

SENSOR Y SISTEMA DE DETECCIÓN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los EE.UU. Número de Serie 62/692.468, presentada el 29 de junio de 2018, y de la Solicitud de Holanda Número de Serie N2021376, presentada el 23 de julio de 2018; cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

El Listado de Secuencias presentado con la presente a través de EFS-Web se incorpora por la presente como referencia en su totalidad. El nombre del archivo es ILI149BPCT_IP-1687-PCT_sequence_listing_ST25.txt, el tamaño del archivo es de 366 bytes y la fecha de creación del archivo es el 7 de junio de 2019.

15 ANTECEDENTES

Diversos protocolos en investigación biológica o química implican realizar un gran número de reacciones controladas en superficies de soporte locales o dentro de cámaras de reacción predefinidas. Las reacciones designadas pueden después observarse o detectarse y el análisis posterior puede ayudar a identificar o revelar las propiedades de los productos químicos implicados en la reacción. Por ejemplo, en algunos ensayos múltiples, un analito desconocido que tiene un marcador identificable (por ejemplo, marcador fluorescente) puede exponerse a miles de sondas conocidas en condiciones controladas. Cada sonda conocida puede depositarse en un pocillo correspondiente de una microplaca. Observar cualquier reacción química que se produzca entre las sondas conocidas y el

analito desconocido dentro de los pocillos puede ayudar a identificar o revelar las propiedades del analito. Otros ejemplos de dichos protocolos incluyen procesos de secuenciación de ADN conocidos, tales como secuenciación por síntesis (SBS) o secuenciación de matriz cíclica. Con las técnicas de
5 secuenciación de polinucleótidos, el análisis puede ayudar a identificar o revelar propiedades del polinucleótido implicado en las reacciones.

INTRODUCCIÓN

Un primer aspecto que se desvela en el presente documento es un sensor. En un ejemplo, el sensor comprende dos electrodos que tienen un espacio entre
10 ellos; y un canal modulable conductor de electricidad unido a los dos electrodos, incluyendo el canal modulable conductor de electricidad un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado, conectado eléctricamente a los dos electrodos y uniendo el espacio entre los dos electrodos, incluyendo el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado: dos cadenas
15 polinucleotídicas parcialmente unidas entre sí; un hueco en una primera cadena de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas de una segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco en la primera de las cadenas polinucleotídicas.

En un ejemplo del sensor, el hueco tiene una longitud que varía de
20 aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm.

Un ejemplo del sensor comprende adicionalmente una polimerasa unida al polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado.

En un ejemplo del sensor, i) enlazadores unen respectivamente cada extremo de la primera de las cadenas polinucleotídicas a un electrodo respectivo
25 de los dos electrodos; o ii) enlazadores unen respectivamente cada extremo de

la segunda de las cadenas polinucleotídicas a un electrodo respectivo de los dos electrodos; o iii) tanto i como ii.

En un ejemplo del sensor, al menos una de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco es una base de guanina.

5 En un ejemplo del sensor, cada una de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco es una base de guanina.

Un ejemplo del sensor comprende adicionalmente un detector para detectar una respuesta del polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado, cuando una cadena conmutadora, incluyendo una cadena de
10 nucleótidos que incluye bases complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco, se asocia a al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas en el hueco.

Un ejemplo del sensor comprende adicionalmente un sustrato que soporta los dos electrodos; y una polimerasa unida al sustrato.

15 Un ejemplo del sensor comprende adicionalmente un sistema fluídico para introducir un reactivo en el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado. En un ejemplo, el reactivo incluye nucleótidos marcados, incluyendo al menos uno de los nucleótidos marcados: un nucleótido; una molécula de enlace unida a un grupo fosfato del nucleótido; y una cadena conmutadora unida
20 a la molécula de enlace, incluyendo la cadena conmutadora una cadena de nucleótidos que incluye bases complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco.

Un ejemplo del sensor comprende adicionalmente una pluralidad de otros canales modulables conductores de electricidad unidos a los dos electrodos,
25 incluyendo cada uno de los otros canales modulables conductores de

electricidad un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado respectivo, conectado eléctricamente a los dos electrodos y uniendo el espacio entre los dos electrodos.

En un ejemplo del sensor, el canal modulable conductor de electricidad
5 presenta una primera conductancia cuando la pluralidad de bases nucleotídicas se expone en el hueco; y una segunda conductancia que es diferente de la primera conductancia cuando al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas en el hueco se asocia a bases nucleotídicas complementarias.

Ha de comprenderse que cualquier característica del sensor que se
10 desvela en el presente documento puede combinarse de cualquier manera y/o configuración deseables y/o con cualquier otro ejemplo que se desvela en el presente documento.

Un segundo aspecto que se desvela en el presente documento es un
nucleótido marcado, comprende un nucleótido; una molécula de enlace unida a
15 un grupo fosfato del nucleótido; y una cadena conmutadora unida a la molécula de enlace, incluyendo la cadena conmutadora una cadena de nucleótidos que incluye bases complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco del sensor del primer aspecto.

Un tercer aspecto que se desvela en el presente documento es un kit, que
20 comprende: un componente electrónico, que incluye: un soporte; y dos electrodos dispuestos operativamente sobre el soporte y separados por un espacio; y una solución polimérica, que incluye: un vehículo líquido; y un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado en el vehículo líquido, incluyendo el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario
25 modificado: dos cadenas polinucleotídicas parcialmente unidas entre sí y que

tienen extremos opuestos; un enlazador unido a cada uno de los extremos opuestos, cada enlazador para unirse a un electrodo respectivo de los dos electrodos; un hueco en una primera cadena de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas de una
5 segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco en la primera de las cadenas polinucleotídicas; el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado para formar un canal modulable conductor de electricidad en el espacio entre los dos electrodos cuando cada enlazador se une al respectivo de los dos electrodos.

10 En un ejemplo, el kit comprende adicionalmente una solución de reactivo que incluye nucleótidos marcados, incluyendo al menos uno de los nucleótidos marcados: un nucleótido; una molécula de enlace unida a un grupo fosfato del nucleótido; y una cadena conmutadora unida a la molécula de enlace, incluyendo la cadena conmutadora una cadena de nucleótidos que incluye bases
15 complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco. En un ejemplo del kit, las bases en la cadena conmutadora son completamente complementarias con la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco. En otro ejemplo del kit, la cadena conmutadora incluye adicionalmente al menos un nucleótido que tiene una base
20 desapareada que no es complementaria con una base correspondiente de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco. En otro ejemplo más del kit, la cadena de nucleótidos en la cadena conmutadora tiene al menos un nucleótido menos que la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco. En otro ejemplo adicional del kit, la cadena de nucleótidos en la cadena
25 conmutadora tiene un mayor número de nucleótidos que la pluralidad de bases

nucleotídicas expuestas en el hueco y en el que una porción de la cadena conmutadora forma un tallo-lazo cuando se asocia en el hueco. En un ejemplo del kit, la cadena de nucleótidos en la cadena conmutadora tiene un mayor número de nucleótidos que la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco; una porción de la cadena conmutadora forma un tallo-lazo cuando se asocia en el hueco; y otra porción de la cadena conmutadora es completamente complementaria a la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco o incluye al menos un nucleótido que tiene una base desapareada que no es complementaria con una base correspondiente de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco.

Ha de comprenderse que cualesquier características del kit pueden combinarse entre sí de cualquier manera deseable. Por otra parte, ha de comprenderse que cualquier combinación de características del kit y/o del sensor y/o del nucleótido marcado puede usarse conjuntamente y/o combinarse con cualquiera de los ejemplos que se desvelan en el presente documento.

En un cuarto aspecto, un sistema de detección comprende una célula de flujo; y un sensor electrónico integrado en la célula de flujo, incluyendo el sensor electrónico: dos electrodos que tienen un espacio entre ellos; un canal modulable conductor de electricidad unido a los dos electrodos, incluyendo el canal modulable conductor de electricidad un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado, conectado eléctricamente a los dos electrodos y uniendo el espacio entre los dos electrodos, incluyendo el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado: dos cadenas polinucleotídicas parcialmente unidas entre sí; un hueco en una primera cadena de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases

nucleotídicas de una segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco en la primera de las cadenas polinucleotídicas.

En un ejemplo, el sistema de detección comprende adicionalmente un sistema de entrega de reactivo para introducir selectivamente un reactivo en una
5 entrada de la célula de flujo. En un ejemplo, el reactivo está en un recipiente de muestra, incluyendo el reactivo nucleótidos marcados, incluyendo al menos uno de los nucleótidos marcados: un nucleótido; una molécula de enlace unida a un grupo fosfato del nucleótido; y una cadena conmutadora unida a la molécula de
10 enlace, incluyendo la cadena conmutadora una cadena de nucleótidos que incluye bases complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco.

Un ejemplo del sistema de detección comprende adicionalmente un detector para detectar una respuesta del sensor electrónico.

Un ejemplo del sistema de detección comprende adicionalmente una
15 polimerasa anclada al polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado o un soporte del sensor electrónico; y una cadena polinucleotídica molde que ha de introducirse en el sensor electrónico.

Ha de comprenderse que cualesquier características del sistema de detección pueden combinarse entre sí de cualquier manera deseable. Por otra
20 parte, ha de comprenderse que cualquier combinación de características del sistema de detección y/o del sensor, y/o del kit y/o del nucleótido marcado puede usarse conjuntamente y/o combinarse con cualquiera de los ejemplos que se desvelan en el presente documento.

Un quinto aspecto que se desvela en el presente documento es un
25 método. En un ejemplo, el método comprende introducir una cadena

polinucleotídica molde en un sensor electrónico que tiene una polimerasa unida a i) un canal modulable conductor de electricidad que une un espacio entre medias y se conecta eléctricamente a dos electrodos o ii) un sustrato que soporta los dos electrodos, incluyendo el canal modulable conductor de electricidad un

5 polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado, que incluye: dos cadenas polinucleotídicas parcialmente unidas entre sí; un hueco en una primera cadena de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas de una segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco en la primera de las cadenas

10 polinucleotídicas; introducir reactivos que incluyen nucleótidos marcados en el sensor electrónico, por lo que un nucleótido de uno de los nucleótidos marcados se asocia a la polimerasa y una cadena conmutadora específica de nucleótido de uno de los nucleótidos marcados se asocia a al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas expuestas en el hueco; y, en respuesta a la asociación

15 en el hueco, detectar una respuesta del sensor electrónico.

Un ejemplo del método comprende adicionalmente asociar la respuesta del sensor electrónico a la cadena conmutadora específica de nucleótido asociada; y se basa en la cadena conmutadora específica de nucleótido asociada, identificar el nucleótido de uno de los nucleótidos marcados.

20 Un ejemplo del método comprende adicionalmente calentar para disociar la cadena conmutadora específica de nucleótido del hueco.

Ha de comprenderse que cualesquier características del método pueden combinarse entre sí de cualquier manera deseable. Por otra parte, ha de comprenderse que cualquier combinación de características del método y/o del

25 sistema de detección y/o del sensor y/o cualquiera de los kits y/o del nucleótido

marcado pueden usarse conjuntamente y/o combinarse con cualquiera de los ejemplos que se desvelan en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características de los ejemplos de la presente divulgación serán evidentes por referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos, en los que los números de referencia similares corresponden a componentes similares, aunque quizás no idénticos. Por razones de brevedad, los números de referencia o las características que tienen una función descrita anteriormente pueden o no describirse en relación con otros dibujos en los que aparecen.

