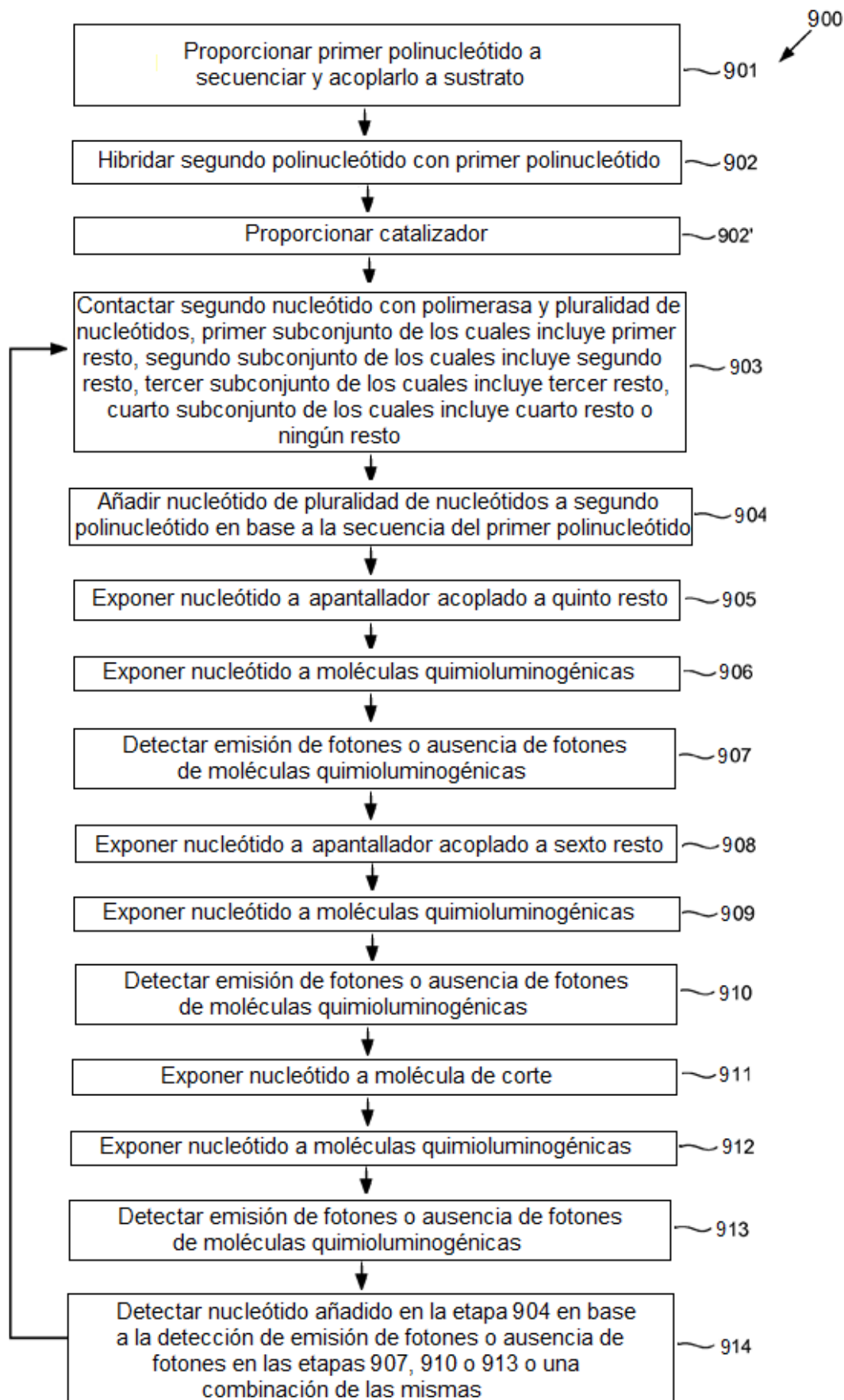
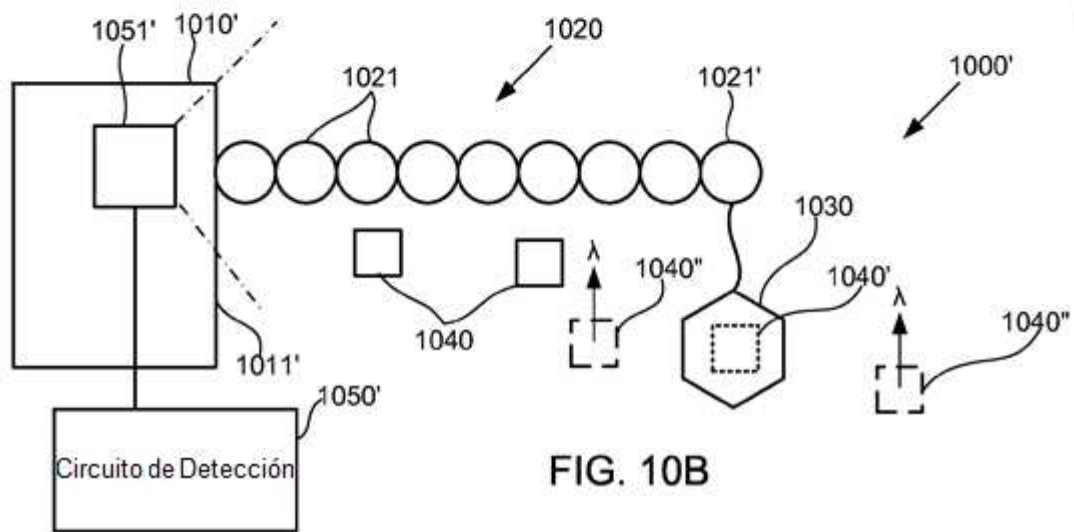
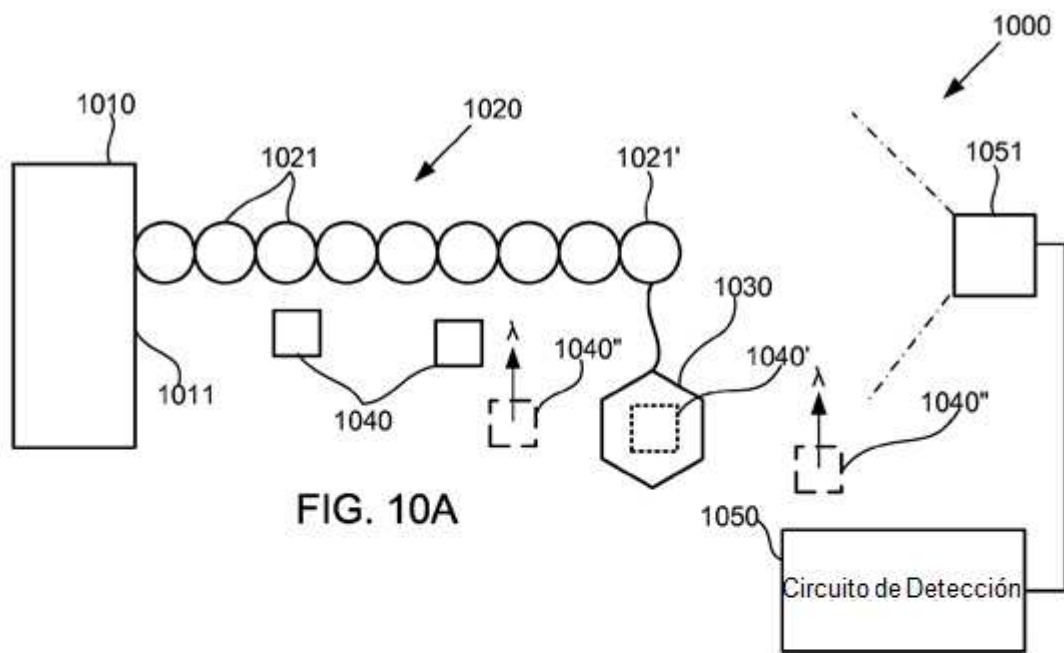
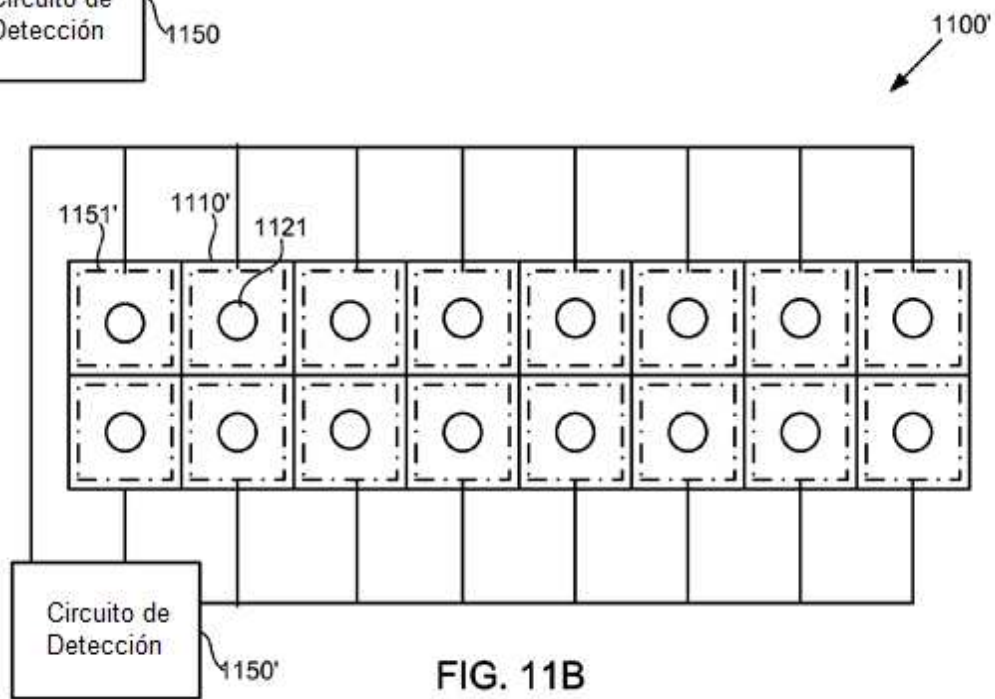
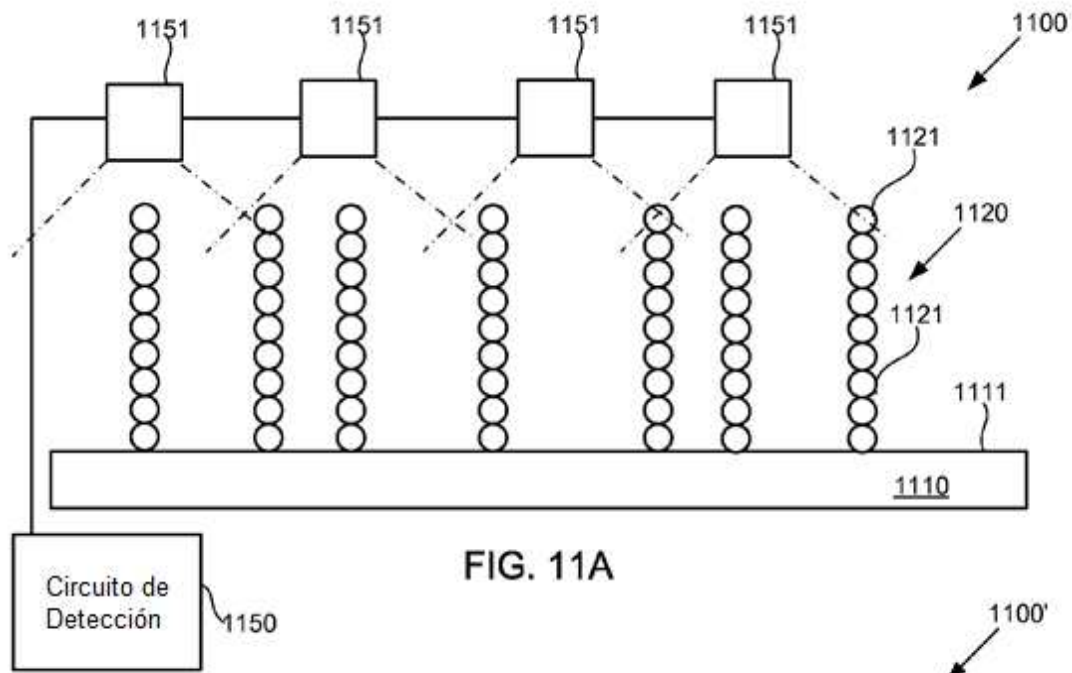


