

1
INTERCAMBIO DE REACTIVO EN UN INSTRUMENTO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 62/863.444, presentada el 19 de junio de 2019 y titulada Intercambio de reactivo en un instrumento. Todo el contenido de la solicitud antes mencionada se incorpora en el presente documento como
10 referencia.

ANTECEDENTES

Los instrumentos utilizados en la realización de métodos
15 para determinar el orden de nucleótidos en un polinucleótido, pueden incluir un sistema de gestión de reactivos (RMS) en comunicación fluida con una celda de flujo. El RMS es capaz de almacenar, seleccionar y hacer fluir secuencialmente una pluralidad de reactivos a través de un canal de flujo de la
20 celda de flujo.

Dichos métodos pueden incluir múltiples ciclos de una secuencia de reactivos seleccionados que se encaminan a través del canal de flujo de la celda de flujo para realizar diversas
25 reacciones químicas controladas en grupos de primeros polinucleótidos clonados colocados en el canal de flujo de la celda de flujo. Las reacciones químicas permiten que los nucleótidos marcados formen pares de bases, un par de bases a la vez, con la secuencia de bases de los primeros
30 polinucleótidos. Una vez emparejados, las marcas se excitan para emitir una señal de identificación que identifica el par

de bases. Cada polinucleótido marcado se añade a una segunda cadena polinucleotídica complementaria en crecimiento que es bicatenaria con el primer polinucleótido en la celda de flujo.

5 Por consiguiente, las segundas cadenas polinucleotídicas complementarias pueden formarse, una base a la vez, para determinar la secuencia de bases en el grupo de primeros polinucleótidos. Cuanto mayor sea el número de nucleótidos conocidos en las segundas cadenas polinucleotídicas
10 complementarias que se pueden construir (es decir, cuanto más larga sea la longitud de la segunda cadena polinucleotídica), más datos se pueden proporcionar con respecto al orden de los nucleótidos en el grupo de los primeros polinucleótidos y más rápido se vuelve el análisis general.

15

Sin embargo, si el intercambio de reactivo entre los flujos de reactivo no es suficiente, entonces puede ocurrir contaminación cruzada entre reactivos. Por consiguiente, existe la necesidad de instrumentos y métodos para determinar
20 el orden de los nucleótidos en los polinucleótidos, que han mejorado el intercambio de reactivos entre los flujos de reactivos.

BREVE DESCRIPCIÓN

25

La presente divulgación ofrece ventajas al proporcionar un instrumento operable para realizar un método de determinación del orden de nucleótidos en un polinucleótido de acuerdo con uno o más aspectos de la presente divulgación. El
30 método incluye una fase de lavado, en la que cuando fluye un reactivo tampón a través de un sistema de gestión de reactivos

y una celda de flujo de un instrumento, el volumen de barrido total del reactivo tampón es mayor que el consumo de fluido total del reactivo tampón. Asimismo, la relación entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total puede ser tan alto como 6, 10 o más. El método mejora el intercambio de reactivos sobre otros métodos, en los que el volumen de barrido total al consumo de fluido total es 1. Como tal, se reduce la pre-fase y se aumenta la longitud de los polinucleótidos que pueden crecer en relación con dichos otros métodos.

Un método de acuerdo con uno o más aspectos de la presente divulgación incluye hacer fluir un reactivo de incorporación a través de un sistema de gestión de reactivos y una celda de flujo de un instrumento. La celda de flujo tiene un primer polinucleótido colocado en su interior. El reactivo de incorporación añade una primera base a una secuencia de bases. La secuencia de bases incluye un segundo polinucleótido complementario al primer polinucleótido. Se captura una imagen de una señal de identificación que emana de la primera base después de que la primera base se haya añadido al segundo polinucleótido. Se hace fluir un reactivo de escisión a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo para eliminar un primer terminador de la primera base con el fin de permitir que una base posterior en la secuencia de bases se añada al segundo polinucleótido. Se hace fluir un reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia delante e inverso consecutivas para lavar el reactivo de escisión del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo.

En algunos ejemplos del método, la pluralidad de ciclos comprende 4 o más ciclos.

En algunos ejemplos del método, la pluralidad de ciclos
5 comprende 12 o más ciclos.

En algunos ejemplos del método, el sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo se colocan en un cartucho del instrumento, siendo el cartucho insertable de forma extraíble
10 en el instrumento.

En algunos ejemplos del método, el reactivo de incorporación, el reactivo de escisión y el reactivo tampón se almacenan en pocillos de reactivo del sistema de gestión de
15 reactivos, los pocillos de reactivo configurados para almacenar un volumen total finito de cada reactivo.

En algunos ejemplos del método, hacer fluir el reactivo tampón comprende:

20

hacer fluir un primer volumen de flujo hacia adelante del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia delante de cada ciclo de la pluralidad de ciclos; y hacer fluir un segundo volumen de flujo hacia atrás del reactivo tampón en la
25 dirección del flujo hacia atrás de cada ciclo de la pluralidad de ciclos, siendo el primer volumen de flujo hacia delante mayor que el segundo volumen de flujo hacia atrás.

En algunos ejemplos del método, el volumen de flujo hacia
30 delante es mayor que el volumen de flujo hacia atrás en aproximadamente un 3 % o más.

En algunos ejemplos del método, hacer fluir el reactivo tampón comprende:

un período de incubación sustancialmente sin flujo de reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo durante aproximadamente 10 segundos o más después del último ciclo de la pluralidad de ciclos; y hacer fluir un tercer volumen de flujo hacia delante del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia delante después del período de incubación.

En algunos ejemplos del método, el volumen de barrido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón, está sustancialmente determinado por la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\text{o}} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$, en la que:

$1^{\text{er}} \text{ FFV}$ es el primer volumen de flujo hacia delante,
El 2^{o} RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás,
 N es el número total de ciclos en la pluralidad de ciclos,
y
El $3^{\text{er}} \text{ FFV}$ es el tercer volumen de flujo hacia delante.