La Fig. 1A es un diagrama esquemático de un ejemplo de un sensor que se desvela en el presente documento;

la Fig. 1B es un diagrama esquemático de un ejemplo de un sensor y un ejemplo de un sistema fluídico para introducir un reactivo en un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado del sensor;

la Fig. 2 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un nucleótido marcado que se desvela en el presente documento;

las Fig. 3A a 3D son diagramas esquemáticos recortados de diferentes nucleótidos marcados de ejemplo, que incluyen diferentes cadenas conmutadoras, asociadas a bases nucleotídicas expuestas en un hueco de un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado;

la Fig. 4 es un diagrama en perspectiva esquemático de un ejemplo de un sistema de detección que incluye una célula de flujo y un ejemplo del sensor que se desvela en el presente documento;

la Fig. 5 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un sistema de detección; y

la Fig. 6 es un diagrama de flujo de un ejemplo de un método que se desvela en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se desvela un sensor electrónico/eléctrico que
5 puede usarse para la detección de moléculas individuales en procedimientos de
secuenciación de ácidos nucleicos. El sensor incluye un canal modulable
conductor de electricidad conectado eléctricamente a dos electrodos. El canal
modulable conductor de electricidad incluye un polímero de ácido nucleico
parcialmente bicatenario modificado (denominado en el presente documento
10 "ANbc" modificado) y, por tanto, puede denominarse un nanocable molecular
conductor. Una cadena o hebra polinucleotídica del ANbc modificado tiene un
hueco donde se exponen las bases nucleotídicas. La otra de las cadenas o
hebras polinucleotídicas se extiende desde uno de los electrodos hasta el otro
de los electrodos y, por tanto, el canal modulable conductor de electricidad
15 proporciona una vía de conducción entre los dos electrodos incluso cuando se
exponen las bases nucleotídicas en el hueco (y no tiene lugar la detección de
una molécula individual). Las bases nucleotídicas en el hueco son capaces de
asociarse a una cadena conmutadora que tiene al menos algunas bases
nucleotídicas complementarias con las bases nucleotídicas en el hueco. Cuando
20 la cadena conmutadora se asocia en el hueco, la vía de conducción aumenta y
se modula la conductancia del canal conductor de electricidad. Por tanto, el canal
modulable conductor de electricidad presenta una primera conductancia cuando
la pluralidad de bases nucleotídicas se expone en el hueco; y una segunda
conductancia que es diferente de la primera conductancia cuando al menos parte
25 de la pluralidad de bases nucleotídicas en el hueco se asocia a bases

nucleotídicas complementarias. En un ejemplo, cuando se exponen las bases nucleotídicas en el hueco, la conductividad del canal modulable conductor de electricidad es relativamente baja. Por el contrario, cuando la cadena conmutadora se asocia en el hueco, la conductividad del canal modulable conductor de electricidad cambia (por ejemplo, aumenta o disminuye), en algunos casos, en órdenes de magnitud.

La cadena conmutadora puede ser parte de un nucleótido marcado, que incluye un nucleótido específico unido a la cadena conmutadora. A medida que el nucleótido específico se incorpora a una cadena naciente durante un procedimiento de secuenciación de ácido nucleico, el conmutador se asocia en el hueco, lo que da como resultado un cambio de conductividad del canal modulable conductor de electricidad. Puesto que el nucleótido y la cadena conmutadora son específicos entre sí, el cambio de conductividad asociado al conmutador también se asocia al nucleótido. Por tanto, el cambio en la conductividad puede usarse para identificar la base nucleotídica que se está incorporando en la cadena naciente.

Con referencia ahora a la Fig. 1A, se representa un ejemplo del sensor 10. El sensor de ejemplo 10 es un sensor eléctrico/electrónico. El sensor 10 incluye dos electrodos 12, 14 que tienen un espacio entre ellos y un canal modulable conductor de electricidad 16 unido a los dos electrodos 12, 14. El canal modulable conductor de electricidad incluye un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado (es decir, ANbc modificado) 16' conectado eléctricamente a los dos electrodos 12, 14 y que une el espacio entre los dos electrodos 12, 14, incluyendo el ANbc modificado 16' dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas entre sí; un hueco 22 en una

primera cadena de las cadenas polinucleotídicas 18 en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas 24 de una segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas 20 expuestas en el hueco 22 en la primera de las cadenas polinucleotídicas 18.

5 Los electrodos 12, 14 están en comunicación eléctrica con el ANbc modificado 16'/canal modulable conductor de electricidad 16 y, por tanto, existe una vía de conducción constante entre los electrodos 12, 14 cuando el sensor 10 está en funcionamiento. Como se ha mencionado, esta vía de conducción es modulable mediante la asociación de una cadena conmutadora en el hueco 22.

10 Puede usarse cualquier material de electrodo adecuado que pueda unirse química y eléctricamente al ANbc modificado 16'. Los ejemplos de materiales de electrodo adecuados incluyen oro, platino, carbono, óxido de indio y estaño, etc.

 El ANbc modificado 16' es un polímero de ácido nucleico que incluye dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas entre sí. Por "parcialmente
15 unidas entre sí", se entiende que parte de las bases nucleotídicas de las dos cadenas 18, 20 tienen enlaces de hidrógeno entre sí para formar una doble hélice, pero que una de las cadenas 18 tiene un hueco 22 sin ningún nucleótido. En el hueco 22 en una cadena 18, se exponen las bases nucleotídicas de la otra de las cadenas 20. Por "expuesta", se entiende que las bases de estos
20 nucleótidos no se unen a otro nucleótido y, por tanto, están disponibles para unirse, hibridarse o asociarse de otro modo con nucleótidos complementarios.

 Los nucleótidos de las dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 pueden ser nucleótidos naturales. Los nucleótidos naturales incluyen una base heterocíclica que contiene nitrógeno, un azúcar y uno o más grupos fosfato. Los ejemplos de
25 nucleótidos naturales de las dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 incluyen

ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. En los ribonucleótidos, el azúcar es una ribosa, y en los desoxirribonucleótidos, el azúcar es una desoxirribosa, es decir, un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la posición 2' en la ribosa. En un ejemplo, el nucleótido está en forma de polifosfato porque
5 incluye varios grupos fosfato (por ejemplo, trifosfato (es decir, gamma fosfato), tetrafosfato, pentafofosfato, hexafofosfato (como se muestra en la Fig. 5), etc.). La base heterocíclica (es decir, nucleobase) puede ser una base púrica o una base pirimidínica o cualquier otro análogo de nucleobase. Las bases púricas incluyen adenina (A) y guanina (G), y derivados modificados o análogos de las mismas.
10 Las bases pirimidínicas incluyen citosina (C), timina (T) y uracilo (U), y derivados modificados o análogos de los mismos. El átomo C-1 de la desoxirribosa se une a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina. Las cadenas polinucleotídicas 18, 20 también pueden incluir cualquier análogo de ácido nucleico. Un análogo de ácido nucleico puede tener cualquiera de entre la cadena principal de fosfato, el
15 azúcar o la nucleobase alterada. Los ejemplos de análogos de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, bases universales o análogos de estructura principal de fosfato y azúcar, tales como ácido nucleico peptídico (ANP).

Como se menciona en el presente documento, la primera cadena polinucleotídica 18 tiene un hueco 22 donde no hay nucleótidos presentes. El
20 hueco 22 puede estar ubicado en cualquier lugar a lo largo de la cadena 18, por ejemplo, en o cerca del centro, en cualquier extremo de la cadena 18, entre el centro y un extremo de la cadena 18, etc. Por tanto, en algunos ejemplos, la primera cadena polinucleotídica 18 incluye dos cadenas más cortas separadas por el hueco 22. En otros ejemplos (por ejemplo, cuando el hueco 22 está en
25 cualquier extremo de la cadena 18), la primera cadena 18 de polinucleótidos es

una única cadena continua. En otros ejemplos más, la primera cadena polinucleotídica 18 puede tener múltiples huecos 18 a lo largo de la estructura principal polimérica. El hueco o huecos 22 pueden tener cualquier longitud que sea más corta que la longitud total del ANbc 16'. En un ejemplo, la longitud de
5 cada hueco 22 varía de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 60 nm. En otro ejemplo, la longitud de cada hueco 22 varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm. En otro ejemplo más, la longitud de cada hueco 22 varía de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm. Aunque la longitud del hueco 22 se establece como una unidad métrica, ha de comprenderse que
10 la longitud del hueco también puede definirse en términos del número de nucleótidos que podrían caber en el hueco 22 o el número de bases nucleotídicas de la segunda cadena polimérica 20 que se exponen en el hueco 22. El hueco o huecos 22 en la primera cadena polinucleotídica 18 reduce la conductividad del ANbc modificado 16'.

15 En el hueco 22 en la primera cadena polinucleotídica 18, se expone una pluralidad de nucleótidos de la segunda cadena polimérica 20. En particular, se exponen las bases 24 de estos nucleótidos. Las bases expuestas 24 pueden ser todas las mismas bases o pueden ser una combinación de diferentes bases. En un ejemplo, al menos una de las bases expuestas 24 es guanina (G). En este
20 ejemplo, las otras bases expuestas 24 pueden ser una cualquiera o cualquier combinación de adenina (A), citosina (C), timina (T) y/o uracilo (U). En otro ejemplo, cada una de las bases expuestas 24 es guanina (G). Puede ser deseable incluir varias bases guanina (G) en una fila expuesta en el hueco 22, ya que las bases guanina (G) conducen la electricidad mejor que las otras bases.

25 Las dos cadenas polinucleotídicas parcialmente unidas tienen extremos

opuestos y puede unirse un enlazador a cada uno de los extremos opuestos. En los ejemplos que se desvelan en el presente documento, i) enlazadores unen respectivamente cada extremo de la primera de las cadenas polinucleotídicas 18 a un electrodo respectivo de los dos electrodos 12, 14; o ii) enlazadores unen
5 respectivamente cada extremo de la segunda de las cadenas polinucleotídicas a un electrodo respectivo de los dos electrodos; o iii) tanto i como ii. Aunque la Fig. 1 ilustra la segunda cadena polinucleotídica 20 unida a los electrodos 12, 14 a través de los enlazadores 26, ha de comprenderse que la primera cadena polinucleotídica 18 o ambas cadenas 18, 20 pueden unirse a los electrodos 12,
10 14 a través de los enlazadores 26 respectivos. Por tanto, los extremos 5' y 3' respectivos de la primera y/o la segunda cadena polinucleotídica 18, 20 pueden tener un enlazador 26 unido a los mismos. Los enlazadores 26 conectaron eléctricamente el ANbc modificado 16' a los electrodos 12, 14. Los enlazadores 26 también pueden ser capaces de unirse químicamente a los electrodos 12, 14
15 respectivos, uniendo de este modo el ANbc modificado 16' entre los electrodos 12, 14. Por tanto, los enlazadores 26 pueden depender del material del electrodo. Como ejemplos, enlazadores de tiolato o amina pueden unirse a electrodos de oro, enlazadores de tiol pueden unirse a electrodos de platino y enlazadores de silano (por ejemplo, azidosilano) pueden unirse a electrodos de ITO. La unión
20 del enlazador 26 respectivo a uno de los electrodos 12, 14 puede realizarse a través de enlace covalente, enlace de coordinación u otro enlace químico o físico, dependiendo del enlazador y el material del electrodo. Los enlazadores 26 también son conductores de electricidad, de manera que la vía de conducción entre los electrodos 12, 14 se establece cuando el ANbc modificado 16' se une
25 a cada uno de los electrodos 12, 14.