FIG. 9





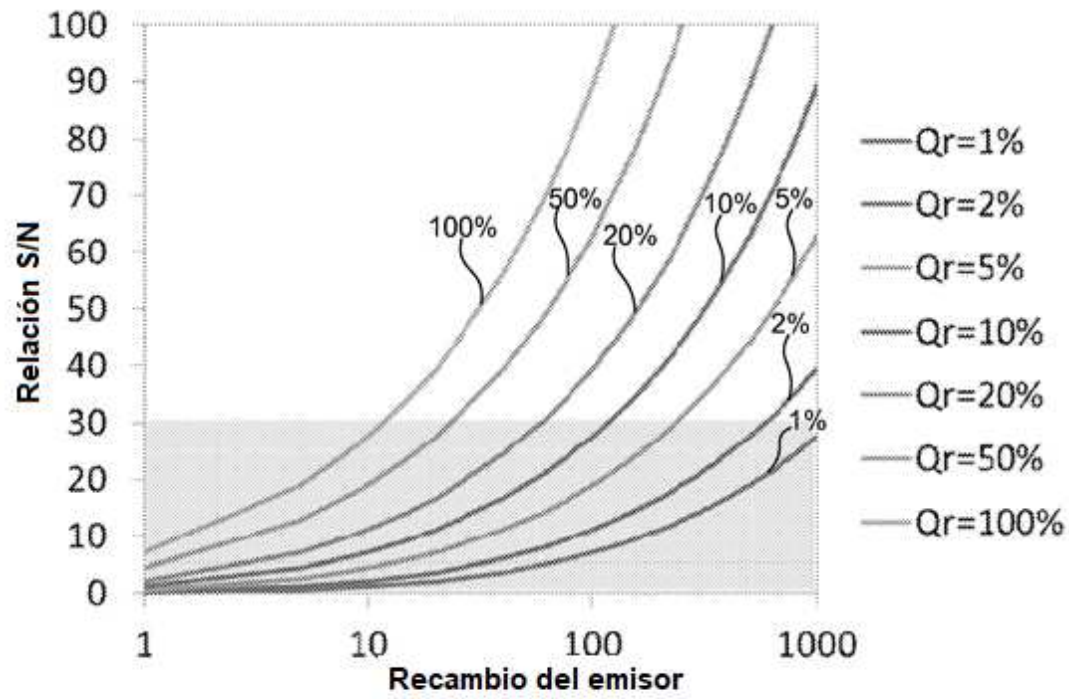


FIG. 12

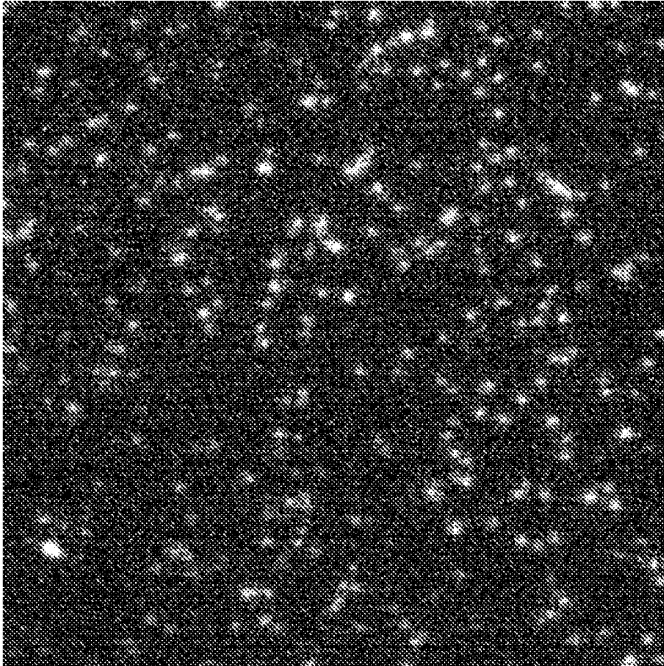


FIG. 13A

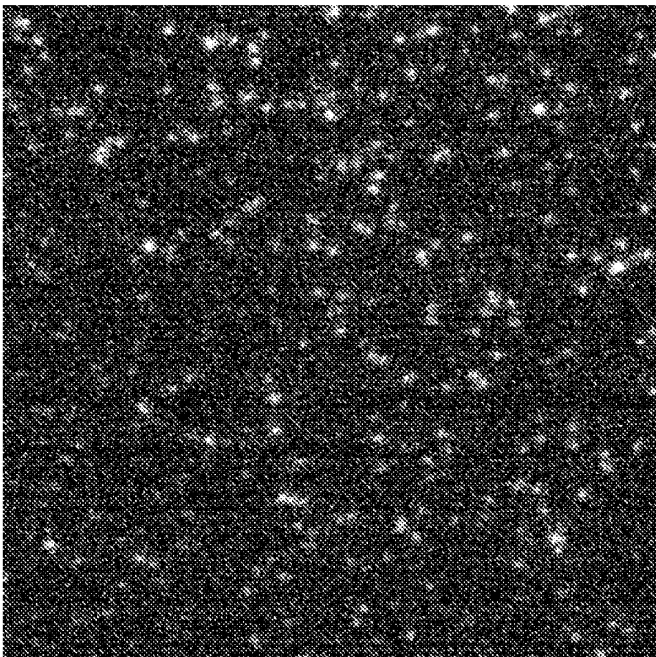


FIG. 13B

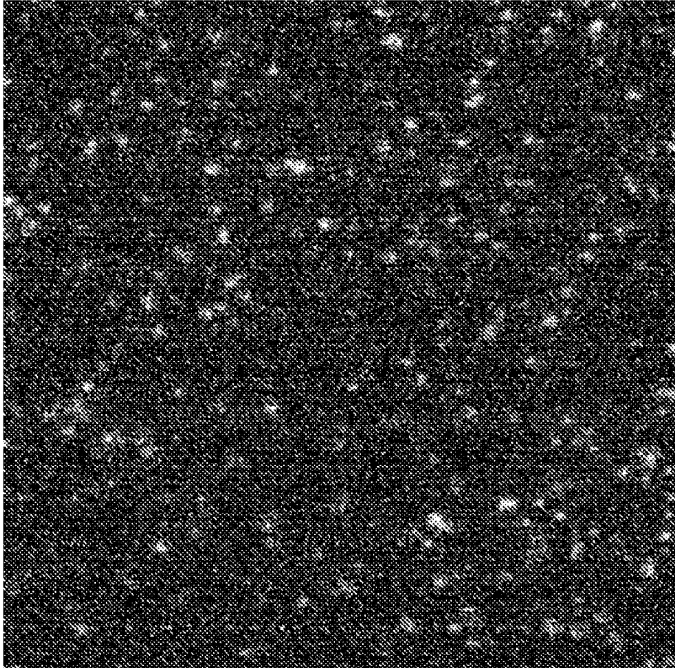