En algunos ejemplos del método, el consumo de fluido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón, está sustancialmente determinado por la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\text{o}} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$.

En algunos ejemplos del método, la relación entre el volumen de barrido total del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo tampón es igual o superior a aproximadamente 6.

En algunos ejemplos del método, el flujo en una dirección de flujo hacia delante y el flujo en una dirección de flujo hacia atrás están separados por un tiempo de retardo de aproximadamente 1 segundo o menos para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante e inverso.

En algunos ejemplos del método, el flujo en una dirección de flujo hacia adelante y el flujo en una dirección de flujo inversa está separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 200 milisegundos o menos para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás.

En algunos ejemplos del método, cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás está separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 200 milisegundos o menos.

Cualquiera de los ejemplos del método se puede implementar en cualquier combinación adecuada para lograr las ventajas descritas en el presente documento.

Un instrumento de acuerdo con uno o más aspectos de la presente divulgación incluye un sistema de gestión de reactivos operable para colocarse en el instrumento. El sistema de gestión de reactivos incluye una pluralidad de pocillos de reactivos. Los pocillos de reactivo tienen al menos un primero, un segundo y un tercer pocillo de reactivo configurados para contener un reactivo de incorporación, un reactivo de escisión y un reactivo tampón colocados respectivamente en el mismo. El

sistema de gestión de reactivos puede utilizarse para seleccionar un flujo de reactivo de uno de la pluralidad de pocillos de reactivo. Una celda de flujo puede operarse para colocarse en el instrumento. La celda de flujo incluye un canal de flujo en comunicación fluida con el sistema de gestión de reactivos. El canal de flujo es operable para dirigir el flujo de reactivo sobre un primer polinucleótido colocado en el canal de flujo. El instrumento se puede utilizar para:

10 hacer fluir el reactivo de incorporación, a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo, para añadir una primera base a una secuencia de bases, comprendiendo la secuencia de bases un segundo polinucleótido complementario al primer polinucleótido;

15 capturar una imagen, de una señal de identificación procedente de la primera base, después de que la primera base se haya añadido al segundo polinucleótido;

 hacer fluir el reactivo de escisión, a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo, para eliminar un primer terminador desde la primera base con el fin de permitir que una base posterior en la secuencia de bases se añada al segundo polinucleótido; y

 hacer fluir el reactivo tampón, a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones de flujo consecutivas hacia adelante y hacia atrás para lavar el reactivo de escisión del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo.

 En algunos ejemplos, el instrumento comprende un cartucho operable para contener el sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo, en el que el reactivo de incorporación, el

reactivo de escisión y el reactivo tampón se almacenan en pocillos de reactivo del sistema de gestión de reactivos, los pocillos de reactivo configurados para almacenar un volumen total finito de cada reactivo.

5

En algunos ejemplos, el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de 4 o más ciclos de direcciones de flujo consecutivas hacia adelante y hacia atrás.

10

En algunos ejemplos, el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón de manera que:

15

se hace fluir un primer volumen del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia delante de cada ciclo de la pluralidad de ciclos;

20

se hace fluir un segundo volumen del reactivo tampón en la dirección de flujo hacia atrás de cada ciclo de la pluralidad de ciclos, siendo el primer volumen mayor que el segundo volumen;

25

se impone un período de incubación de sustancialmente ningún flujo del reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo durante aproximadamente 10 segundos o más después del último ciclo de la pluralidad de ciclos; y

se hace fluir un tercer volumen de flujo hacia adelante del reactivo tampón fluye en la dirección del flujo hacia adelante después del período de incubación.

30

En algunos ejemplos, el instrumento es operable para hacer

fluir el reactivo tampón de manera que:

un volumen de barrido total del reactivo tampón se determina sustancialmente mediante la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\circ}$

5 $\text{RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$, en la que:

$1^{\text{er}} \text{ FFV}$ es el primer volumen de flujo hacia delante,

El 2° RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás,

N es el número total de ciclos en la pluralidad de ciclos,

y

10 el $3^{\text{er}} \text{ FFV}$ es el tercer volumen de flujo hacia adelante;

un consumo de fluido total del reactivo tampón se determina sustancialmente mediante la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} - 2^{\circ}$
 $\text{RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$; y

en el que la relación entre el volumen de barrido total
 15 del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo
 tampón es igual o superior a aproximadamente 6.

En algunos ejemplos, el instrumento es operable para hacer
 fluir el reactivo tampón de manera que el flujo en una dirección
 20 de flujo hacia adelante y el flujo en una dirección de flujo
 hacia atrás esté separado por un tiempo de retardo de
 aproximadamente 200 milisegundos o menos para cada ciclo de la
 pluralidad de ciclos de las direcciones de flujo hacia adelante
 y hacia atrás.

25

Cualquiera de los ejemplos de los instrumentos se puede
 implementar en cualquier combinación adecuada para lograr las
 ventajas descritas en el presente documento.

30 Debe apreciarse que todas las combinaciones de los
 aspectos anteriores, incluyendo los métodos e instrumentos, y

los conceptos adicionales que se analizan con mayor 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.

5

Este y otros objetivos, las características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de los diversos aspectos de la divulgación tomados junto con los dibujos adjuntos.