Cualquier ejemplo del sensor 10 que se desvela en el presente documento puede incluir una pluralidad de otros canales modulables conductores de electricidad 16 unidos a los dos electrodos 12, 14, incluyendo cada uno de los otros canales modulables conductores de electricidad 16 un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16' respectivo, conectado eléctricamente a los dos electrodos 12, 14, y uniendo el espacio entre los dos electrodos 12 14. En otras palabras, el sensor 10 puede incluir dos o más polímeros de ácido nucleico parcialmente bicatenarios 16', donde cada ANbc modificado 16' se conecta eléctricamente a los dos electrodos 12, 14. Múltiples canales 16 son relativamente fáciles de fabricar (permitiendo que se unan múltiples cadenas de ANbc 16' modificadas) y proporcionan varios huecos 22 a los que puede asociarse la cadena o cadenas conmutadoras. Con múltiples canales 16, la señal base (por ejemplo, cuando no se asocia ninguna cadena conmutadora al hueco o huecos) 33 es mayor y cuando las cadenas conmutadoras respectivas se asocian a los múltiples canales modulables conductores de electricidad 16, la señal detectada puede potenciarse.

Aunque no se muestra en la Fig. 1A, el sensor 10 también puede incluir un sustrato o soporte sobre el que se posicionan los electrodos 12, 14. Un ejemplo del soporte/sustrato 13 se muestra en la Fig. 1C. El soporte/sustrato 13 puede ser cualquier superficie sólida sobre la que puedan asentarse los electrodos 12, 14. Puede usarse cualquier superficie sólida no conductora o semiconductora. La superficie sólida también puede ser no permeable e inerte a líquidos, reactivos, etc. utilizados en una operación de secuenciación de molécula única. Algunos ejemplos de soportes/sustratos 13 adecuados incluyen epoxi siloxano, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo

acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, politetrafluoroetileno (tal como TEFLON® de Chemours), olefinas cíclicas/polímeros de cicloolefina (COP) (tales como ZEONOR® de Zeon), poliimidas, etc.), nylon, cerámica/óxidos cerámicos, sílice, sílice fundida o materiales a base de sílice, silicato de aluminio, silicio y silicio modificado (por ejemplo, dopado con boro p + silicio), nitruro de silicio (Si_3N_4), óxido de silicio (SiO_2), pentóxido de tantalio (TaO_5) u otro óxido u óxidos de tantalio (TaO_x), óxido de hafnio (HfO_2), vidrios inorgánicos o similares. El soporte o sustrato 13 también puede ser vidrio o silicio, con una capa de recubrimiento de dióxido de silicio u óxido de tantalio u otro óxido cerámico en la superficie.

Además, aunque no se muestra en la Fig. 1A, el sensor 10 también puede incluir un detector que puede detectar una respuesta eléctrica del sensor 10. Se muestran ejemplos del detector 15 en las Fig. 1B, 4 y 5. En un ejemplo, el detector 15 es un amperímetro. Como se describirá con más detalle con referencia a la Fig. 5, la conductividad del ANbc modificado 16' (y, por tanto, el canal modulable conductor de electricidad 16) puede aumentar cuando una cadena conmutadora 28 (que se muestra en la Fig. 2), que incluye una cadena de nucleótidos que incluyen bases complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22, se asocia a al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas 24 en el hueco 22.

Como se muestra en la Fig. 1B, el sensor 10 puede incluir adicionalmente un sistema fluídico 17 para introducir un reactivo en el canal modulable conductor de electricidad 16. Este sistema fluídico 17 puede ser cualquier dispositivo fluídico que pueda entregar el reactivo al ANbc 16' o que permita que el reactivo esté contenido cerca del ANbc 16'. Como se muestra en la Fig. 1B, el sistema

fluídico 17 puede ser una tapa de célula de flujo que puede unirse y retirarse del soporte/sustrato 13. Este ejemplo del sistema fluídico 17 incluye una entrada 19 a través de la cual puede introducirse el reactivo. Las paredes de este sistema fluídico mantienen el reactivo cerca del ANbc 16'. Como otro ejemplo (que no se muestra), el sistema fluídico 17 puede ser una pipeta (u otro dispositivo de entrega) que pueda usarse para entregar el reactivo al canal modulable conductor de electricidad 16/ANbc 16'. En este ejemplo, el soporte/sustrato 13 puede tener una zanja adyacente al canal modulable conductor de electricidad 16/ANbc 16' que pueda recibir el reactivo y permitir que el reactivo entre en contacto con el canal modulable conductor de electricidad 16/ANbc 16'. Aunque se han proporcionado algunos ejemplos de sistemas fluídicos, ha de comprenderse que el sensor 10 puede incluir cualquier sistema fluídico 17 que pueda entregar un reactivo al canal modulable conductor de electricidad 16/ANbc 16', y/o que permita que el reactivo esté contenido dentro de la proximidad del canal modulable conductor de electricidad 16/ANbc 16'.

El sensor 10 que se desvela en el presente documento puede permitir la sensibilidad de una única molécula. Por otra parte, cuando se dispone en una matriz (es decir, varios sensores 10 posicionados sobre un sustrato/soporte 13), pueden usarse distancias muy pequeñas entre sensores de manera que la densidad (es decir, sensor/área) pueda ser muy alta.

Para formar el sensor 10, puede usarse cualquier método adecuado. En un ejemplo, puede sintetizarse el ANbc modificado 16' y después el ANbc modificado 16' puede unirse a los electrodos 12, 14 para formar el canal modulable conductor de electricidad 16 en el espacio entre los dos electrodos 12, 14.

El ANbc modificado 16' puede prepararse sintetizando la segunda cadena polinucleotídica 20 y después mezclando la segunda cadena polinucleotídica 20 con la cadena o cadenas complementarias que se unirán a la segunda cadena polinucleotídica 20 en la posición o posiciones apropiadas. Después, la mezcla
5 puede hibridarse para iniciar la unión. En un ejemplo, dos cadenas complementarias pueden unirse a porciones respectivas de la segunda cadena polinucleotídica 20 de manera que el hueco 22 se forme en algún lugar entre los dos extremos del ANbc modificado 16' resultante. En otro ejemplo, una cadena complementaria que es más corta que la segunda cadena polinucleotídica 20
10 puede unirse a una porción de la segunda cadena polinucleotídica 20 de manera que el hueco 22 se forme en un extremo del ANbc modificado 16' resultante. Ha de comprenderse que la segunda cadena polinucleotídica 20 y la cadena o cadenas complementarias que se unen para formar la primera cadena polinucleotídica 18 pueden seleccionarse para controlar la longitud del hueco 22
15 y las bases nucleotídicas 24 que se exponen en el hueco 22.

El ANbc modificado 16' después puede unirse a los electrodos 12, 14. Los enlazadores 26 pueden unirse al ANbc modificado 16' usando cualquier técnica adecuada y después los enlazadores 26 pueden unirse a los electrodos 12, 14. En un ejemplo, las bases de ADN modificadas con tiol pueden conjugarse en los
20 extremos 3' y 5' de las cadenas 18, 20. En un ejemplo, el ANbc modificado 16' puede inmovilizarse en los electrodos 12, 14 exponiendo los electrodos 12, 14 en una solución del ANbc modificado 16' durante un tiempo adecuado, seguido de aclarado con un tampón adecuado para retirar el ANbc modificado 16' no unido.

25 En un método de fabricación del sensor 10, los electrodos 12, 14 también

pueden conectarse eléctricamente al detector 15.

En algunos ejemplos, el sensor 10 puede venir ensamblado previamente.

En otros ejemplos, los componentes del sensor pueden ser parte de un kit y los componentes del kit pueden usarse para ensamblar el sensor 10. Un
5 ejemplo del kit incluye un componente electrónico y una solución polimérica. El componente electrónico incluye el soporte 13 y dos electrodos 12, 14 dispuestos operativamente sobre el soporte y separados por un espacio. Por "dispuestos operativamente", se entiende que los electrodos 12, 14 pueden conectarse a
10 circuitería electrónica que permite su funcionamiento (por ejemplo, una vez conectados a un detector 15 y fuente de alimentación). La circuitería electrónica puede conectarse eléctricamente al detector 15 y a la fuente de alimentación. La solución polimérica incluye un vehículo líquido y un ANbc modificado 16' en el vehículo líquido, donde el ANbc 16' modificado es cualquiera de los ejemplos que se describen en el presente documento. Como se describe en el presente
15 documento, el ANbc modificado 16' incluye las dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas entre sí y que tienen extremos opuestos. El ANbc modificado 16' puede tener enlazadores 26 unidos a una o ambas cadenas 18 y/o 20 en cada uno de los extremos opuestos. En un ejemplo, el ANbc modificado 16' está en una solución tampón de sal iónica, tal como citrato salino a
20 concentraciones de milimolares a molares.

Cuando usa el kit, un usuario puede depositar la solución polimérica sobre los componentes electrónicos, permitir que la solución polimérica permanezca sobre los componentes electrónicos durante un tiempo adecuado para que los enlazadores 26 se unan a los electrodos respectivos 12, 14 y, después, el
25 componente electrónico puede aclararse con un tampón adecuado para retirar

el ANbc modificado 16' no unido.

Además de contener componentes para formar el sensor 10, algunos ejemplos del kit también pueden incluir una solución de reactivo que ha de usarse con el sensor 10. La solución de reactivo incluye nucleótidos marcados, que se describen con referencia a la Fig. 2.

Con referencia ahora a la Fig. 2, se representa un ejemplo de un nucleótido marcado 30, que incluye la cadena conmutadora 28 mencionada anteriormente. El nucleótido marcado 30 incluye un nucleótido 32, una molécula de enlace 34 unida a un grupo fosfato del nucleótido 22 y la cadena conmutadora 28 unida a la molécula de enlace 34, incluyendo la cadena conmutadora 28 una cadena de nucleótidos que incluye bases 36 complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 del sensor 10. El nucleótido marcado 30 puede considerarse un nucleótido no natural o sintético porque es estructural o químicamente distinto de un nucleótido natural.

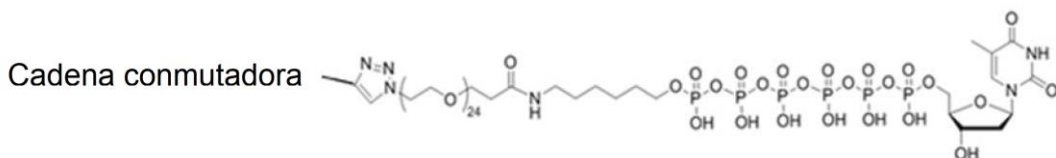
El nucleótido 32 del nucleótido marcado 30 puede ser un nucleótido natural. Los nucleótidos naturales incluyen una base heterocíclica que contiene nitrógeno, un azúcar y tres o más grupos fosfato. Los ejemplos de nucleótidos naturales incluyen, por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Como se ha mencionado anteriormente, en un ribonucleótido, el azúcar es una ribosa, y en un desoxirribonucleótido, el azúcar es una desoxirribosa. En un ejemplo, el nucleótido 32 está en forma de polifosfato porque incluye varios grupos fosfato (por ejemplo, trifosfato, tetrafosfato, pentafofosfato, hexafofosfato, etc.). La base heterocíclica (es decir, nucleobase) puede ser una base púrica (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)) o una base pirimidínica (por ejemplo, citosina (C),

timina (T) y uracilo (U)).

El nucleótido marcado 30 también incluye la molécula de enlace 34. La molécula de enlace 34 puede ser cualquier molécula de cadena larga que pueda unirse químicamente, en un extremo, al grupo o grupos fosfato del nucleótido 32 y que pueda unirse químicamente, en el otro extremo, a la cadena conmutadora 28. La molécula de enlace 34 también puede seleccionarse de manera que no interactúe con una polimerasa 38 utilizada en el sistema 40, 40' (véanse las Fig. 4 y 5) que se desvela en el presente documento. La molécula de enlace 34 se selecciona de manera que sea lo suficientemente larga como para permitir que la cadena conmutadora 28 se asocie a las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 del sensor eléctrico 10 mientras, por ejemplo, el nucleótido 32 es mantenido por la polimerasa 38.