FIG. 13C

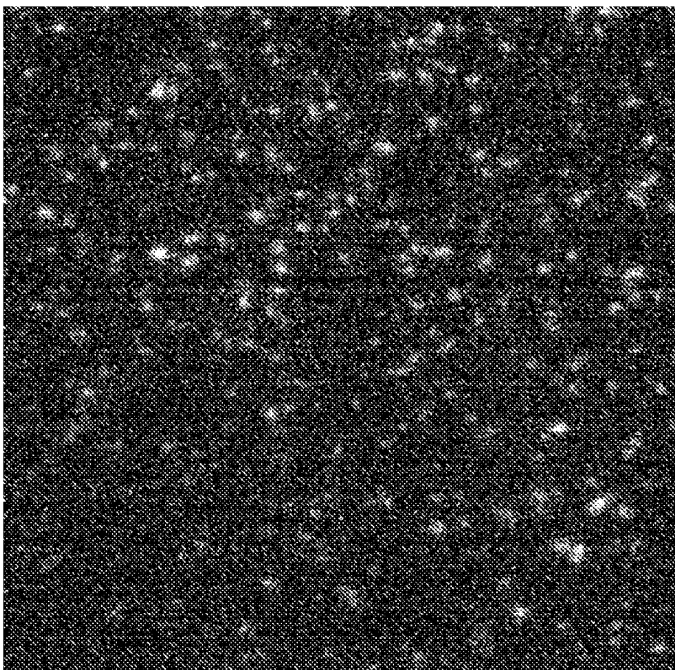


FIG. 13D

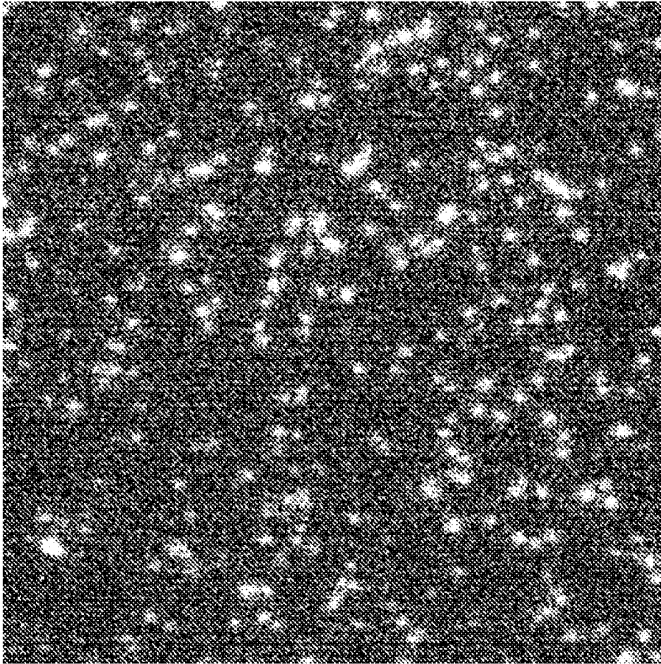


FIG. 13E

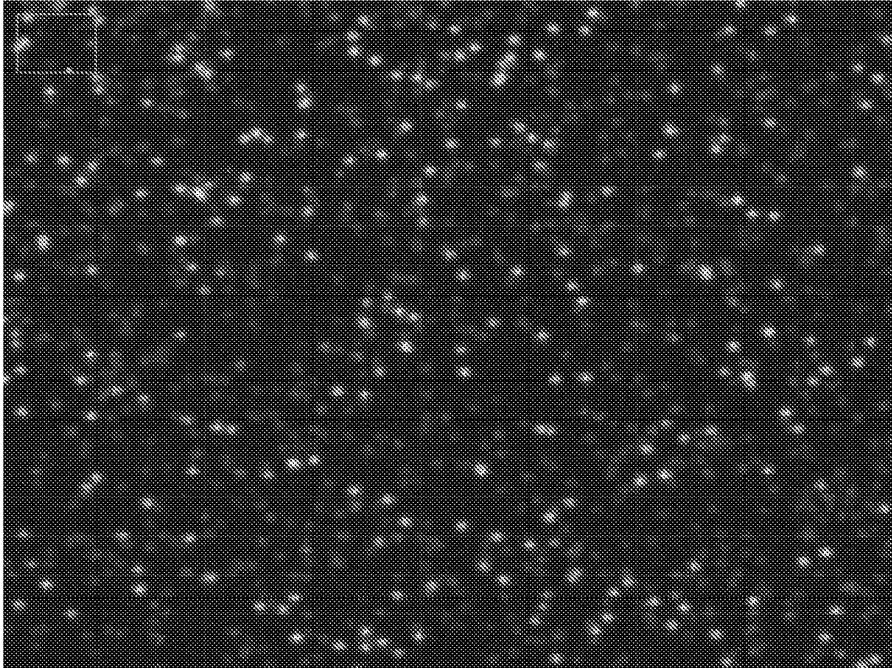


FIG. 14A

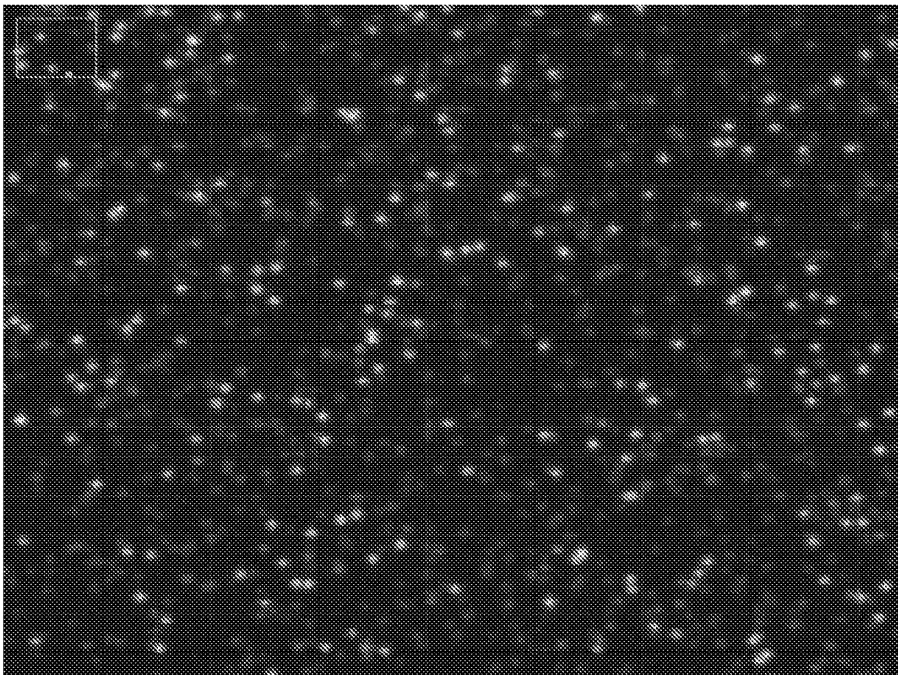


FIG. 14B