10

DIBUJOS

La divulgación se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que, en los que:

15

La FIG. 1 representa un ejemplo simplificado de la estructura química de un nucleótido según los aspectos desvelados en el presente documento;

20

La figura 2 representa un ejemplo simplificado de un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido complementarios en crecimiento según los aspectos descritos en el presente documento;

25

La figura 3 representa un ejemplo de diagrama de flujo de un método para determinar el orden de los nucleótidos en un polinucleótido según los aspectos desvelados en el presente documento;

30

la figura 4 representa un ejemplo de diagrama de flujo de

otro método para determinar el orden de los nucleótidos en un polinucleótido según los aspectos desvelados en el presente documento;

5 la figura 5 representa una tabla que muestra varias relaciones de volumen de barrido total con respecto al consumo de fluido total de reactivo tampón obtenido durante un ejemplo de trabajo de una fase de lavado según los aspectos desvelados en el presente documento;

10

 la figura 6 representa gráficos de las relaciones de los volúmenes de barrido totales al consumo de fluido total frente a la pendiente antes de la fase que se representaron a partir de los datos obtenidos en el ejemplo de trabajo de la figura 5
15 según los aspectos desvelados en el presente documento;

 la figura 7 representa un ejemplo de un diagrama esquemático de un instrumento según los aspectos desvelados en el presente documento; y

20

 la figura 8 representa un ejemplo de un diagrama de bloques esquemático del instrumento de la figura 7 según los aspectos desvelados en el presente documento.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

 A continuación se describirán algunos ejemplos para proporcionar una comprensión general de los principios de la estructura, función, fabricación y uso de los métodos, sistemas
30 y dispositivos desvelados en el presente documento. En los dibujos adjuntos se ilustran uno o más ejemplos. Los expertos

en la materia entenderán que los métodos, sistemas y dispositivos descritos específicamente en el presente documento e ilustrados en los dibujos adjuntos son ejemplos no limitantes y el alcance de la presente divulgación se define únicamente mediante las reivindicaciones. Las características ilustradas o descritas en relación con un ejemplo pueden combinarse con las características de otros ejemplos. Tales modificaciones y variaciones se pretende que queden incluidas dentro del alcance de la presente divulgación.

10

Los términos "sustancialmente", "aproximadamente", "aproximadamente", "relativamente", u otros términos similares que puedan usarse a lo largo de esta divulgación, incluidas las reivindicaciones, se usan para describir y explicar pequeñas fluctuaciones, tales como las debidas a variaciones en el procesamiento, de una referencia o parámetro. Estas pequeñas fluctuaciones incluyen una fluctuación cero con respecto a la referencia o parámetro. Por ejemplo, pueden referirse a inferior o igual al $\pm 10\%$, tal como 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 $\pm 0,05\%$.

25

Por referencia a la Figura 1, se representa un ejemplo simplificado de la estructura química de un nucleótido 100 según los aspectos desvelados en el presente documento. El nucleótido 100 está compuesto por las siguientes tres moléculas subunidades: una base nitrogenada 102 (también conocida como nucleobase o base), un azúcar 104 de cinco carbonos (tal como ribosa o desoxirribosa) y al menos un grupo fosfato 106. Los

30

múltiples nucleótidos que están conectados entre sí se conocen como polinucleótidos. El primero y segundo polinucleótidos 108 y 110, que se observan mejor en la Figura 2, son ejemplos de tales polinucleótidos.

5

La base nitrogenada 102 del nucleótido 100 puede ser uno de los siguientes cinco tipos: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Cada tipo de base 102 se emparejará (es decir, se unirá químicamente) con solo otro tipo de base para formar un par de bases complementarias en dos cadenas dobles complementarias de polinucleótidos, tal como el polinucleótido 112 bicatenario complementario mostrado en la figura 2.

15 Complementario, como se usa en el presente documento, se refiere al emparejamiento de una primera base de un primer nucleótido con la segunda base específica de un segundo nucleótido que puede unirse químicamente a él. La segunda base (y su nucleótido asociado) se considera en el presente documento complementaria a la primera base (y su nucleótido asociado). Por ejemplo: la adenina-timina (A-T) y la guanina-citosina (G-C) son pares de bases complementarios que pueden conectar cadenas de polinucleótidos dobles complementarias de ácido desoxirribonucleico (ADN). Además, la adenina-uracilo 25 (A-U) y la guanina-citosina (G-C) son pares de bases complementarios que pueden conectar cadenas de polinucleótidos dobles complementarias de ácido ribonucleico (ARN).

Por referencia a la Figura 2, se representa un ejemplo 30 simplificado de un primer polinucleótido 108 y un segundo polinucleótido 110 complementario en crecimiento según los

aspectos descritos en el presente documento. El primer y segundo polinucleótidos 108, 110 están conectados entre sí para formar un polinucleótido 112 bicatenario.

5 El primer polinucleótido 108 está anclado químicamente 114 a un suelo 116 de un canal 224 de flujo de una celda 202 de flujo (se ve mejor en la Figura 7). El primer polinucleótido 108 incluye los nucleótidos 118-1 a 118-N, en el que N representa el número total de nucleótidos 118 en el primer
10 polinucleótido 108 y también es indicativo de la longitud del primer polinucleótido 108. El tipo específico de base nitrogenada asociada con cada nucleótido 118 se identifica con las letras A, G, C o T rodeadas por un círculo, que representan los tipos de bases adenina, guanina, citosina y timina
15 respectivamente. El primer polinucleótido 108 puede ser uno de los muchos grupos de primeros polinucleótidos 108 idénticos clonados anclados al suelo 116 del canal 224 de flujo.

El segundo polinucleótido 110 incluye al menos los
20 nucleótidos 120-1 a 120-6. De nuevo, el tipo específico de base nitrogenada asociada con cada nucleótido 120 se identifica con las letras A, G, C o T rodeadas por un círculo. Cada nucleótido 120 incluye un marcador químico (tal como un marcador fluorescente) que, cuando es excitado (por ejemplo, por una
25 luz de excitación), emitirá una señal de identificación (tal como una luz fluorescente) que identificará la base específica del nucleótido 120.

Las bases de los nucleótidos 120 solo pueden unirse a una
30 base complementaria de los nucleótidos 118 para formar una serie de pares 122-1 a 122-6 de bases complementarios. Los

pares 122 de bases y su nucleótido 118, 120 asociado forman el polinucleótido 112 bicatenario.

Un instrumento, tal como el instrumento 200, utilizado en la realización de métodos para determinar el orden de los nucleótidos 118-1 a 118-N en el primer polinucleótido 108, puede incluir un sistema 204 de gestión de reactivos en comunicación fluida con una celda 202 de flujo (que se ve mejor en la figura 7). El sistema de gestión de reactivos es capaz de almacenar, seleccionar y hacer fluir secuencialmente una pluralidad de reactivos a través del canal 224 de flujo de la celda 202 de flujo. El sistema de gestión de reactivos y/o la celda de flujo pueden, o no, estar situados en un cartucho 230 insertable de forma extraíble (que se ve mejor en la figura 7) del instrumento.