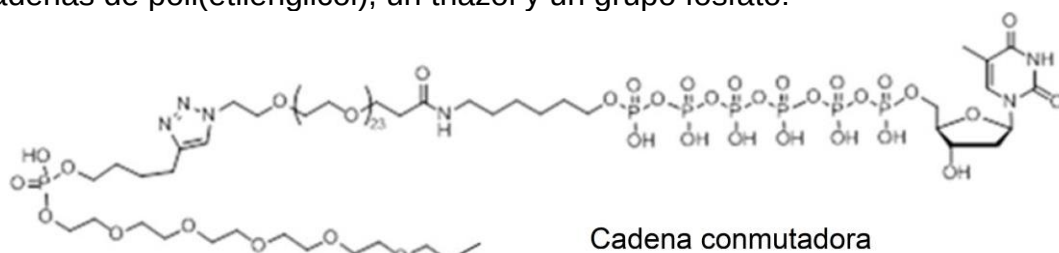
Como ejemplos, la molécula de enlace 34 puede incluir una cadena alquílica, una cadena de poli(etilenglicol), un grupo amido, un grupo fosfato, un heterociclo tal como un triazol, nucleótidos o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de la cadena alquílica pueden incluir al menos 6 átomos de carbono y los ejemplos de la cadena de poli(etilenglicol) pueden incluir al menos 3 unidades de etilenglicol.

El siguiente ejemplo ilustra un ejemplo del nucleótido marcado 30, donde la molécula de enlace 34 comprende una cadena alquílica, un grupo amida, una cadena de poli(etilenglicol) y un triazol:

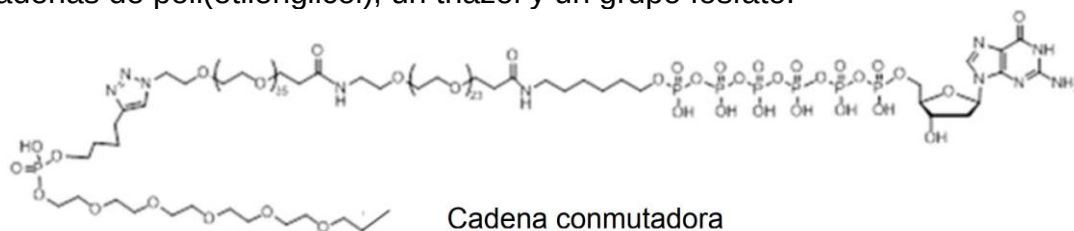


El siguiente ejemplo ilustra otro ejemplo del nucleótido marcado 30, donde

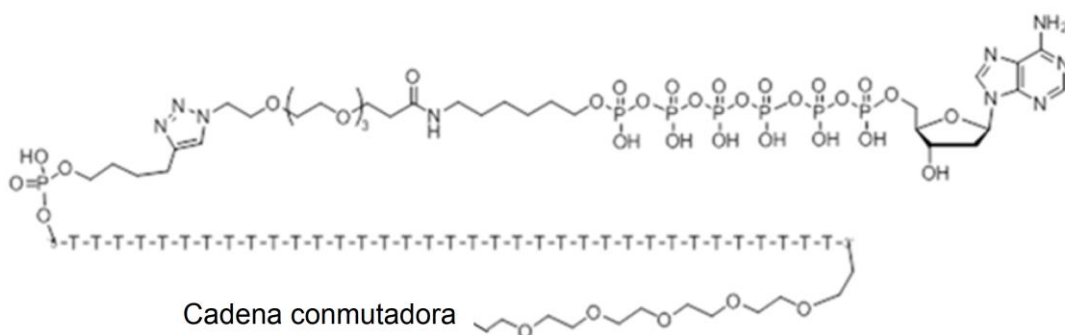
la molécula de enlace 34 comprende cadenas alquílicas, un grupo amida, cadenas de poli(etilenglicol), un triazol y un grupo fosfato:



El siguiente ejemplo ilustra otro ejemplo más del nucleótido marcado 30, donde la molécula de enlace 34 comprende cadenas alquílicas, grupos amida, cadenas de poli(etilenglicol), un triazol y un grupo fosfato:



El siguiente ejemplo ilustra otro ejemplo adicional más del nucleótido marcado 10, donde la molécula de enlace 14, 14' comprende una cadena alquílica, un grupo amida, cadenas de poli(etilenglicol), un triazol, un grupo fosfato y una cadena polinucleotídica:



Aunque se han descrito varios ejemplos de moléculas de enlace 34, ha de comprenderse que pueden usarse otras moléculas de enlace 34.

La cadena conmutadora 28 es una cadena de nucleótidos. Los

nucleótidos en la cadena conmutadora 28 son similares al nucleótido 32, es decir, incluyen la base heterocíclica que contiene nitrógeno, el azúcar y tres o más grupos fosfato. Al menos parte de los nucleótidos en la cadena conmutadora 28 incluyen bases 36 que son complementarias con las bases 24 que se exponen en el hueco 22 del sensor 10. Por tanto, la secuencia de los nucleótidos en la cadena conmutadora 28 depende, al menos en parte, de la secuencia de las bases expuestas 24.

En un ejemplo, las bases 36 en la cadena conmutadora 28 son completamente complementarias con la pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22. Como ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser G-G-G-G-G-G-G y la cadena conmutadora 28A puede ser C-C-C-C-C-C-C. Como otro ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser G-A-G-T-G-C-G-G y la cadena conmutadora 28A puede ser C-T-C-A-C-G-C-C. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 3A, puede usarse cualquier secuencia adecuada para la cadena conmutadora 28A, siempre que tenga el mismo número de bases y sea completamente complementaria con, las bases 24 expuestas en el hueco 22. Un ejemplo del nucleótido marcado 30A que incluye una cadena conmutadora completamente complementaria 28A se muestra en la Fig. 3A. Como se representa, la cadena conmutadora 28A del nucleótido marcado 30A se asocia a su vez a las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22. Más específicamente, en este ejemplo, cada una de las bases nucleotídicas 36 en la cadena conmutadora 28A se hibrida temporalmente y al menos parcialmente con su base complementaria 24 (de la cadena polinucleotídica 20) que se expone en el hueco 22 en la cadena polinucleotídica 18. En algunos ejemplos, la hibridación no es completa y, en

otros ejemplos, la hibridación es completa. Para conseguir la hibridación parcial o completa, puede ajustarse la temperatura de fusión de la interacción entre las bases complementarias. Los diferentes grados de hibridación entre las diferentes cadenas conmutadoras 28A y las bases nucleotídicas 24 permiten conseguir
5 diferentes distintivos de tiempo con diferentes cadenas conmutadoras 28A. Cuando se incorpora, la cadena conmutadora 28A cierra un conmutador del ANbc modificado 16', que cambia significativamente (por ejemplo, aumenta) la conductividad del ANbc 16', modula el canal 16 y da como resultado un cambio detectable.

10 En otro ejemplo, las bases 36 en la cadena conmutadora 28 no son completamente complementarias con la pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22; sino que más bien, la cadena conmutadora 28B incluye al menos un nucleótido que tiene una base 42 no coincidente que no es complementaria con una correspondiente (que se muestra como 24') de la
15 pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22, como se muestra en la Fig. 3B. En otras palabras, la base 42 desapareada no es complementaria con la base nucleotídica 24' correspondiente expuesta en el hueco 22. Como ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser G-G-G-G-G-G y la cadena conmutadora 28B puede ser C-C-C-A-C-C-C. En este
20 ejemplo, la adenina de la cadena conmutadora 28B es la base 42 desapareada porque no es complementaria con la guanina correspondiente expuesta en el hueco 22 de la cadena polinucleotídica 20. Como otro ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser G-A-G-T-G-C-G-G y la cadena conmutadora 28B puede ser C-C-C-A-C-G-C-C. En este ejemplo, la
25 segunda citosina de la cadena conmutadora 28B es la base 42 desapareada

porque no es complementaria con la adenina correspondiente expuesta en el
 hueco 22 de la cadena polinucleotídica 20. En el ejemplo que se muestra en la
 Fig. 3B, puede usarse cualquier secuencia adecuada para la cadena
 conmutadora 28B, siempre que tenga el mismo número de bases, sea
 5 parcialmente complementaria e incluya al menos una base desapareada con las
 bases 24 expuestas en el hueco 22. Como se representa, la cadena
 conmutadora 28B del nucleótido marcado 30B se asocia a las bases
 nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22. Más específicamente, en este
 ejemplo, aunque parte de las bases nucleotídicas 36 en la cadena conmutadora
 10 28B se hibridan temporalmente con las bases complementarias 24 respectivas,
 la base 42 desapareada y la base nucleotídica 24' correspondiente en la cadena
 polinucleotídica 20 permanece sin unir. Cuando se incorpora, la cadena
 conmutadora 28B cierra sustancialmente un conmutador del ANbc 16'
 modificado (pero no cierra completamente el conmutador debido a la base
 15 desapareada 42), que cambia significativamente (por ejemplo, aumenta) la
 conductividad del ANbc, 16', modula el canal 16 y da como resultado un cambio
 detectable. Ha de comprenderse que, en algunos ejemplos, el aumento de
 conductividad con la cadena conmutadora 28B puede no ser tan grande como el
 aumento observado con la cadena conmutadora 28A, debido a la base
 20 desapareada 42.

En otro ejemplo más, la cadena de nucleótidos en la cadena conmutadora
 28 tiene al menos un nucleótido menos que la pluralidad de bases nucleotídicas
 24 expuestas en el hueco 22. Un ejemplo de esta cadena conmutadora 28C se
 muestra en la Fig. 3C. Los nucleótidos en la cadena conmutadora 28C son
 25 complementarios con parte de las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco

22; sin embargo, después de que la cadena conmutadora 28C se asocia en el hueco 22, al menos una de las bases nucleotídicas 24" permanece sin unir debido a la longitud más corta de la cadena conmutadora (debido a las bases faltantes). Como ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser G-G-G-G-G-G-G y la cadena conmutadora 28C puede ser C-C-C-C-C. En este ejemplo, a la cadena conmutadora 28C le faltan dos bases o es dos nucleótidos más corta que el número total de bases nucleotídicas 24 (incluyendo 24") expuestas en el hueco 22. Como otro ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 puede ser G-A-G-T-G-C-G-G y la cadena conmutadora 28C puede ser T-C-A-C-G-C-C. En este ejemplo, a la cadena conmutadora 28C le falta una base o es un nucleótido más corta que el número total de bases nucleotídicas 24 (incluyendo 24") expuestas en el hueco 22. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 3C, puede usarse cualquier secuencia adecuada para la cadena conmutadora 28C, siempre que tenga menos que el número total de bases 24 expuestas en el hueco 22 y sea complementaria con algunas de las bases 24 expuestas en el hueco 22. Como se muestra en la Fig. 3C, cuando la cadena conmutadora 28C del nucleótido marcado 30C se asocia a su vez en el hueco 22, i) las bases nucleotídicas 36 en la cadena conmutadora 28C temporalmente y al menos parcialmente se hibridan con las bases complementarias 24 respectivas y ii) parte de las bases nucleotídicas 24" en la cadena polinucleotídica 20 permanecen sin unir porque a la cadena conmutadora 28 le faltan bases. Cuando se incorpora, la cadena conmutadora 28C cierra sustancialmente un conmutador del ANbc modificado 16' (pero no cierra completamente el conmutador debido a las bases faltantes), lo que cambia significativamente (por ejemplo, aumenta) la conductividad del ANbc 16'

modificado (y el canal 16) y da como resultado un cambio detectable. Ha de comprenderse que, en algunos ejemplos, el aumento de conductividad con la cadena conmutadora 28C puede no ser tan grande como el aumento observado con la cadena conmutadora 28A, debido a las bases faltantes.