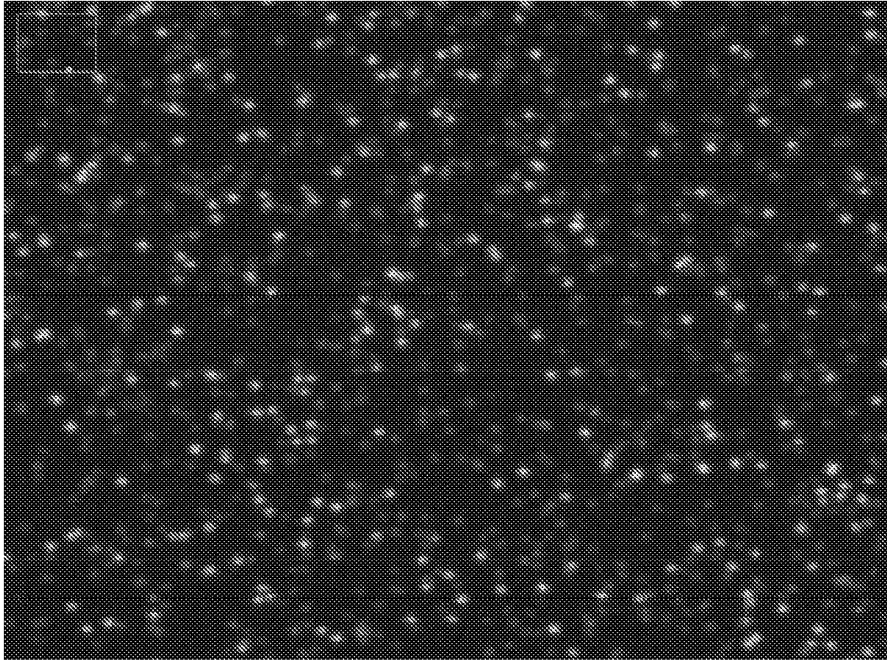


FIG. 14C

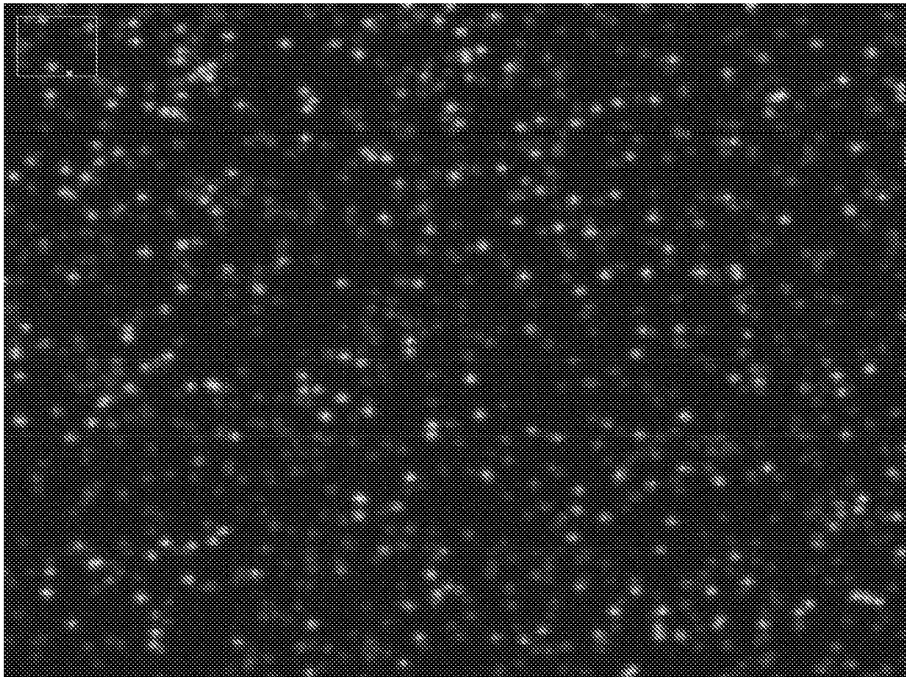


FIG. 14D

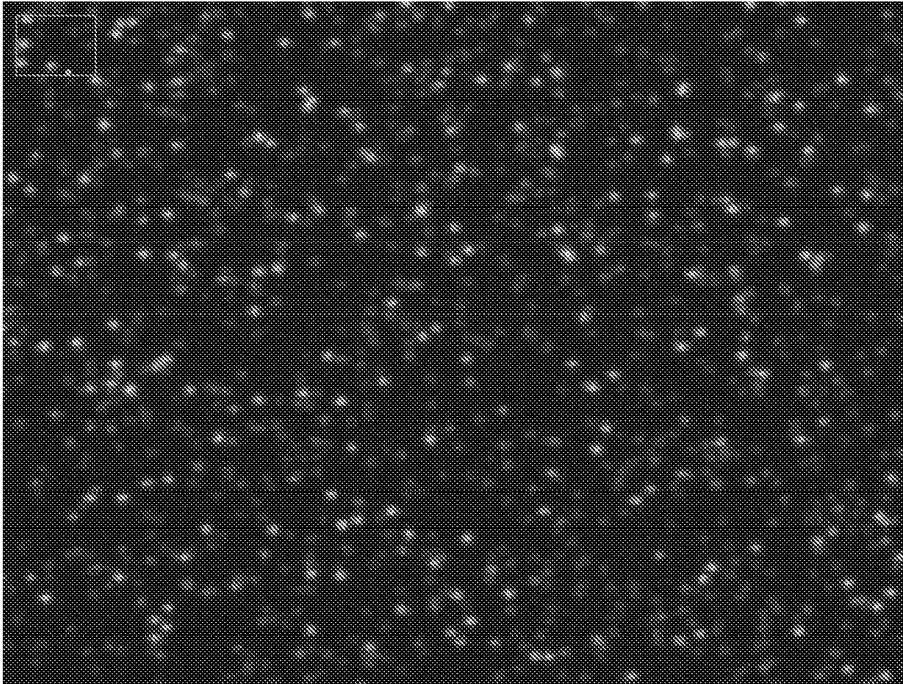


FIG. 14E

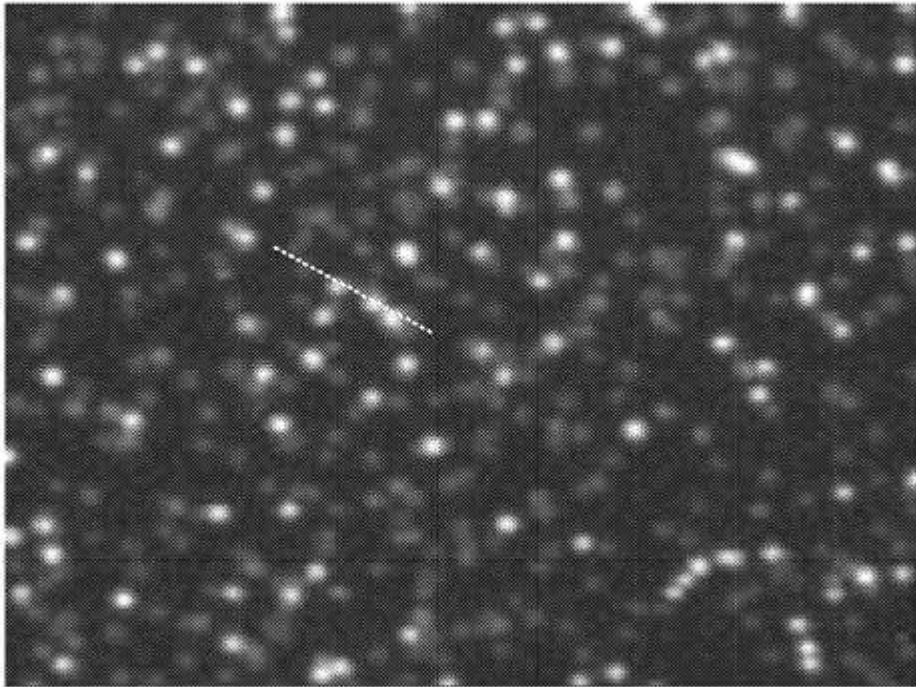


FIG. 15A