Como se explica con mayor detalle en el presente documento, tales métodos pueden incluir múltiples ciclos de una secuencia de reactivos 208-218 seleccionados (que se ve mejor en la Figura 7) que son dirigidos a través del canal 224 de flujo de la celda 202 de flujo para realizar diversas reacciones químicas controladas en el primer polinucleótido 108. Al menos un reactivo, conocido como reactivo de incorporación, que fluye sobre el primer polinucleótido 108, incluye los nucleótidos 120. Cada nucleótido 120 en el reactivo de incorporación incluye un marcador químico (tal como un marcador fluorescente) que, cuando es excitado (por ejemplo, por una luz de excitación), emitirá una señal de identificación (tal como una luz fluorescente) que identificará la base específica del nucleótido 120. Adicionalmente, la base de cada nucleótido 120 en el reactivo de incorporación incluye un

terminador separable, lo que evita que otras bases se adhieran a ella. Las reacciones químicas permiten que los nucleótidos formen los pares de bases, un par de bases a la vez, con la secuencia de bases del primer polinucleótido.

Sin embargo, si el intercambio de reactivo entre los flujos de reactivo no es suficiente, entonces puede ocurrir contaminación cruzada entre reactivos. Esto es, si un primer reactivo no se retira y se intercambia con un segundo flujo de reactivo consecutivo del método, entonces, el primer reactivo puede contaminar el segundo reactivo. Esto puede conducir a un fenómeno conocido como pre-fase, en la que se añaden de forma inadvertida múltiples bases marcadas a la segunda cadena de polinucleótidos complementaria en crecimiento con cada ciclo. La pre-fase deteriora la precisión del método para determinar la secuencia de nucleótidos. La pre-fase también es acumulativa, en la que puede repetirse con cada ciclo del método y reducir aún más la precisión con cada ciclo. La pre-fase también reducirá el número de bases (es decir, reducirá la longitud) que pueden acumularse en el segundo polinucleótido complementario, en el que el orden de esas bases puede determinarse dentro de un grado aceptable de precisión. El intercambio de reactivos puede ser particularmente desafiante en regiones de la celda de flujo que tienen canales no uniformes o regiones que tienen malas condiciones de flujo de fluido tales como esquinas.

Además de un aumento en la pre-fase, el intercambio inadecuado de reactivos también puede contribuir a otros fenómenos que pueden deteriorar la precisión de varios métodos

para determinar la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, el intercambio inadecuado de reactivos puede provocar un aumento en la fase, en el que no se añaden bases marcadas al segundo nucleótido complementario en crecimiento. Además, el
5 intercambio inadecuado de reactivos puede provocar una disminución en el porcentaje de grupos que pasan el filtro, que es una indicación de la pureza de la señal de cada grupo.

Asimismo, cuando un RMS se encuentra en un cartucho de un
10 instrumento, la capacidad de almacenamiento de reactivo de los pocillos de reactivo puede estar limitada por las limitaciones espaciales del cartucho, de modo que el intercambio de reactivos eficiente es más crítico.

15 En el ejemplo que se ilustra en la Figura 2, el método ha permitido que los nucleótidos 120-1 a 120-5 marcados se combinen secuencialmente con los nucleótidos 118-1 a 118-5 para formar los pares 122-1 a 122-5 de bases complementarios. El nucleótido 120-6 es el siguiente en la secuencia y está a punto
20 de combinarse (o emparejarse) con el nucleótido 118-6 para formar el par 122-6 de bases complementarias.

Una vez emparejados, el marcador químico del nucleótido 120-6 se excitará para emitir una señal de identificación que
25 identificará el par 122-6 de bases. Una vez identificado, el terminador unido a la base del nucleótido 120-6 se elimina de modo que pueda unirse una base posterior. El nucleótido 120-6 marcado se añade a la segunda cadena 110 de polinucleótido complementaria en crecimiento que es bicatenario con el primer
30 polinucleótido 108.

Por consiguiente, la segunda cadena 110 complementaria de polinucleótidos se puede construir, una base 120 cada vez, para determinar la secuencia de bases 118 en el grupo de los primeros polinucleótidos 108. Cuanto mayor sea el número de nucleótidos 120 en la segunda cadena 110 complementaria de polinucleótidos que se pueda construir (es decir, cuanto más larga sea la longitud del segundo polinucleótido), más datos se pueden proporcionar con respecto al orden de los nucleótidos en el grupo de los primeros polinucleótidos 108 y más rápido se vuelve el análisis general.

En referencia a la figura 3 se representa un ejemplo de un diagrama de flujo simplificado de un método 130 para determinar el orden de los nucleótidos en un polinucleótido según los aspectos descritos en el presente documento. El método 130 incluye cuatro fases básicas, que son: una fase 132 de incorporación, una fase 134 de imagen, una fase 136 de escisión y una fase 138 de lavado.

Durante la fase 132 de incorporación, se hace fluir un reactivo de incorporación a través de un sistema 204 de gestión de reactivos y una celda 202 de flujo de un instrumento 200 (que se e mejor en la Figura 7). La celda 202 de flujo tiene un primer polinucleótido 108 (que se ve mejor en la Figura 2) colocado en su interior. El reactivo de incorporación añade una primera base (asociada con el nucleótido 120-6) a una secuencia de bases (asociada con los nucleótidos 120-1 a 120-5). La secuencia de bases (y sus nucleótidos 120-1 a 120-6 asociados) incluyen un segundo polinucleótido 110 que es complementario al primer polinucleótido 108.