5 En otro ejemplo más, la cadena de nucleótidos en la cadena conmutadora 28 tiene un mayor número de nucleótidos que la pluralidad de bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 y una porción de la cadena conmutadora 28 forma un tallo-lazo cuando se asocia en el hueco 22. Un ejemplo de esta cadena conmutadora 28D se muestra en la Fig. 3D. Parte de los
10 nucleótidos en la cadena conmutadora 28D son complementarios con las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22; sin embargo, después de que la cadena conmutadora 28D se asocia en el hueco 22, los nucleótidos no complementarios 36' de la cadena conmutadora 28C permanecen libres y forman el tallo-lazo 44. Como ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco
15 22 pueden ser G-G-G-G-G-G-G-G-G y la cadena conmutadora 28C puede ser C-C-C-C. En este ejemplo, la cadena conmutadora 28D incluye nueve bases adicionales 36' que forman un tallo-lazo 44. Como otro ejemplo, las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22 pueden ser A-G-T-T-T-T-T-T-G y la cadena conmutadora 28C puede ser T-C-C. En este ejemplo, la cadena
20 conmutadora 28C incluye nueve bases adicionales 36' que forman un tallo-lazo 44. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 3D, puede usarse cualquier secuencia adecuada para la cadena conmutadora 28C, siempre que tenga más que el número total de bases 24 expuestas en el hueco 22 e incluya al menos algunas bases nucleotídicas que sean complementarias con las bases 24
25 expuestas en el hueco 22. Las bases nucleotídicas en cualquier extremo del

tallos-lazo 44 pueden ser completamente complementarias con las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco 22, pueden incluir una o más bases no complementarias, pueden tener bases faltantes o pueden incluir combinaciones de bases complementarias, no complementarias y faltantes. Como se muestra en la Fig. 3D, cuando la cadena conmutadora 28D del nucleótido marcado 30D se asocia a su vez en el hueco 22, i) parte de las bases nucleotídicas 36 en la cadena conmutadora 28D temporalmente y al menos parcialmente se hibridan con las bases complementarias 24 respectivas y ii) parte de las bases nucleotídicas no complementarias 36" en la cadena conmutadora 28D permanecen sin unir y forman el tallo-lazo 44. Cuando se incorpora, la cadena conmutadora 28D cierra un conmutador del ANbc modificado 16', que cambia significativamente (por ejemplo, aumenta) la conductividad del ANbc modificado 16', modula el canal 16 y da como resultado un cambio detectable. Parte de la corriente electrónica se transportará en cualquiera de las cadenas 18, 20 (por ejemplo, cuando ambas cadenas 18, 20 se unen a los electrodos 12, 14), por lo que añadir un tallo-lazo 44 es comparable a añadir una resistencia más grande en paralelo.

Cualquier ejemplo de los nucleótidos marcados 30 (por ejemplo, 30A, 30B, 30C, 30D) que se desvela en el presente documento puede usarse en una solución de reactivo de un ejemplo del kit, y/o en un sistema de detección 40, 40', ejemplos de los cuales se muestran en las Fig. 4 y 5. Cada uno de los sistemas 40, 40' también incluye un ejemplo del sensor 10 que se desvela en el presente documento.

El ejemplo del sistema de detección 40 que se muestra en la Fig. 4 incluye una célula de flujo 41 y un sensor electrónico 10 integrado en la célula de flujo

41. El sensor electrónico 10 incluye dos electrodos 12, 14; un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16 que une los dos electrodos 12, 14, incluyendo el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16 dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas (a través de
5 enlaces de hidrógeno) entre sí, un hueco 22 en una primera cadena 18 de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas 24 de una segunda cadena 20 de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco 22. La célula de flujo 41 es un recipiente que contiene el sensor 10. Ha de comprenderse que otros recipientes, tales como un pocillo,
10 tubo, canal, cubeta, placa de Petri, frasco o similares pueden contener como alternativa el sensor 10. Los procesos cíclicos, tales como las reacciones de secuenciación de ácido nucleico, son particularmente adecuados para las células de flujo 41.

Las células de flujo de ejemplo 41 incluyen un sustrato/soporte 13 y una
15 tapa unida directa o indirectamente a la misma o formada integralmente con la misma. La célula de flujo 41 puede incluir una entrada de fluido 45 y una salida de fluido 47 que permiten la entrega de reactivos a granel a un sensor 10 o una matriz de sensores 10 contenidos dentro de la célula de flujo 41.

El sistema de detección 40 también puede incluir un sistema de entrega
20 de reactivo 49 para introducir selectivamente un reactivo en una entrada (por ejemplo, entrada de fluido 45) de la célula de flujo 41, sobre el sensor 10 y, después, fuera de la salida de fluido 47. El sistema de entrega de reactivo 49 puede incluir tubos u otros fluidos que pueden unirse de forma permanente o extraíble a la entrada de fluido 45. El sistema de entrega de reactivo 49 puede
25 incluir un recipiente de muestra 51. El reactivo (incluyendo el nucleótido marcado

30 que ha de introducirse en el sensor electrónico 10) puede almacenarse en el recipiente de muestra o prepararse e introducirse en el recipiente de muestra justo antes de su uso. El sistema de entrega de reactivo 49 también puede incluir una bomba u otro equipo adecuado para recuperar el reactivo del recipiente de muestra 51 y entregarlo a la entrada de fluido 45. En otros ejemplos, el recipiente de muestra 51 se posiciona de manera que el reactivo pueda fluir por gravedad a la entrada de fluido 45, sobre el sensor 10 y fuera de la salida de fluido 47.

El sensor 10 en la célula de flujo 41 también puede conectarse operativamente a un detector 15 para detectar cambios de conductividad del sensor 10 cuando se usa el sistema de detección 40.

Otro ejemplo del sistema 40' se muestra en la Fig. 5 e incluye un sensor electrónico 10, que incluye dos electrodos 12, 14; un polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16 que une los dos electrodos 12, 14, incluyendo el polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16 dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas (a través de enlaces de hidrógeno) entre sí, un hueco 22 en una primera cadena 18 de las cadenas polinucleotídicas en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas 24 de una segunda cadena 20 de las cadenas polinucleotídicas expuestas en el hueco 22; y reactivos separados que han de introducirse en el sensor electrónico 10, incluyendo los reactivos nucleótidos marcados 30, incluyendo al menos uno de los nucleótidos marcados 30 un nucleótido 32, una molécula de enlace 34 unida a un grupo fosfato del nucleótido, una cadena conmutadora 28 unida a la molécula de enlace 34, incluyendo la cadena conmutadora 28 una cadena de nucleótidos que incluye bases 36 complementarias con al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas 24

expuestas en el hueco 22. En el ejemplo que se muestra en la Fig. 5, la cadena polinucleotídica 18 es ACCGGGGTA-gap-ATCCG y la cadena polinucleotídica 20 es TGGGCCCCATCCCCCCTAGGC (SEQ. ID No. 1). En la cadena polinucleotídica 20, las bases nucleotídicas "CCCCC" se exponen en el hueco 22 (al menos hasta que una cadena conmutadora 28 se asocia a ellas).

Aunque no se muestra, ha de comprenderse que el sensor 10 puede posicionarse dentro o en parte de un recipiente, tal como una célula de flujo 41 (Fig. 4), un tubo, canal, cubeta, placa de Petri, frasco o similar. Otro ejemplo de un recipiente adecuado es una célula de flujo.

Aunque se muestra un sensor 10 en la Fig. 5, ha de comprenderse que el sistema de detección 40' puede incluir una matriz de sensores 10 posicionada sobre un sustrato. Por otra parte, el sensor o sensores 10 del sistema de detección 40' pueden estar cada uno conectado eléctricamente a un detector 15 respectivo para detectar una respuesta del sensor eléctrico 10 cuando la cadena conmutadora 28 se asocia en el hueco 22.

Algunos ejemplos del sistema de detección 40' incluyen adicionalmente una polimerasa 38 anclada al ANbc modificado 16' y una cadena polinucleotídica molde 48 que ha de introducirse en el sensor 10.

Como se muestra en la Fig. 5, el sensor 10 incluye la polimerasa 38. Puede usarse cualquier ADN polimerasa para catalizar la adición de un nucleótido a la vez a la cadena naciente. La ADN polimerasa puede ser de cualquiera de las siguientes familias: A, B, C, D, X, Y y RT. Los ejemplos específicos de la familia A incluyen ADN polimerasa T7, Pol I, Pol γ , Pol Θ o Pol ν ; o de la familia B incluyen Pol II, Pol B, Pol ζ , Pol α , Pol δ y Pol ϵ ; o de la familia C incluyen Pol III; o de la familia D incluyen Pol D (heterodímero DP1/DP2) o de

la familia X incluyen Pol β , Pol σ , Pol λ , Pol μ y desoxinucleotidil transferasa terminal; o de la familia Y incluyen Pol ι , Pol κ , Pol η , Pol IV y Pol V; o de la familia RT incluyen Telomerasa.

Como se muestra en la Fig. 5, la polimerasa 38 se inmoviliza en el ANbc modificado 16' con una unión 46. En otro ejemplo, la polimerasa 38 se inmoviliza a un sustrato con la unión 46. La unión 46 se usa como un ancla para la polimerasa 38 y puede ser deseable que la unión 46 no sea conductora. Una unión no conductora puede ser particularmente deseable cuando la polimerasa 38 se une al ANbc modificado 16'. Los ejemplos de una unión 46 adecuada incluyen polietilenglicol (PEG) con un enlace escindible en algún punto a lo largo de la cadena de PEG o pueden incluir química de níquel NTA/marcador His, química de estreptavidina/biotina (por ejemplo, estreptavidina unida al ANbc modificado 16' y biotina unida a la polimerasa 38), hibridación de ADN-ADN, hibridación de ADN-APN, carboxilsilano 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) o cualquier otro enlazador adecuado que pueda unir la polimerasa al ADN modificado 16' o a la superficie del sustrato. En algunos ejemplos, la unión 46 mantiene la polimerasa 38 al menos a 10 nm de distancia del ANbc modificado 16'. Esto puede ser deseable, por ejemplo, para que los cambios conformacionales en la polimerasa 38, las cargas de la polimerasa 38 y/o las cargas de la cadena polinucleotídica objetivo/molde 48 mantenida por la polimerasa 38 no interfieran con la operación de detección del ANbc modificado 16'.

En un ejemplo, el ANbc modificado 16' puede estar unido inicialmente a la polimerasa 38 por la unión 46, que incluye un enlace escindible. Esta combinación puede introducirse en los electrodos 12, 14 para unir los extremos

opuestos del ANbc modificado 16' a los electrodos 12, 14 y para unir la polimerasa 38 a una superficie del sustrato a través de, por ejemplo, química de Níquel NTA/marcador de His. En este ejemplo, el enlace escindible puede escindirse para separar la polimerasa 38 del ANbc modificado 16'. En este
5 ejemplo, la polimerasa 38 está cerca del ANbc modificado 16', pero en realidad no lo está tocando. Ha de comprenderse que la unión 46 puede escindirse cuando se proporciona la química para mantener la polimerasa 38, por ejemplo, sobre la superficie del sustrato y cerca del sensor 10.

Como se menciona en el presente documento, los ejemplos del sistema
10 40, 40' también pueden incluir la cadena polinucleotídica molde 48 que ha de introducirse en el sensor 10.

La cadena polinucleotídica molde 48 puede ser cualquier muestra que haya de secuenciarse y puede estar compuesta por ADN, ARN o análogos de los mismos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). La fuente de la cadena
15 polinucleotídica 48 molde (u objetivo) puede ser ADN genómico, ARN mensajero u otros ácidos nucleicos de fuentes nativas. En algunos casos, la cadena polinucleotídica molde 48 que deriva de dichas fuentes puede amplificarse antes de su uso en un método o sistema 40, 40' del presente documento. Puede usarse cualquiera de una diversidad de técnicas de amplificación conocidas incluyendo,
20 pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) o amplificación por cebador aleatorio (RPA). Ha de comprenderse que la amplificación de la cadena polinucleotídica molde 48 antes de su uso en el método o sistema 40, 40' establecido en el presente documento es opcional. Por
25 tanto, la cadena polinucleotídica molde 48 no se amplificará antes de su uso en

algunos ejemplos. Las cadenas polinucleotídicas molde/objetivo pueden derivar opcionalmente de bibliotecas sintéticas. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden tener composiciones de ADN o ARN nativas o pueden ser análogos de las mismas.