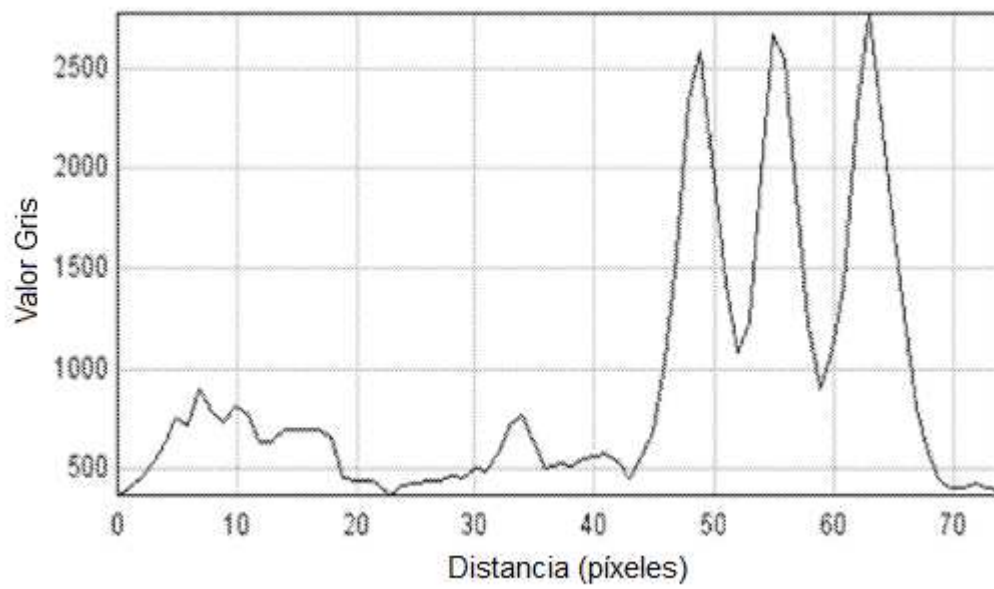


FIG. 15B

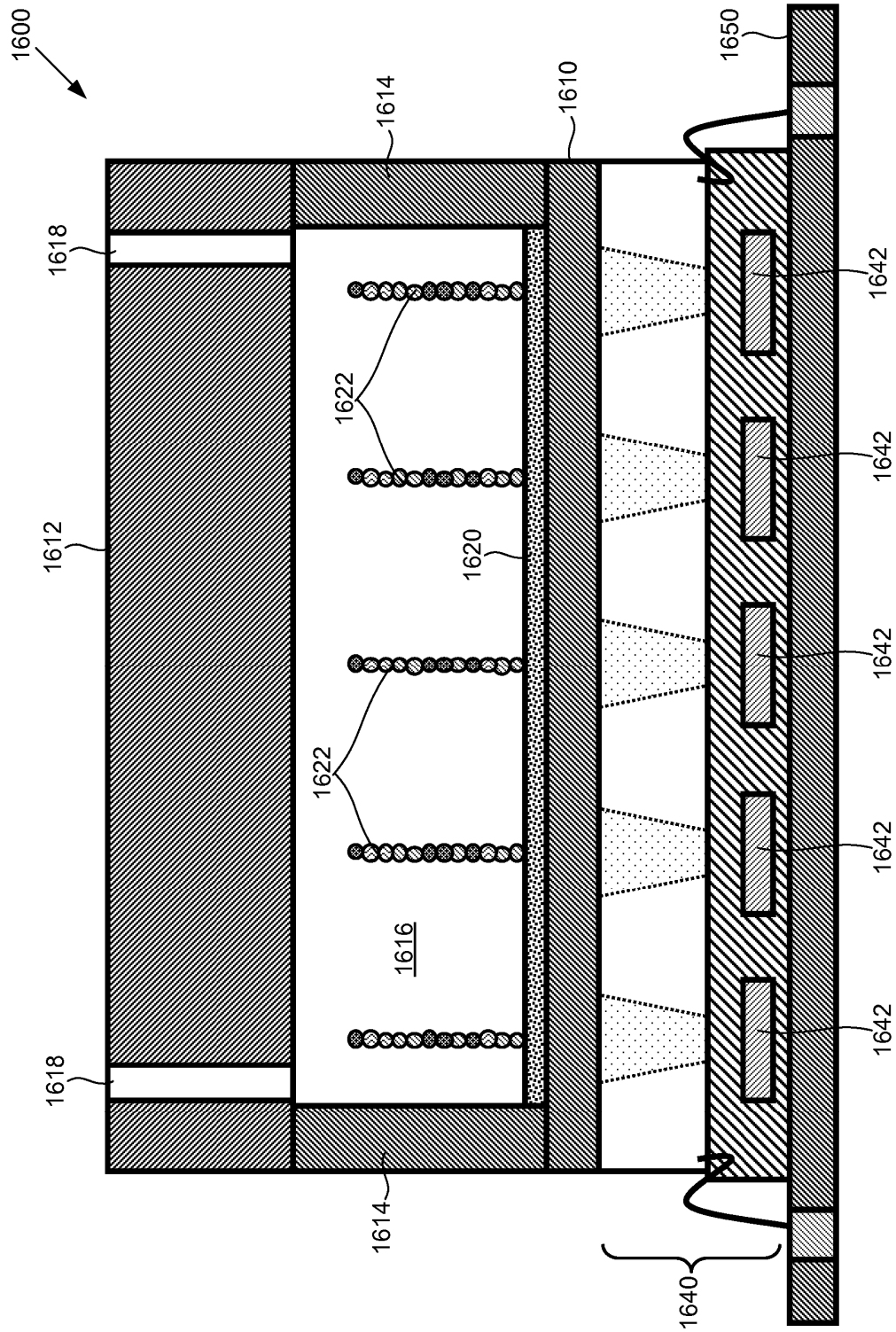


FIG. 16

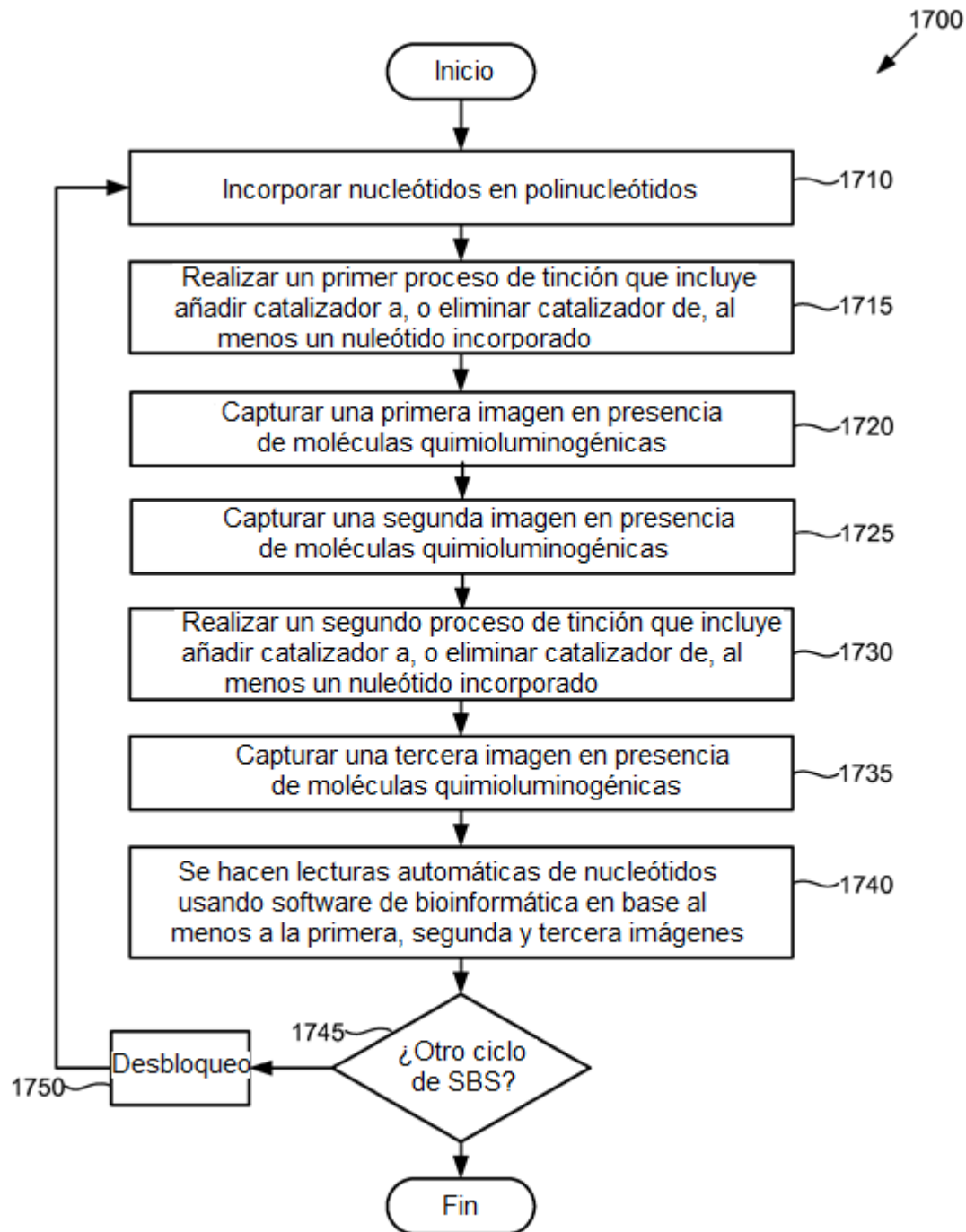


FIG. 17

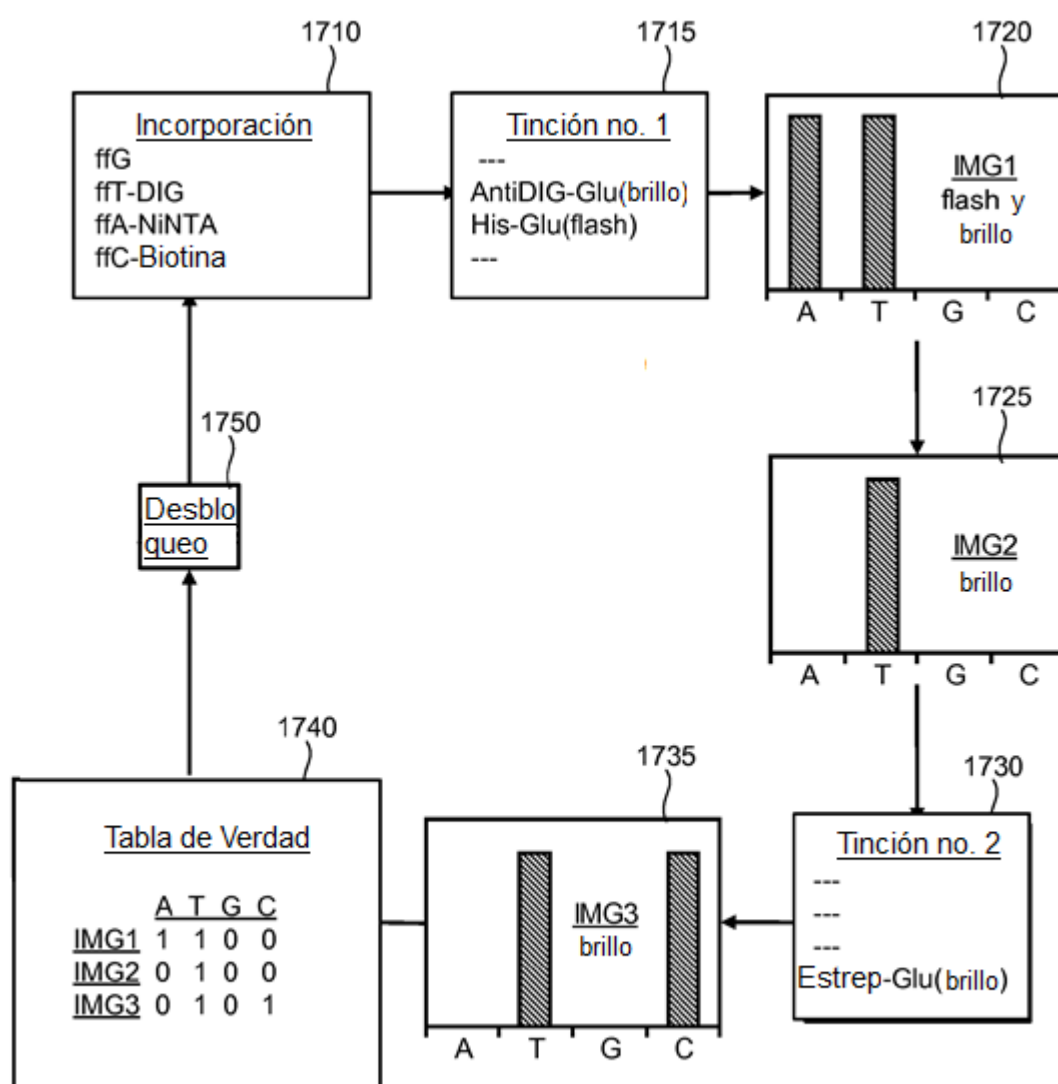


FIG. 18