De manera más específica, el reactivo de incorporación fluye sobre los grupos de primeros polinucleótidos 108 clonados que están previamente anclados al canal 224 de flujo de la celda 202 de flujo. El reactivo de incorporación incluye

5 nucleótidos 120 conocidos, en el que las bases de esos nucleótidos 120 se emparejan secuencialmente con las bases de los primeros polinucleótidos 108 para formar segundos polinucleótidos 110 en crecimiento que son complementarios al primer polinucleótido 108. El primer y segundo polinucleótidos

10 108, 110 forman polinucleótidos 112 bicatenarios, tal como fragmentos de ADN. Los tipos de bases del primer y segundo polinucleótidos 108, 110 pueden ser cualquiera de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) o uracilo (U).

15 Los nucleótidos 120 en el reactivo de incorporación también incluyen un marcador (en este ejemplo, un marcador fluorescente) que permite la identificación del tipo de base con una señal de excitación (en este ejemplo, con una luz de excitación). Los nucleótidos 120 también incluyen un terminador

20 escindible (o grupo bloqueante) como se conoce en la técnica, lo que evita que más de una base de los segundos polinucleótidos 110 a la vez se emparejen con las bases de los primeros polinucleótidos 108.

25 Durante la fase 14 de imagen, se captura una imagen de una señal de identificación que emana de la primera base del nucleótido 120-6, después de que la primera base del nucleótido 120-6 se haya añadido al segundo polinucleótido 110.

30 De manera más específica, los marcadores fluorescentes de los nucleótidos 120 asociados con el segundo polinucleótido

110 se excitan con una luz de excitación para emitir una luz fluorescente característica. A continuación, se toma una imagen de la luz fluorescente para identificar el tipo de base del nucleótido 120-6 recién añadido en la secuencia de nucleótidos 120-1 a 120-6 que forman el segundo polinucleótido 110 en crecimiento. Dado que el segundo polinucleótido 110 es complementario del primer polinucleótido 108, se puede determinar el orden de los nucleótidos 118 en el primer polinucleótido. Cuanto más tiempo pueda crecer el segundo polinucleótido 110, se puede determinar el mayor número de nucleótidos 118 del orden en el primer polinucleótido 108.

Durante la fase 136 de escisión, se hace fluir un reactivo de escisión a través del sistema 204 de gestión de reactivos y la celda 202 de flujo para eliminar el terminador del nucleótido 120-6. Esto permite añadir un nucleótido posterior (no mostrado) en la secuencia de nucleótidos 120-1 a 120-6 al segundo polinucleótido 110.

Durante la fase 138 de lavado, se hace fluir un reactivo tampón (o reactivo de lavado) a través del sistema 204 de gestión de reactivos y la celda 202 de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones consecutivas de flujo hacia delante y hacia atrás para lavar el reactivo de escisión del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo. El reactivo tampón puede ser una mezcla de sustancias químicas utilizadas para eliminar sustancias químicas no deseadas de la celda de flujo y el sistema de gestión de reactivos. Los productos químicos no deseados pueden ser, por ejemplo, reactivos activos (tal como el exceso de reactivos de escisión) que quedan de la etapa anterior o varios contaminantes que han resultado como

subproductos de la etapa anterior. El reactivo tampón puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada con un ácido lipoico añadido.

5 Flujo hacia adelante, como se usa en el presente documento, se refiere a una dirección del flujo de reactivo desde los pocillos 232 de reactivo del sistema 204 de gestión de reactivo a la celda 202 de flujo (que se ve mejor en la Figura 7). Flujo hacia atrás, como se usa en el presente
10 documento, se refiere a una dirección de flujo de reactivo desde la celda 202 de flujo a los pocillos 232 de reactivo.

En el ejemplo de la figura 3, la pluralidad de ciclos se ilustra como 12 ciclos repetitivos de una dirección 140 de
15 flujo hacia adelante y una dirección 142 de flujo hacia atrás consecutiva del reactivo tampón. Sin embargo, el reactivo tampón puede ciclarse en una dirección 140 de flujo hacia adelante y luego en una dirección 142 de flujo hacia atrás consecutiva cualquier número de veces. Por ejemplo, la
20 pluralidad de ciclos puede ser de 2, 4, 6, 12 o más ciclos.

La pluralidad de ciclos de direcciones 140, 142 consecutivas de flujo hacia adelante y hacia atrás durante la fase 138 de lavado permite una eliminación más completa (es
25 decir, intercambio de reactivo) del reactivo de escisión introducido en el sistema durante la fase 136 de escisión que los métodos anteriores que utilizan el mismo volumen finito de reactivo tampón. Esto se debe a que, los métodos anteriores solo hacían fluir el reactivo en la dirección hacia delante
30 durante la fase de lavado. Como tal, en métodos anteriores, el mismo reactivo tampón solo pasaría a través del sistema de

gestión de reactivos y la celda de flujo una vez y es posible que no elimine suficientemente el reactivo de escisión durante la fase de lavado. En estas condiciones, durante la posterior fase de incorporación, el reactivo de incorporación posterior puede contaminarse con el reactivo de escisión restante. El reactivo de escisión restante puede, a continuación, eliminar prematuramente los terminadores de los nucleótidos durante la fase de incorporación posterior. Esto puede permitir una cantidad indeseable de pre-fases, en las que más de una base se une al segundo polinucleótido en crecimiento cada vez.

Si se permite que la pre-fase se acumule con cada nuevo ciclo, puede desarrollarse una incertidumbre significativa en el orden de las bases en los polinucleótidos. La incertidumbre puede aumentar en cada ciclo, lo que puede disminuir la precisión de los datos que se pueden obtener a medida que crece la cadena de polinucleótidos. Por consiguiente, la longitud total de la segunda cadena de polinucleótidos que puede crecer, tal que su orden de bases pueda determinarse con un grado razonable de precisión, puede estar limitada por la pre-fase.

En comparación, la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás de la presente divulgación permiten que el mismo reactivo tampón pase a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo varias veces para un lavado más completo. En un ejemplo, el empleo de una pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás como se describe en el presente documento puede proporcionar un uso más eficiente del volumen finito de reactivo tampón, particularmente cuando no es deseable aumentar el volumen del reactivo tampón debido a las restricciones de

espacio y/o costes, por ejemplo. Como resultado, puede ser necesario menos reactivo tampón para alcanzar un nivel dado de intercambio de reactivos.