5 Las muestras biológicas de las que puede derivar la cadena polinucleotídica molde 48 incluyen, por ejemplo, las de un mamífero, tal como un roedor, ratón, rata, conejo, cobaya, ungulado, caballo, oveja, cerdo, cabra, vaca, gato, perro, primate, primate humano o no humano; una planta tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, sorgo, avena, trigo, arroz, colza o soja; un alga tal
 10 como *Chlamydomonas reinhardtii*; un nematodo tal como *Caenorhabditis elegans*; un insecto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de la fruta, abeja melífera o araña; un pez tal como el pez cebra; un reptil; un anfibio tal como una rana o *Xenopus laevis*; un *dictyostelium discoideum*; un hongo tal como *pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levadura, *Saccharamoyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*; o un *plasmodium falciparum*. Las
 15 cadenas polinucleotídicas molde 48 también pueden derivar de procariotas tales como una bacteria, *Escherichia coli*, estafilococos o *mycoplasma pneumoniae*; una arquea; un virus tal como el virus de la hepatitis C, el virus del ébola o el virus de la inmunodeficiencia humana; o un viroide. Las cadenas
 20 polinucleotídicas molde 48 pueden derivar de un cultivo o una población homogéneos de los organismos anteriores o, como alternativa, de una colección de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Por otra parte, las cadenas polinucleotídicas molde 48 pueden no derivar de fuentes naturales, sino que pueden sintetizarse usando técnicas conocidas.
 25 Por ejemplo, pueden sintetizarse y usarse sondas de expresión génica o sondas

de genotipado en los ejemplos que se exponen en el presente documento.

En algunos ejemplos, las cadenas polinucleotídicas molde 48 pueden obtenerse como fragmentos de uno o más ácidos nucleicos más grandes. La fragmentación puede realizarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, nebulización, tratamiento por ultrasonidos, escisión química, escisión enzimática o cizalla física. La fragmentación también puede ser resultado del uso de una técnica de amplificación particular que produzca amplicones copiando solamente una porción de una cadena de ácido nucleico más grande. Por ejemplo, la amplificación por PCR produce fragmentos que tienen un tamaño definido por la longitud de la secuencia nucleotídica en el molde original que está entre las ubicaciones donde los cebadores flanqueantes se hibridan durante la amplificación. La longitud de la cadena polinucleotídica molde 48 puede ser en términos del número de nucleótidos o en términos de una longitud métrica (por ejemplo, nanómetros).

Una población de cadenas polinucleotídicas molde/objetivo 48 o amplicones de las mismas, puede tener una longitud de cadena promedio que se desee o apropiada para una aplicación particular de los métodos o sistemas 40, 40' que se exponen en el presente documento. Por ejemplo, la longitud de cadena promedio puede ser inferior a aproximadamente 100.000 nucleótidos, aproximadamente 50.000 nucleótidos, aproximadamente 10.000 nucleótidos, aproximadamente 5.000 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 50 nucleótidos. Como alternativa o adicionalmente, la longitud de cadena promedio puede ser superior a aproximadamente 10 nucleótidos,

aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 5.000 nucleótidos, aproximadamente 10.000 nucleótidos, aproximadamente 50.000 nucleótidos o aproximadamente 100.000 nucleótidos.

- 5 La longitud de cadena promedio para una población de cadenas polinucleotídicas molde/objetivo 48 o amplicones de las mismas, puede estar en un intervalo entre un valor máximo y mínimo establecido anteriormente.

En algunos casos, puede producirse una población de cadenas polinucleotídicas molde/objetivo 48 en condiciones o puede configurarse de otro modo para que tenga una longitud máxima para sus elementos. Por ejemplo, la longitud máxima para los elementos puede ser inferior a aproximadamente 100.000 nucleótidos, aproximadamente 50.000 nucleótidos, aproximadamente 10.000 nucleótidos, aproximadamente 5.000 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 50 nucleótidos. Como alternativa o adicionalmente, una población de cadenas polinucleotídicas molde 48 o amplicones de las mismas, puede producirse en condiciones o puede configurarse de otro modo para que tenga una longitud mínima para sus elementos. Por ejemplo, la longitud mínima para los elementos puede ser superior a aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 1.000 nucleótidos, aproximadamente 5.000 nucleótidos, aproximadamente 10.000 nucleótidos, aproximadamente 50.000 nucleótidos o aproximadamente 100.000 nucleótidos. La longitud de cadena máxima y mínima para las cadenas polinucleotídicas molde 48 en una población puede estar en un

intervalo entre un valor máximo y mínimo establecido anteriormente.

Como se muestra en la Fig. 5, la cadena polinucleotídica molde 48 (por ejemplo, una cadena de ADN monocatenario) que ha de secuenciarse se une a la polimerasa 38 después de haberse introducido en solución junto con reactivos, tales como los nucleótidos marcados 30.

En algunos ejemplos, pueden usarse varios nucleótidos marcados 30 diferentes (por ejemplo, marcados respectivamente con dA, dC, dG y dT como nucleótido 32) juntos en un sistema 40, 40' que incluye una matriz de sensores 10. En un ejemplo, se usan cuatro nucleótidos marcados 30 diferentes, incluyendo cada uno un nucleótido 32 diferente y una cadena conmutadora 28 específica de nucleótido diferente. Como ejemplo, los nucleótidos marcados 30 incluyen un primer nucleótido marcado, que incluye polifosfato de desoxiadenosina como nucleótido y una primera cadena conmutadora específica de nucleótido; un segundo nucleótido marcado, que incluye polifosfato de desoxiguanosina como nucleótido y una segunda cadena conmutadora específica de nucleótido que tiene una secuencia diferente que la primera cadena conmutadora; un tercer nucleótido marcado, que incluye polifosfato de desoxicitidina como nucleótido y una tercera cadena conmutadora específica de nucleótido que tiene una secuencia diferente que cada una de las cadenas conmutadoras primera y segunda; y un cuarto nucleótido marcado, que incluye polifosfato de desoxitimidina como nucleótido y una cuarta cadena conmutadora específica de nucleótido que tiene una secuencia diferente que cada una de las cadenas conmutadoras primera, segunda y tercera. Por tanto, en este ejemplo, las cadenas conmutadoras específicas de nucleótido primera, segunda, tercera y cuarta son diferentes entre sí. Las diferentes cadenas conmutadoras generarán

diferentes cambios de conductividad (cuando se asocian en un hueco complementario 22), que pueden usarse para identificar el nucleótido específico unido a las mismas.

Con referencia ahora a la Fig. 6, se representa un ejemplo de un método.

5 El método 100 incluye introducir una cadena polinucleotídica molde 48 en un sensor electrónico 10 que tiene una polimerasa 38 unida a i) un canal modulable conductor de electricidad 16 que une un espacio entre medias y se conecta eléctricamente a dos electrodos 12, 14 o ii) un sustrato 13 que soporta los dos electrodos 12, 14, incluyendo el canal modulable conductor de electricidad 16 un
10 polímero de ácido nucleico parcialmente bicatenario modificado 16', que incluye: dos cadenas polinucleotídicas 18, 20 parcialmente unidas entre sí; un hueco 22 en una primera cadena de las cadenas polinucleotídicas 18 en el que faltan nucleótidos; y una pluralidad de bases nucleotídicas 24 de una segunda cadena de las cadenas polinucleotídicas 20 expuestas en el hueco 22 en la primera de
15 las cadenas polinucleotídicas 18 (número de referencia 102); introducir reactivos que incluyen nucleótidos marcados 30 en el sensor electrónico 10, por lo que un nucleótido 32 de uno de los nucleótidos marcados se asocia a la polimerasa 38 y una cadena conmutadora específica de nucleótido 28 de uno de los nucleótidos marcados 30 se asocia a al menos parte de la pluralidad de bases nucleotídicas
20 24 expuestas en el hueco 22 (número de referencia 104); y en respuesta a la asociación en el hueco 22, detectar una respuesta del sensor electrónico 10. También se hará referencia a la Fig. 5 a lo largo del análisis del método 100.

Como se muestra en la Fig. 5, la cadena polinucleotídica molde 48 introducida en el sensor 10 puede mantenerse en su lugar por la polimerasa 38,
25 que se une al sensor 10 o a una superficie de sustrato que soporta el sensor 10.

La cadena polinucleotídica molde 48 que se muestra en la Fig. 5 es una cadena molde de ADN. La cadena polinucleotídica molde 48 puede introducirse en una solución biológicamente estable, junto con reactivos, tales como los nucleótidos marcados 30. La solución biológicamente estable puede ser cualquier tampón
5 adecuado para reacciones de incorporación de bases de polimerasa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la amplificación lineal. Como ejemplo, la solución biológicamente estable puede incluir un tampón que tenga un pH cercano a 7, una concentración de sal superior a varios milimolares y iones Mg^{2+} a una concentración milimolar.

10 Además, como se muestra en la Fig. 5, el nucleótido marcado 30 puede incluir una base que sea complementaria con un ácido nucleico objetivo de la cadena polinucleotídica molde 48. El nucleótido marcado 30 se mantendrá en su lugar, en parte, por la polimerasa 38 que también se une a la cadena polinucleotídica molde 48.

15 La interacción entre el nucleótido marcado 30 y la polimerasa 38 y la longitud de la molécula de enlace 34 permiten que la cadena conmutadora 28 se asocie al hueco 22 del sensor 10. En un ejemplo, la asociación de la cadena conmutadora 28 al hueco 22 implica la hibridación de al menos una porción de la cadena conmutadora 28 con las bases nucleotídicas 24 expuestas en el hueco
20 22. La hibridación que tiene lugar dependerá, en parte, de la cadena conmutadora 28 (por ejemplo, 28A, 28B, 28C, 28D) que se use. La temperatura y/o la concentración de iones de la solución pueden ajustarse con el fin de iniciar o promover la hibridación o emparejamiento total o parcial de la cadena conmutadora 28 con al menos parte de las bases nucleotídicas 24 expuestas en
25 el hueco 22. Como ejemplo, la cadena conmutadora 28 puede diseñarse para

hibridarse parcialmente o por completo con el hueco 22 a temperatura ambiente (por ejemplo, de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 22 °C) y en una solución que tiene una concentración de sal 50 mM.

La polimerasa 38 mantendrá la cadena conmutadora 28 cerca del hueco 22, permitiendo de este modo que se produzcan varios eventos de hibridación y deshibridación. Por el contrario, una cadena aleatoria que se desplace probablemente se hibridará una vez y después se alejará. La cadena conmutadora 28 puede mantenerse cerca del hueco 22 hasta que se disocie, por ejemplo, usando fusión u otra técnica adecuada. En algunos casos, la asociación de la cadena conmutadora en el hueco 22 puede ser de hasta decenas de milisegundos o más. Esta interacción relativamente larga pone el conmutador en "ENCENDIDO" (por ejemplo, modula el canal 16 aumentando la conductancia desde el estado inferior) y puede detectarse el cambio en la conductividad. Esta interacción relativamente larga es diferente de otros nucleótidos marcados 30 presentes en la solución (es decir, la cadena aleatoria, que se desplaza), que pueden difundir y tocarse brevemente, pero no experimentar varios eventos de hibridación y deshibridación al menos parcial en el sensor 10. La breve interacción de estos otros nucleótidos marcados 30 puede provocar un cambio de conductividad de corta duración y/o esporádico y, por tanto, puede distinguirse del cambio de conductividad resultado de que la cadena conmutadora 28 se mantenga cerca del hueco 22.