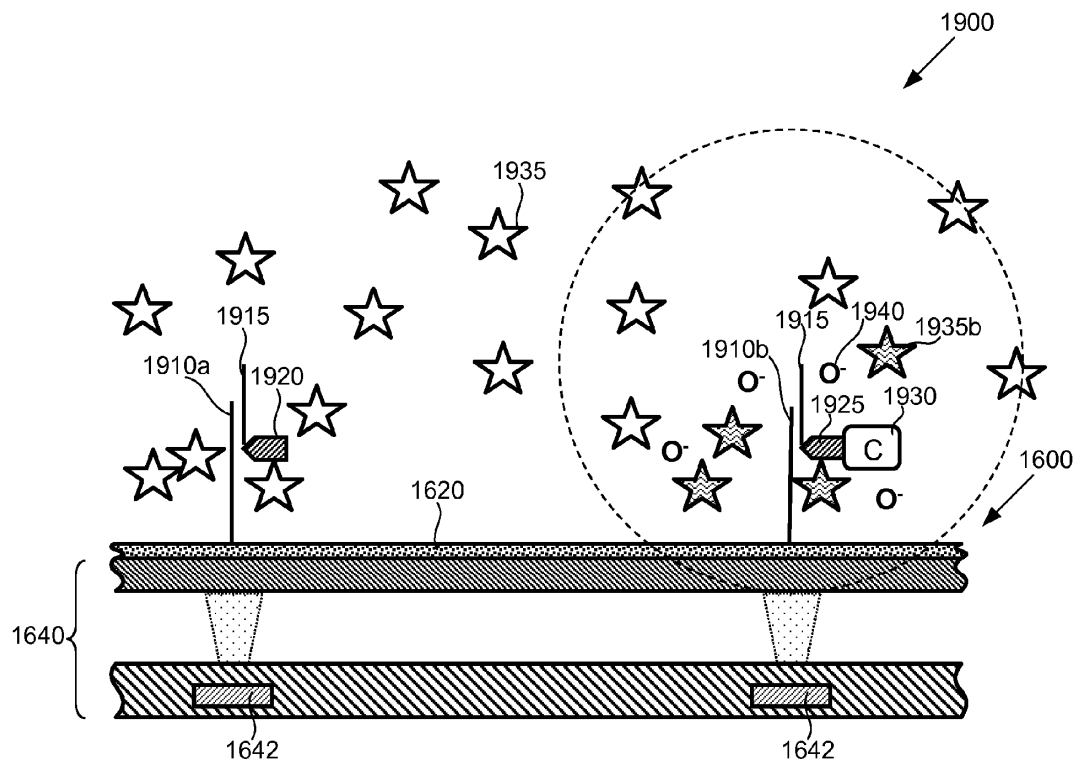


FIG. 19

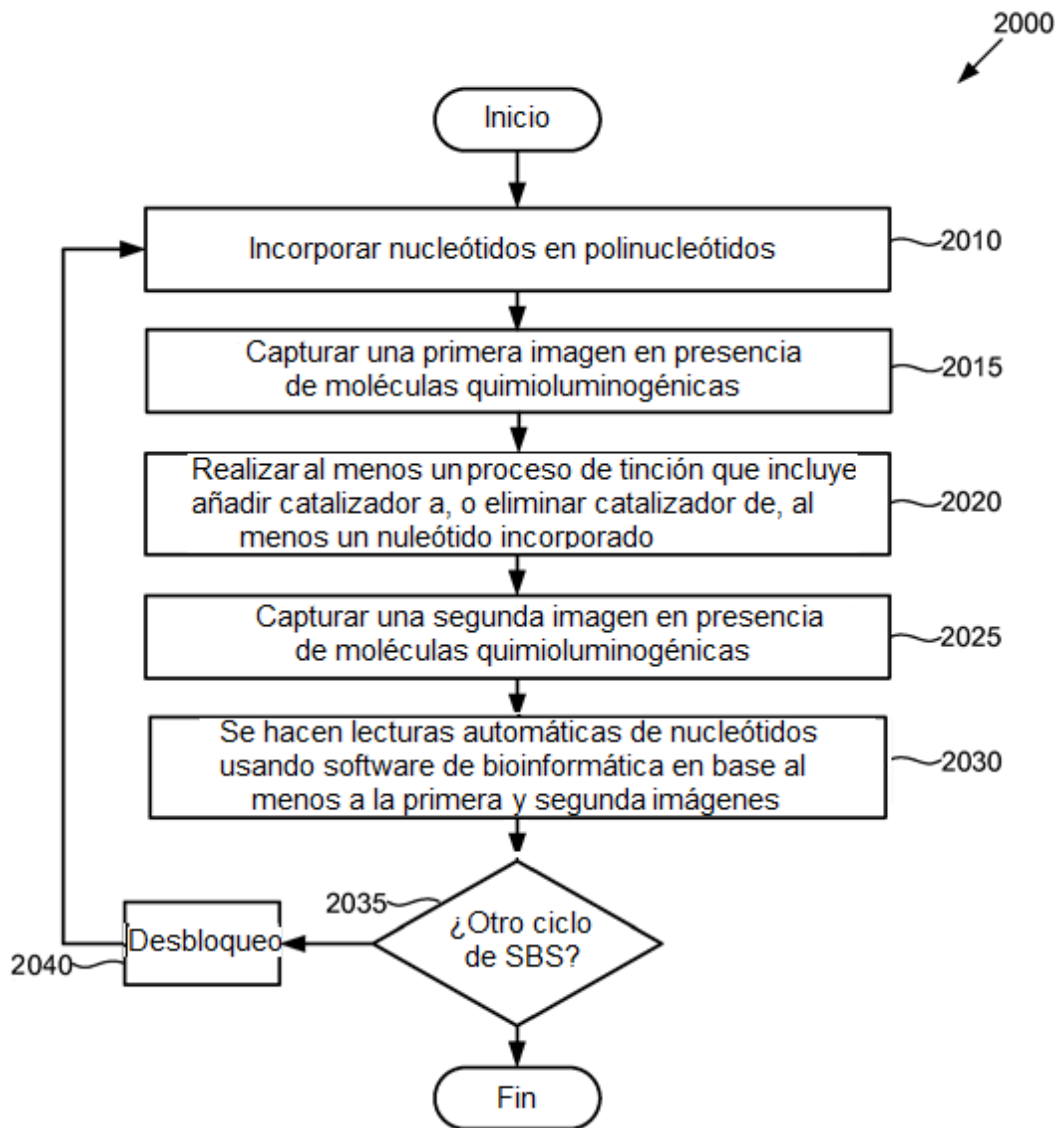


FIG. 20

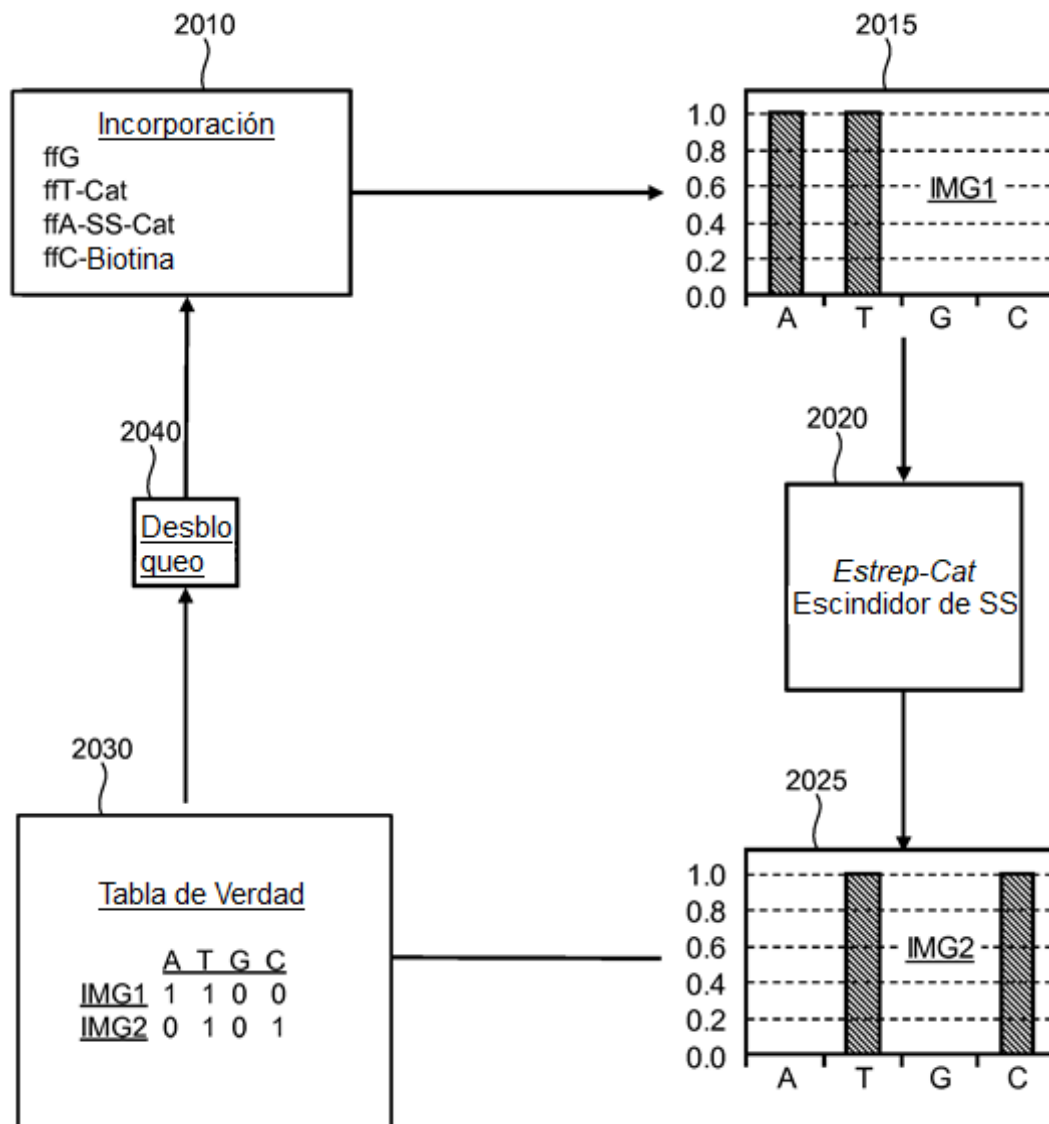
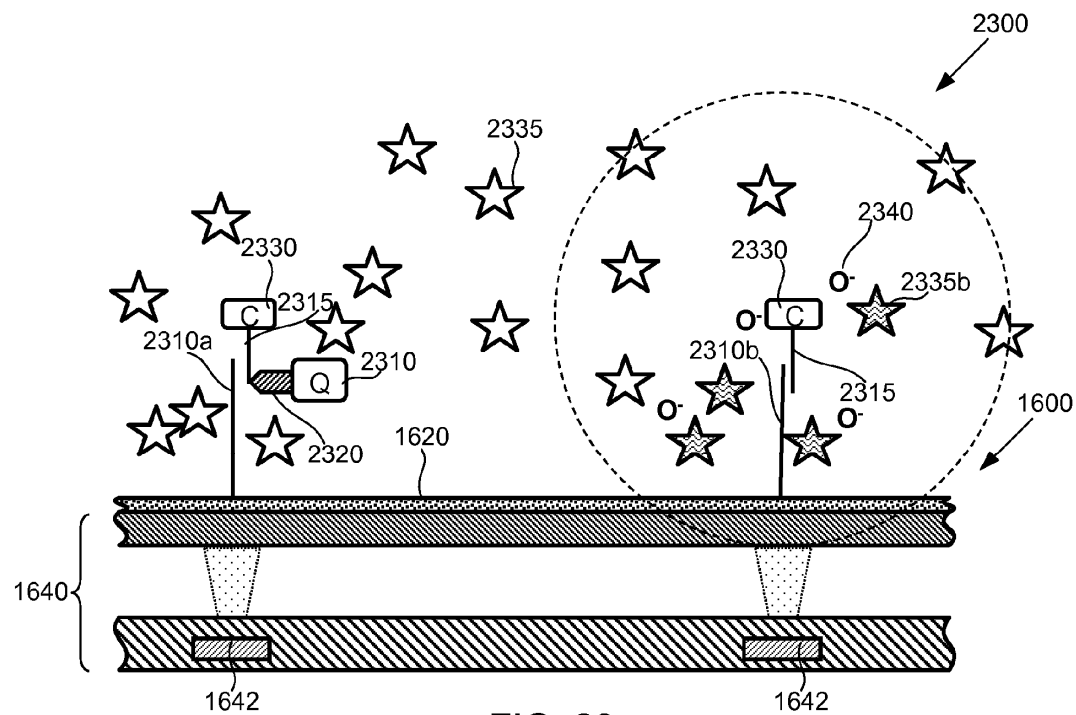
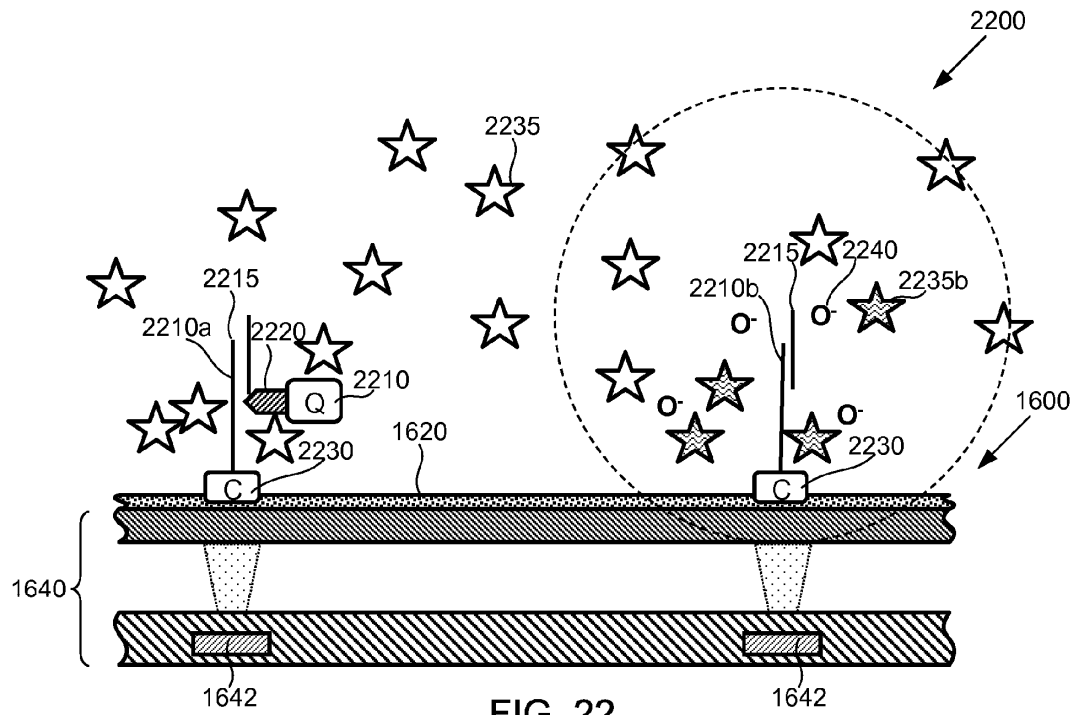