5 Las direcciones 140, 142 de flujo hacia delante y hacia atrás consecutivas, como se usa en el presente documento, hacen referencia a las direcciones de flujo hacia delante y hacia atrás que se producen adyacentes entre sí sin etapas intermedias. Ninguna etapa intermedia hace referencia a ningún
10 periodo de incubación sustancial (o tiempo de retardo) de ausencia de flujo entre los flujos hacia delante y hacia atrás de reactivo.

Por consiguiente, el flujo en una dirección 140 de flujo
15 hacia delante y una dirección 142 de flujo hacia atrás debe estar separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 1 segundo o menos, aproximadamente 200 milisegundos o menos o aproximadamente 100 milisegundos o menos, para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia delante
20 y hacia atrás. Adicionalmente, cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás está separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 1 segundo o menos, aproximadamente 200 milisegundos o menos o aproximadamente 100 milisegundos o menos.

25

En un ejemplo, para evitar la contaminación de los pocillos de 232 reactivo en el sistema 204 de gestión de reactivos (que se ve mejor en la Figura 7), el volumen de reactivo tampón que fluye e la dirección 140 hacia adelante
30 debe ser mayor que el volumen de reactivo tampón que fluye en el dirección hacia atrás. En otras palabras, para evitar la

contaminación de los pocillos de reactivo durante la fase de lavado:

se hace fluir un primer volumen de flujo (1^{er} FFV) hacia
5 adelante del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia
adelante de cada ciclo de la pluralidad de ciclos; y

se hace fluir un segundo volumen de flujo hacia atrás (2^o
RFV) del reactivo tampón en la dirección de flujo hacia atrás
de cada ciclo de la pluralidad de ciclos, en el que el primer
10 volumen de flujo hacia delante es mayor que el segundo volumen
de flujo hacia atrás. De manera más específica, el primer
volumen de flujo (1^{er} FFV) hacia delante es mayor que el segundo
volumen de flujo (2^o RFV) hacia atrás en aproximadamente un
3 % o más.

15

Después de que hayan tenido lugar la pluralidad de
direcciones 140, 142 de flujo hacia adelante y hacia atrás, la
fase 138 de lavado pasa a un período 144 de incubación. El
período 144 de incubación es un período en el que prácticamente
20 no hay flujo de reactivo tampón a través del sistema 204 de
gestión de reactivos y la celda 202 de flujo. El período 144
de incubación puede tener una duración de aproximadamente 10
segundos o más después de que haya tenido lugar el último ciclo
de la pluralidad de ciclos 140, 142.

25

Después del período 144 de incubación, la fase 138 de
lavado procede a un tercer flujo 146 hacia delante. Esto es,
un tercer volumen de flujo (3^{er} FFV) hacia adelante del reactivo
tampón fluye en la dirección del flujo hacia adelante después
30 del período 144 de incubación. El período 144 de incubación y
el tercer flujo 146 hacia delante pueden ayudar a difundir el

reactivo de escisión fuera de las grietas que pueden desarrollarse en los bordes del sistema de gestión de reactivos o celda de flujo.

5 Una vez completada la fase 138 de lavado, el método retorna 148 después a la fase 132 de incorporación para comenzar el proceso de añadir el siguiente nucleótido 120 en la secuencia de nucleótidos al segundo polinucleótido 110.

10 En algunos métodos preexistentes, debido a que el reactivo tampón solo fluye en la dirección hacia adelante durante la fase de lavado, la cantidad total de reactivo tampón consumido (el consumo de fluido total) durante la fase de lavado es esencialmente igual a la cantidad total de volumen de reactivo
15 tampón que se barrió a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo (el volumen total de barrido) durante la fase de lavado. Por el contrario, en el método de la presente divulgación, el volumen de barrido total puede ser muchas veces mayor que el consumo de fluido total durante la
20 fase de lavado.

De manera más específica, el volumen de barrido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón (fase de lavado), está sustancialmente determinado por la fórmula ((1^{er}
25 FFV + 2^o RFV) * N) + 3^{er} FFV, en la que:

1^{er} FFV es el primer volumen de flujo hacia adelante,

El 2^o RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás,

N es el número total de ciclos en la pluralidad de ciclos,

30 y

El 3^{er} FFV es el tercer volumen de flujo hacia adelante.

Adicionalmente, el consumo de fluido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón (fase de lavado), está sustancialmente determinado por la fórmula:

$$((1^{\text{er}} \text{ FFV} - 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}.$$

5

La expresión "sustancialmente determinado" como se usa en una fórmula del tipo anterior se usa para describir y tener en cuenta las tolerancias de medición que pueden ocurrir al determinar parámetros tales como el 1^{er} FFV, el 2^o RFV y el 3^{er} FFV.

10

Dado que el mismo volumen de reactivo tampón puede pasar a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo varias veces, la relación entre el volumen de barrido total del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo tampón puede ser sustancialmente mayor que uno. De manera más específica, la relación entre el volumen de barrido total del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo tampón puede ser igual o superior a aproximadamente 6, aproximadamente 10, aproximadamente 12 o más.

15

20

En un sistema de instrumento basado en cartuchos, el sistema de gestión de reactivos y/o la celda de flujo puede estar colocado en un cartucho. El cartucho puede ser insertable de forma extraíble en el instrumento, lo que significa que el cartucho se puede insertar y extraer del instrumento.

25

Como tal, en un sistema de instrumento basado en cartuchos, la gran relación (2, 6, 10, 12 o superior) entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total puede ser particularmente ventajosa. Esto se debe a que el reactivo

30

de incorporación, el reactivo de escisión y el reactivo tampón pueden almacenarse en pocillos de reactivo en el sistema de gestión de reactivos y el sistema de gestión de reactivos puede ser parte del cartucho. Por consiguiente, los pocillos de reactivos del sistema de gestión de reactivos pueden configurarse para almacenar un volumen total finito de cada reactivo para que quepan en el cartucho. La gran relación entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total permite que el mismo volumen finito de reactivo sea barrido sobre el sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo varias veces antes de consumirse, mejorando así el intercambio de reactivos.