Cuando la cadena conmutadora 28 se hibrida al menos parcialmente y se deshibrida varias veces con las bases nucleotídicas 24 expuestas, la respuesta del sensor 10 puede ser indicativa de la base del nucleótido marcado 30 porque la cadena conmutadora 28 es específica de nucleótido (es decir, una cadena

conmutadora 28 específica se selecciona para una base específica). Por tanto, el método 100 también puede implicar asociar la respuesta del sensor 10 con la cadena conmutadora 28 específica de nucleótido asociada (es decir, el nucleótido marcado 30 que se ha asociado a la polimerasa 38 y el hueco 22) y, basándose en la cadena conmutadora 28 específica de nucleótido, identificar el nucleótido (por ejemplo, la base) del nucleótido marcado 30 asociado (es decir, el nucleótido marcado 30 que se ha asociado a la polimerasa 38 y el hueco 22).

La base del nucleótido marcado 30 asociado se incorporará en una cadena naciente 50 que se hibrida con la cadena polinucleotídica molde 48. Esto, a su vez, romperá el enlace entre el grupo o grupos fosfato del nucleótido marcado 30 y la base nucleotídica recientemente incorporada. Esto escinde el resto del nucleótido marcado 30 de la base nucleotídica recientemente incorporada.

Puesto que puede preferirse que la cadena conmutadora 28 se hibride al menos parcialmente y se quede conectada en la configuración de doble hélice del ANbc modificado 16', el método 100 puede implicar adicionalmente calentar para disociar la cadena conmutadora 28 específica de nucleótido del hueco 22. La temperatura de fusión de la cadena conmutadora 28 puede ajustarse cuando se sintetiza el nucleótido marcado 30 para hacer que el tiempo de "ENCENDIDO" sea más corto o más largo, dependiendo, en parte, de cuánto tiempo la polimerasa 38 mantiene el nucleótido 32 del nucleótido marcado 30. En un ejemplo, la temperatura de fusión puede ajustarse para que se corresponda con la temperatura a la que funciona el sistema de detección 40, 40' cuando el enlace entre el grupo o grupos fosfato del nucleótido marcado 30 y la base nucleotídica recientemente incorporada. Esto provocaría la disociación de la cadena

conmutadora 28 dentro del mismo marco temporal de cuando el nucleótido marcado 30 se escinde. En otro ejemplo, puede ser deseable que el tiempo de "APAGADO" de la cadena conmutadora 28 sea mucho más corto que el tiempo que la polimerasa 28 mantiene el nucleótido marcado 30 durante la incorporación en la cadena naciente 50. Esto puede minimizar los eventos de fondo de las cadenas conmutadoras 28 que no se asocian a la polimerasa 28.

Como resultado de la escisión y disociación, el resto del nucleótido marcado 30 está libre para disociarse de la base nucleotídica y difundir lejos del sensor 10. La escisión y la disociación nuevamente modulan el canal 16, devolviendo la conductividad del sensor 10 al estado de conductividad inicial (por ejemplo, inferior) en el que se encontraba antes de la asociación del nucleótido marcado 30 con la polimerasa 38 y con el hueco 22. La aparición y desaparición de la señal a medida que cambia la conductividad del sensor 10 (por ejemplo, aumenta y vuelve al estado inferior), respectivamente, pueden correlacionarse con la incorporación de una base nucleotídica en la cadena naciente 50 de la cadena nucleotídica molde 48 y la disociación posterior del nucleótido marcado 30.

En el método de ejemplo 100, la asociación de uno de los nucleótidos marcados 30 (ala polimerasa 32 y el hueco 22), la detección, la asociación de la respuesta y la identificación conjunta pueden usarse para la detección de una única molécula de un evento de incorporación de polimerasa (es decir, qué nucleótido se ha incorporado en la cadena naciente 50).

Debería apreciarse que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y los conceptos adicionales que se analizan con superior detalle a continuación (siempre que dichos conceptos no sean mutuamente incoherentes)

se contemplan como parte de la materia inventiva objeto que se desvela en el presente documento. En particular, todas las combinaciones de materia objeto reivindicadas que aparecen al final de la presente divulgación se consideran parte de la materia objeto inventiva que se desvela en el presente documento.

- 5 También debe apreciarse que la terminología empleada explícitamente en el presente documento que también puede aparecer en cualquier divulgación incorporada como referencia debe tener el significado más coherente con los conceptos particulares que se desvelan en el presente documento.

La referencia en toda la memoria descriptiva a "un ejemplo", "otro ejemplo", "un ejemplo", etc., significa que un elemento particular (por ejemplo, el rasgo, la estructura y/o la característica) que se describe en relación con el ejemplo se incluye en al menos un ejemplo que se describe en el presente documento y puede o no estar presente en otros ejemplos. Además, ha de comprenderse que los elementos descritos para cualquier ejemplo pueden combinarse de cualquier manera adecuada en los diversos ejemplos a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" utilizados en toda la presente divulgación, incluidas las reivindicaciones, se usan para describir y explicar pequeñas fluctuaciones, tales como las debidas a variaciones en el procesamiento. Por ejemplo, pueden referirse a inferior o igual al $\pm 5\%$, tal como inferior o igual al $\pm 2\%$, tal como inferior o igual al $\pm 1\%$, tal como inferior o igual al $\pm 0,5\%$, tal como inferior o igual al $\pm 0,2\%$, tal como inferior o igual al $\pm 0,1\%$, tal como inferior o igual al $\pm 0,05\%$.

Además, ha de comprenderse que los intervalos que se proporcionan en el presente documento incluyen el intervalo establecido y cualquier valor o

subintervalo dentro del intervalo establecido, como si se citaran explícitamente. Por ejemplo, un intervalo representado por aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm, debe interpretarse como que incluye no solo los límites explícitamente citados de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm, 5 sino también que incluye valores individuales, tales como aproximadamente 15 nm, 22,5 nm, 45 nm, etc. y subintervalos, tales como de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 48 nm, etc.

Aunque se han descrito en detalle varios ejemplos, ha de comprenderse que los ejemplos desvelados pueden modificarse. Por tanto, la descripción 10 anterior no debe considerarse limitante.