FIG. 21



2400

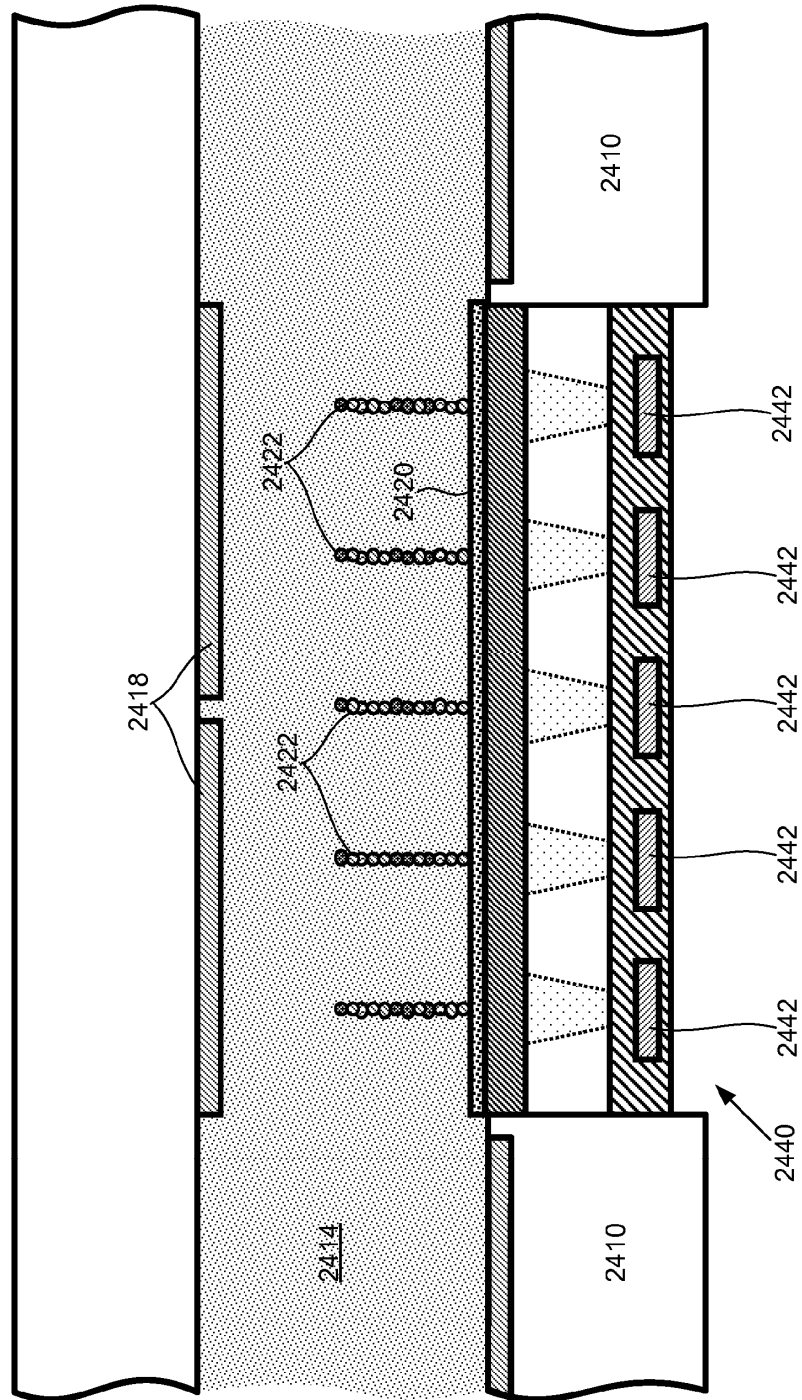


FIG. 24

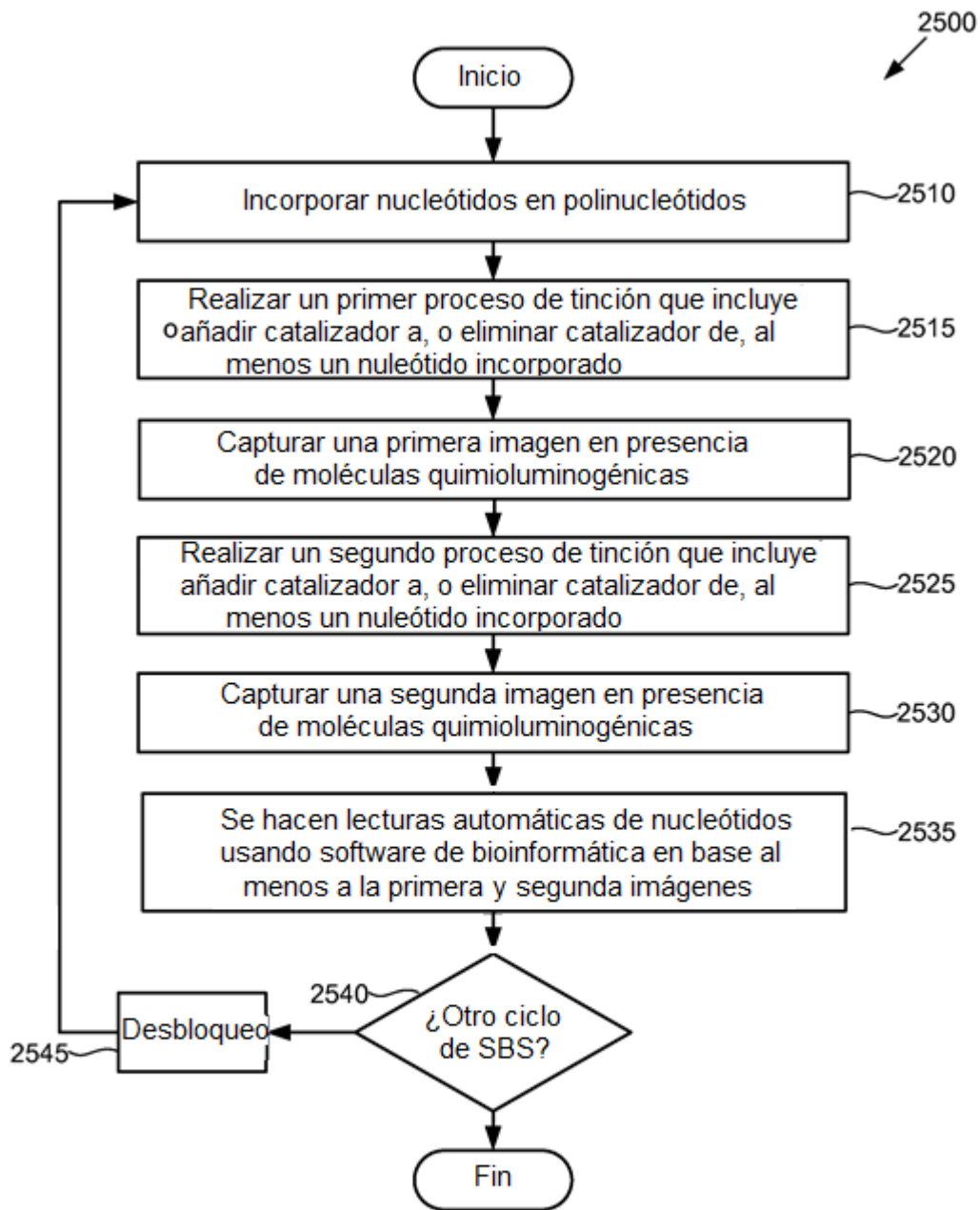


FIG. 25

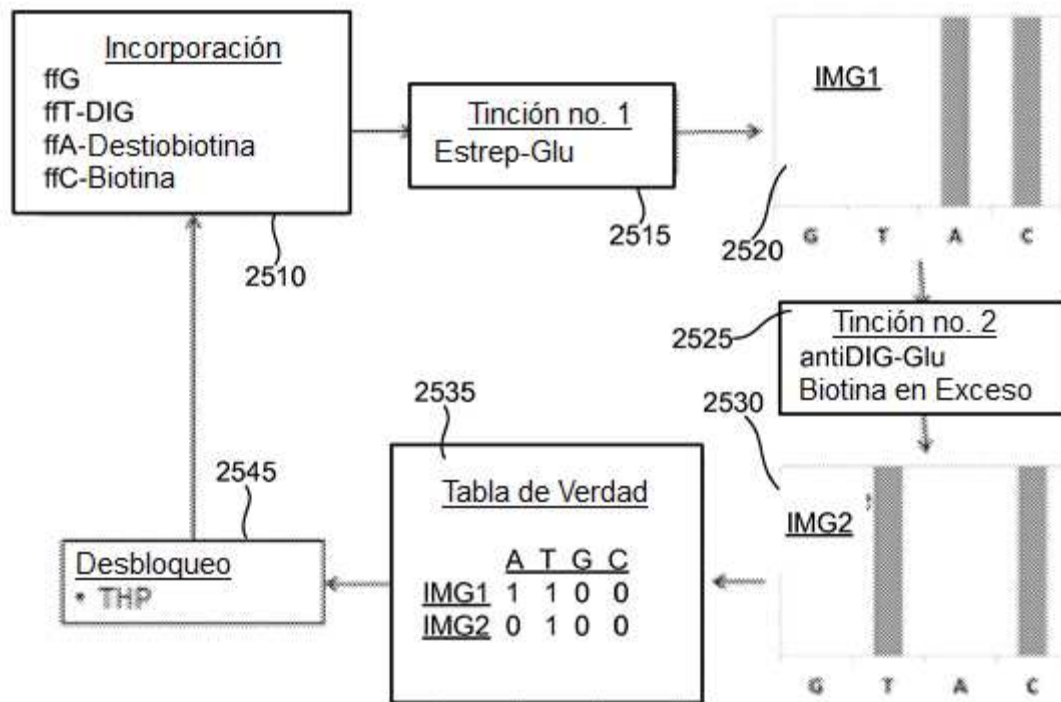