Por referencia a la Figura 4, se representa un ejemplo de diagrama de flujo de un método 150 para determinar el orden de los nucleótidos en un polinucleótido según los aspectos desvelados en el presente documento. El método 150 incluye una fase 152 de incorporación, una fase 154 de imagen, una fase 156 de escisión y una fase 158 de lavado.

20

Durante la fase 152 de incorporación, se hace fluir un reactivo 160 de incorporación a través de un sistema 204 de gestión de reactivos y una celda 202 de flujo de un instrumento 200 (que se ve mejor en la Figura 7). El reactivo de incorporación puede ser una mezcla de productos químicos que incorpore nucleótidos marcados con fluorescencia en cadenas de ADN.

La celda 202 de flujo tiene un primer polinucleótido 108 (que se ve mejor en la Figura 2) colocado en su interior. El reactivo de incorporación añade una primera base (asociada con

el nucleótido 120-6) a una secuencia de bases (asociada con los nucleótidos 120-1 a 120-5). La secuencia de bases (y sus nucleótidos 120-1 a 120-6 asociados) forma segundo polinucleótido 110 que es complementario al primer polinucleótido 108.

Los nucleótidos 120 en el reactivo de incorporación también incluyen un marcador (en este ejemplo, un marcador fluorescente) que permite la identificación del tipo de base con una señal de excitación (en este ejemplo, con una luz de excitación). Los nucleótidos 120 también incluyen un terminador escindible (o grupo bloqueante) como se conoce en la técnica, lo que evita que más de una base de los segundos polinucleótidos 110 a la vez se emparejen con las bases de los primeros polinucleótidos 108.

A continuación, durante la fase 152 de incorporación, se usa un reactivo 162 de lavado para eliminar cualquier exceso de reactivo 160 de incorporación. El reactivo de lavado puede ser una mezcla de productos químicos utilizados para eliminar los reactivos activos de una celda de flujo.

El método procede a la fase 154 de imagen, en el que se usa un reactivo 164 de barrido para proteger la superficie de la celda de flujo del fotodaño antes de tomar una imagen. El reactivo 164 de barrido puede ser una mezcla de productos químicos que estabilizan las cadenas de nucleótidos durante un proceso de detección.

A continuación, durante la fase 154 de imagen, se captura una imagen de una señal de identificación que emana de la

primera base del nucleótido 120-6, después de que la primera base del nucleótido 120-6 se haya añadido al segundo polinucleótido 110.

5 De manera más específica, los marcadores fluorescentes de los nucleótidos 120 asociados con el segundo polinucleótido 110 se excitan con una luz de excitación para emitir una luz fluorescente característica. A continuación, se toma una imagen de la luz fluorescente para proporcionar información de
10 identificación sobre el tipo de base del nucleótido 120-6 recién añadido en la secuencia de nucleótidos 120-1 a 120-6 que forman el segundo polinucleótido 110 en crecimiento.

A continuación, durante la fase 154 de imagen, se usa un
15 reactivo 168 de marcado adicional para unir un segundo marcador al nucleótido 120-6 recién añadido. El reactivo 168 de marcaje puede ser una mezcla de productos químicos usados para liberar un marcador fluorescente en el nucleótido.

20 A continuación, durante la fase 154 de imagen, se usa un reactivo 170 de lavado para eliminar cualquier exceso de reactivo 168 de marcaje. El reactivo 170 de lavado puede ser una mezcla de productos químicos utilizados para eliminar los reactivos activos de una celda de flujo.

25

A continuación, durante la fase 154 de imagen, se usa un segundo reactivo 172 de barrido para proteger la superficie de la celda de flujo del fotodaño antes de tomar una imagen. El segundo reactivo de barrido puede ser una mezcla de productos
30 químicos que estabilizan las cadenas de nucleótidos durante un proceso de detección.

A continuación, durante la fase 154 de imagen, se captura una segunda imagen de una señal de identificación que emana de la primera base del nucleótido 120-6. De manera más específica, los segundos marcadores fluorescentes de los nucleótidos 120 asociados con el segundo polinucleótido 110 se excitan con una luz de excitación para emitir una segunda luz fluorescente característica. A continuación, se toma una imagen de la segunda luz fluorescente para proporcionar información de identificación adicional sobre el tipo de base del nucleótido 120-6 recién añadido.

El método procede a la fase 156 de escisión, en la que se usa un reactivo 176 de lavado para eliminar cualquier exceso de segundo reactivo 172 de barrido. El reactivo de lavado puede ser una mezcla de productos químicos utilizados para eliminar los reactivos activos de una celda de flujo.

A continuación, durante la fase 156 de escisión, se hace fluir un reactivo 178 de escisión a través del sistema 204 de gestión de reactivos y la celda 202 de flujo para eliminar el terminador del nucleótido 120-6. Esto permite añadir un nucleótido posterior (no mostrado) en la secuencia de nucleótidos 120-1 a 120-6 al segundo polinucleótido 110.

El método procede a la fase 158 de escisión, en el que se hace fluir un primer reactivo tampón a través del sistema 204 de gestión de reactivos y la celda 202 de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones consecutivas de flujo hacia delante y hacia atrás para lavar el reactivo 178 de escisión del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo. El primer reactivo tampón puede ser, por ejemplo, una solución

salina tamponada con un ácido lipoico añadido.

De manera más específica, se hace fluir un primer volumen de flujo hacia adelante (1^{er} FFV) de 22 microlitros (µl) del primer reactivo tampón en la dirección 180 del flujo hacia adelante para comenzar cada ciclo de la pluralidad de ciclos. Un segundo volumen de flujo hacia adelante (2^o RFV) de 19 microlitros (µl) del primer reactivo tampón se hace fluir en la dirección 182 de flujo hacia atrás y a cada ciclo de la pluralidad de ciclos. En este ejemplo específico de la figura 4, hay un total de 12 ciclos de flujos hacia adelante y hacia atrás.