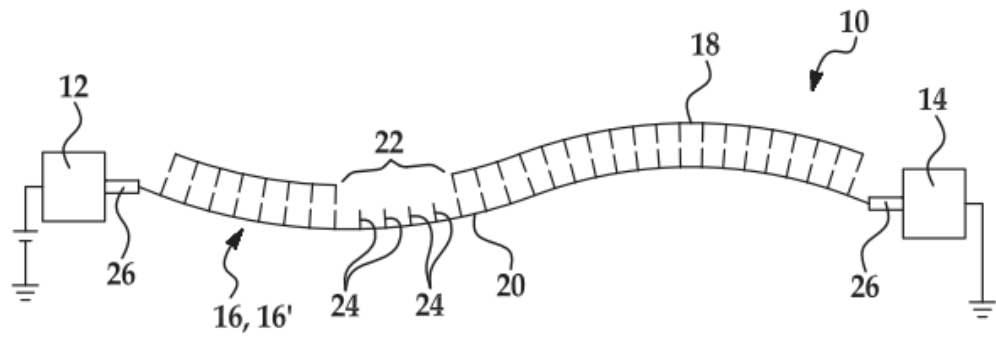


FIG. 1A

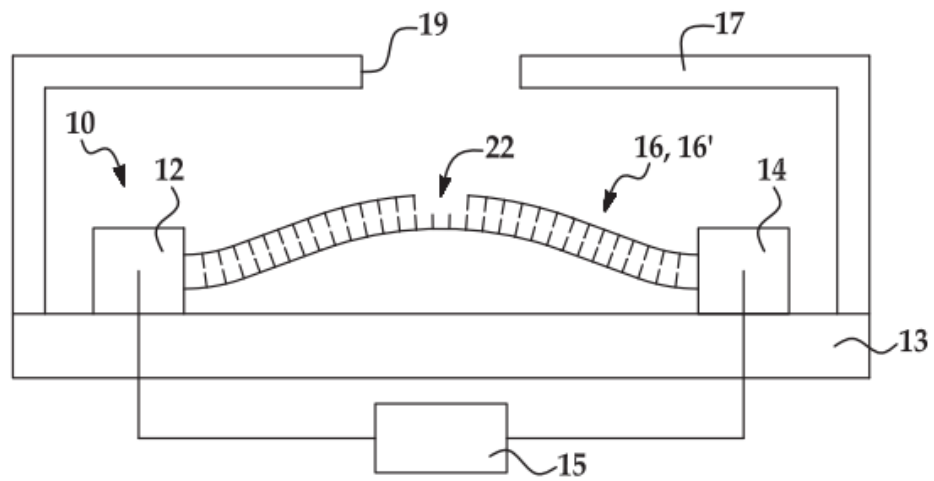


FIG. 1B

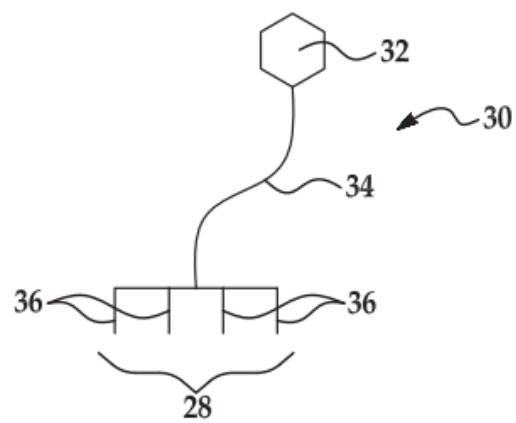


FIG. 2

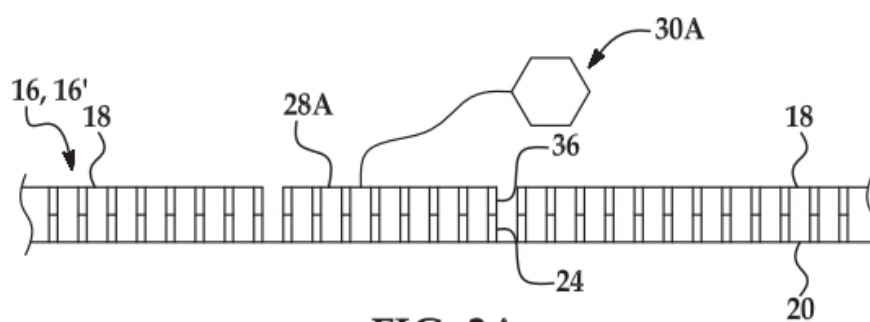


FIG. 3A

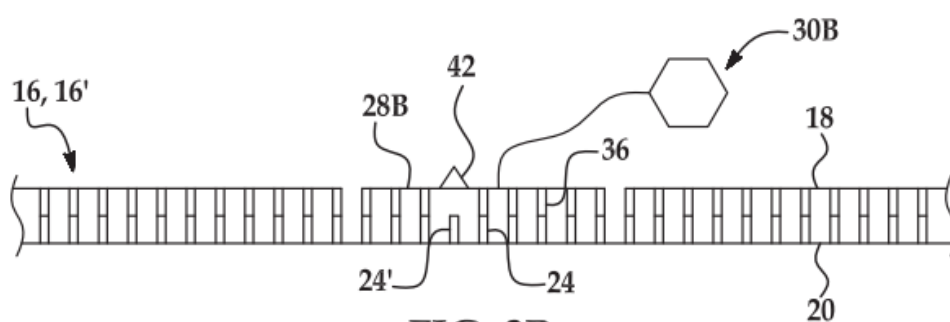


FIG. 3B

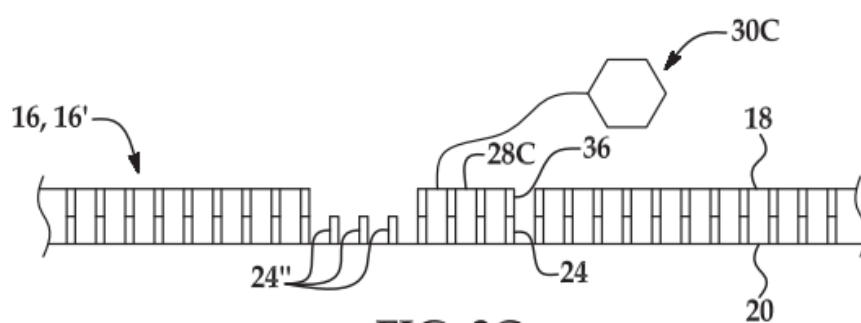


FIG. 3C

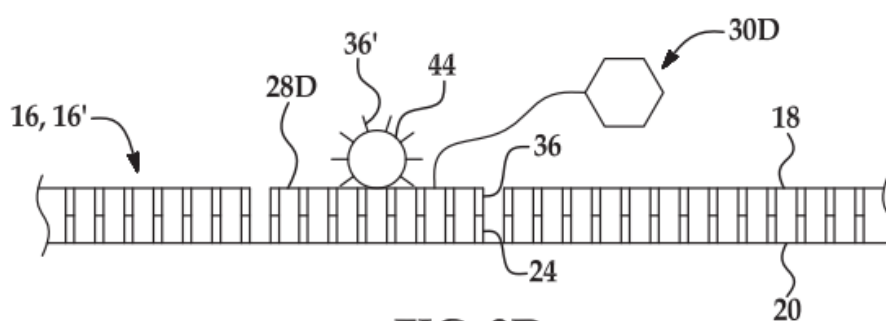


FIG. 3D

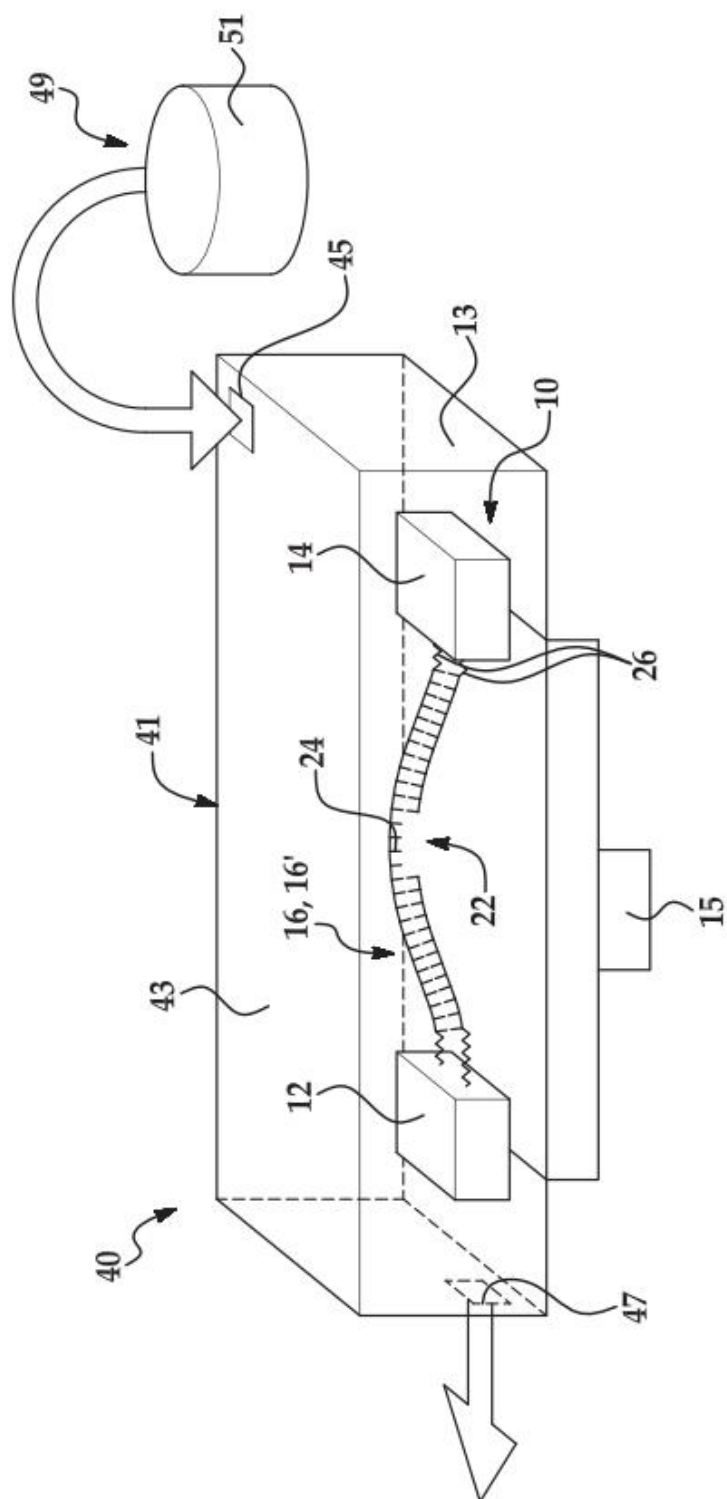


FIG. 4

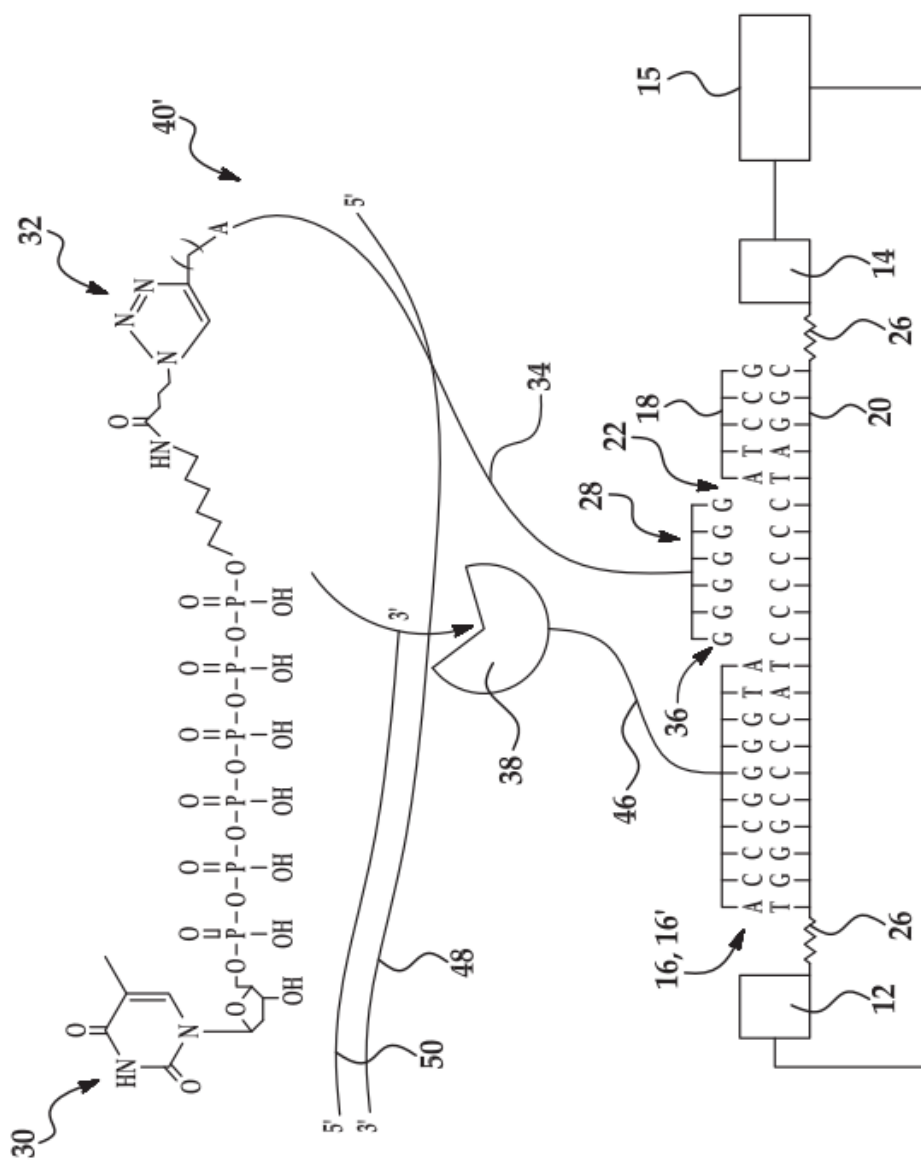


FIG. 5

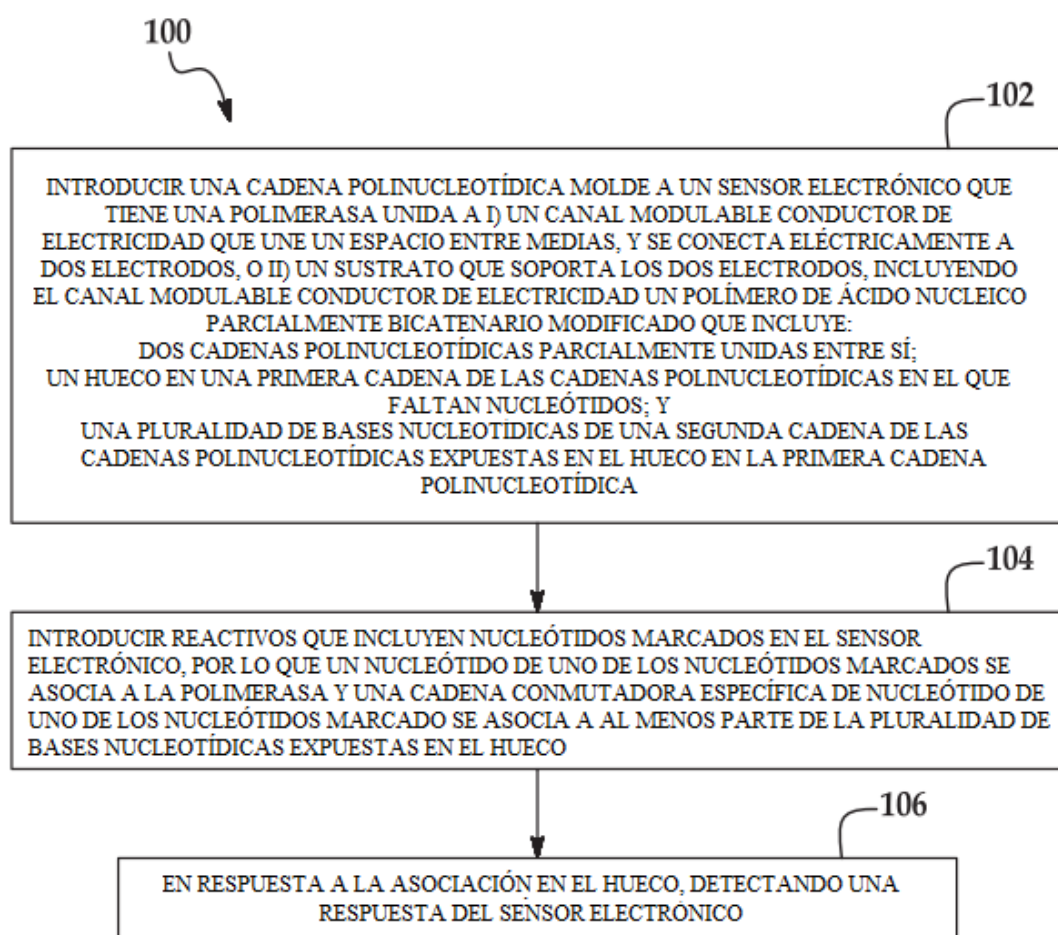


FIG. 6