FIG. 26

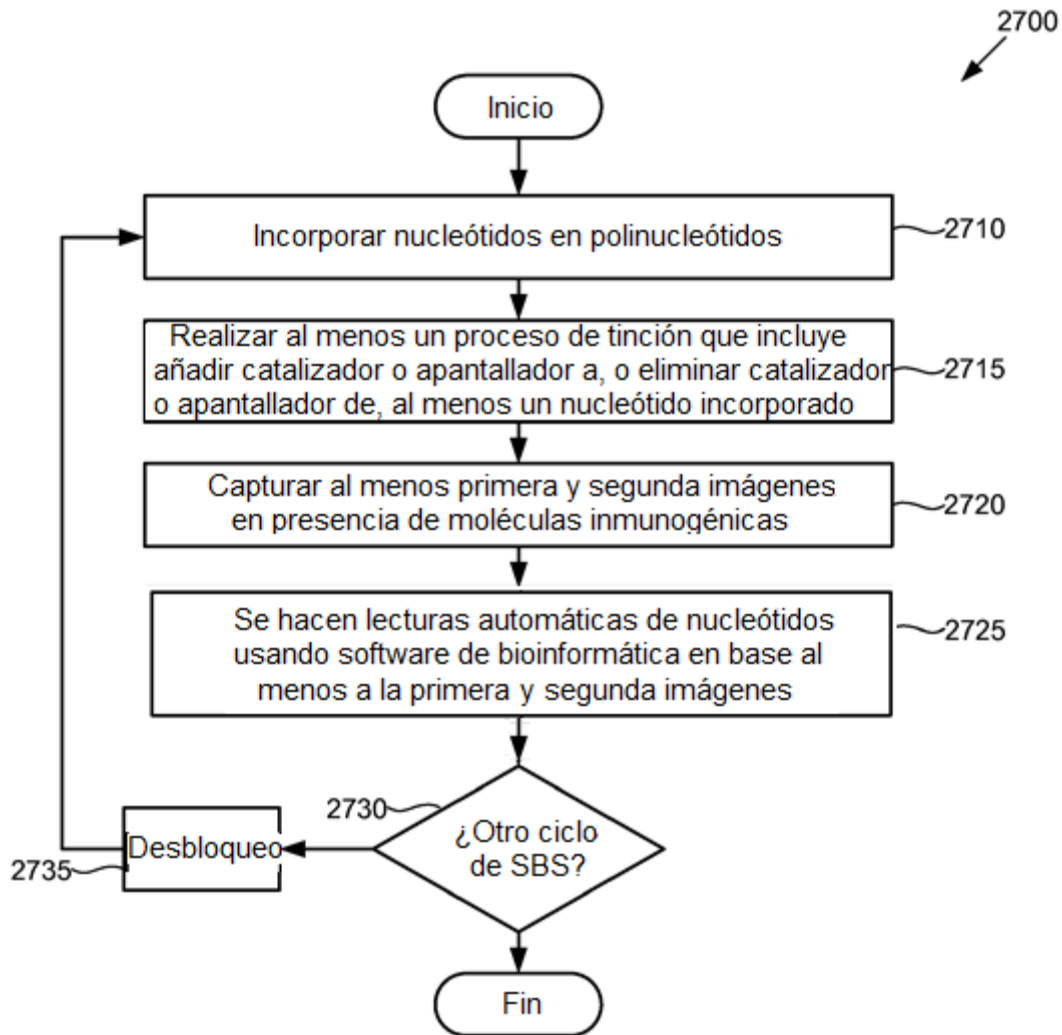


FIG. 27

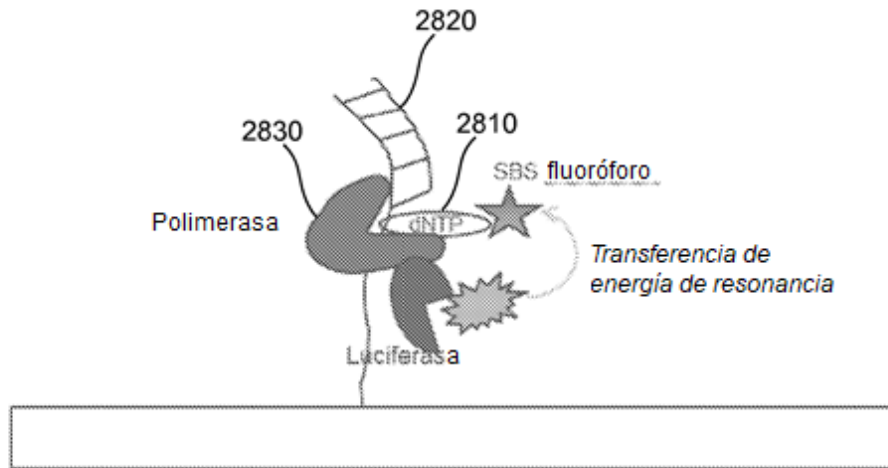


FIG. 28

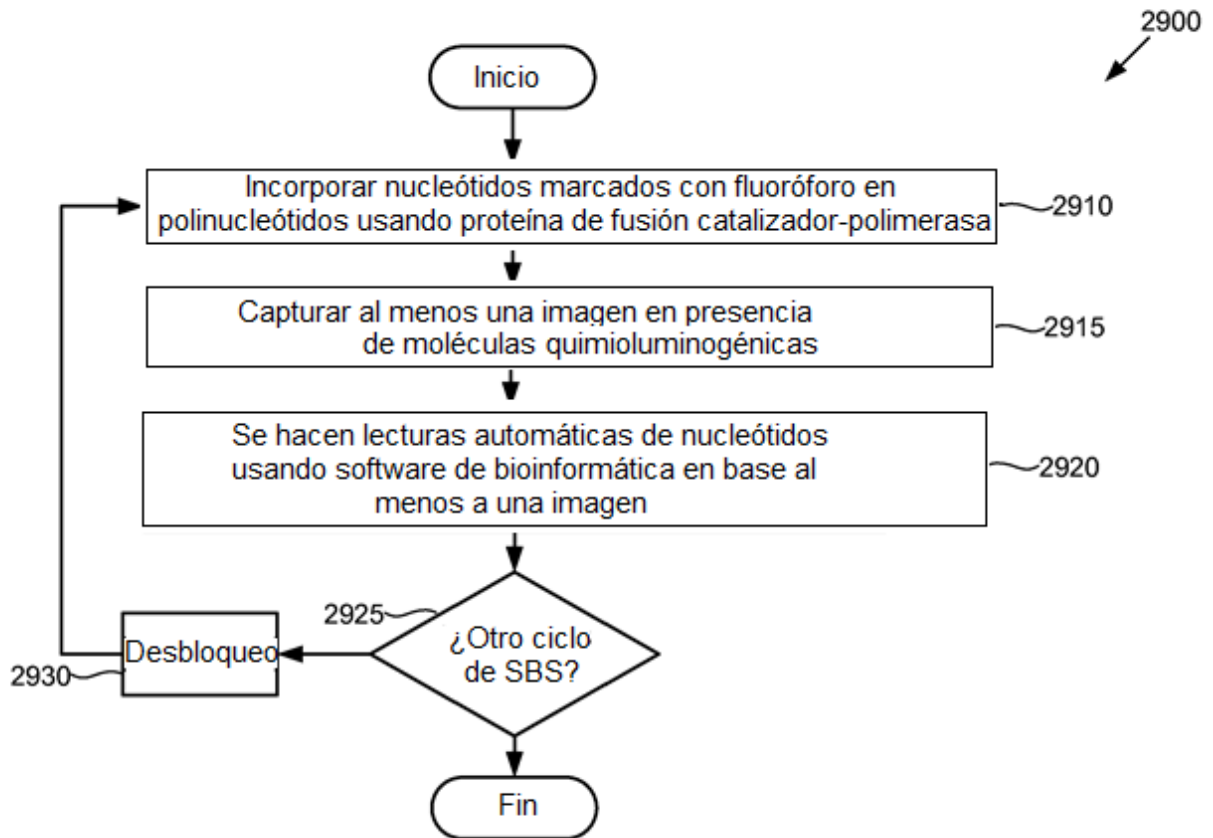


FIG. 29