A continuación, durante la fase 158 de lavado, se impone al sistema un período 184 de incubación de sustancialmente nada de flujo del primer reactivo tampón a través del sistema 204 de gestión de reactivos y la celda 202 de flujo. El período 184 de incubación en este ejemplo específico tiene una duración de aproximadamente 30 segundos, aunque se pueden utilizar otros períodos de incubación.

Después del período 184 de incubación, la fase 158 de lavado procede a un tercer flujo 186 hacia adelante. Esto es, un tercer volumen de flujo hacia adelante (3^{er} FFV) de 12 microlitros (µl) del primer reactivo tampón se hace fluir en la dirección del flujo hacia adelante después del período 184 de incubación.

El primer reactivo tampón se utiliza en la fase 158 de lavado para eliminar sustancialmente el reactivo 178 de escisión del sistema. Sin embargo, los productos químicos

específicos en el primer reactivo tampón que son eficaces para eliminar el reactivo 178 de escisión, también pueden interferir con el reactivo de incorporación del siguiente ciclo. Un ejemplo de tal producto químico puede ser el ácido lipoico.

5

Por consiguiente, durante la fase 158 de lavado, se hace fluir un flujo hacia delante de un segundo reactivo 188 tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo para eliminar el primer reactivo tampón. El segundo
10 reactivo tampón puede ser una solución salina sin ácido lipoico. El segundo reactivo tampón no es importante en la eliminación del agente de escisión, pero no interferirá con el reactivo 160 de incorporación en el siguiente ciclo.

15 Una vez completada la fase 158 de lavado, el método retorna 190 después a la fase 152 de incorporación para comenzar el proceso de añadir el siguiente nucleótido 120 en la secuencia de nucleótidos al segundo polinucleótido 110.

20 Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, el volumen de barrido total del primer reactivo tampón, durante la fase de lavado, está sustancialmente determinado por la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$, en la que:

25

El 1^{er} FFV es el primer volumen de flujo hacia adelante y es igual a 22 µl,

el 2^o RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás y es igual a 19 µl,

30 N es el número total de ciclos en la pluralidad de ciclos y es igual a 12, y

el 3^{er} FFV es el tercer volumen de flujo hacia delante y es igual a 12 µl.

Por consiguiente, en el ejemplo de la FIG. 4, el volumen de barrido total es igual a $(22 + 19) * 12 + 12 = 504$ µl.

5

Adicionalmente, el consumo de fluido total del primer reactivo tampón, durante la fase de lavado, está sustancialmente determinado por la fórmula:

$$(1^{\text{er}} \text{ FFV} - 2^{\circ} \text{ RFV}) * N + 3^{\text{er}} \text{ FFV}.$$

10 Por consiguiente, en el ejemplo de la FIG. 4, el consumo de fluido total es igual a:

$$(22-19)*12+12=48 \text{ µl.}$$

Adicionalmente, en el ejemplo de la FIG. 4, la relación
15 entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total es igual a: $504/48=10,5$. A modo de comparación, la relación entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total de los sistemas anteriores es esencialmente 1. Esto se debe a que, los sistemas anteriores solo utilizan un flujo hacia
20 delante de reactivo tampón que es eficaz en la eliminación del reactivo de escisión.

Las figuras 5 y 6 muestran los resultados obtenidos a partir de un ejemplo de trabajo no limitante.

25

Por referencia a la Figura 5, se representa una tabla 190 que muestra un ejemplo de trabajo de varias relaciones entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total del primer reactivo tampón que se obtuvieron durante una fase
158 de lavado de ejemplo del método 150. En las filas 190-1 a
30 190-7, el consumo de fluido total se mantuvo constante en

48 µl. También en las filas 190-2 a 190-7, el primer volumen de flujo hacia adelante (1^{er} FFV), el segundo volumen de flujo hacia atrás (2^o RFV), el número de ciclos (N) y el tercer volumen de flujo hacia adelante (3^{er} FFV) se variaron para
5 aumentar el volumen de barrido total de 100 µl a 1.200 µl, mientras que el consumo de fluido total se mantuvo constante en 48 µl. Tal como se puede observar, la relación entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total varió de 2,08 (en la fila 190-2) a 25 (en 190-7).

10

La fila superior 190-1 representa un ejemplo comparativo de un método anterior, en el que no hubo ciclos de los flujos hacia atrás y hacia adelante del reactivo tampón. Más bien, la fila 190-1 tuvo solo un flujo hacia adelante durante la fase
15 de lavado y, por lo tanto, su volumen de barrido total fue igual a su consumo de fluido total.

Por referencia a la Figura 6, se representan los gráficos 192, 194 de las relaciones entre los volúmenes de barrido
20 totales y el consumo de fluido total frente a la pendiente pre-fase que se representaron a partir de los datos obtenidos en el ejemplo de trabajo de la figura 5 según los aspectos desvelados en el presente documento. El gráfico 194 se trazó a una temperatura ambiente (por ejemplo, a una temperatura
25 ambiente dentro de un intervalo de 25 a 35 grados centígrados). El gráfico 192 se trazó a la temperatura ambiente más 8 grados centígrados (por ejemplo, a una temperatura dentro de un intervalo de 33 a 43 grados centígrados).

30 La pendiente de pre-fase, como se indica en los gráficos 192 y 194, se expresa como el porcentaje (%) de moléculas en

grupos de polinucleótidos en una celda de flujo que van adelantando 1 par de bases por ciclo. La pendiente de la pre-fase es una medida de la tasa de pre-fase por ciclo.

5 Cuanto más bajos sean los valores de pre-fase, mejor es la calidad de los datos con una longitud de polinucleótido dada durante el procesamiento de los métodos del presente documento. Adicionalmente, cuanto más bajos sean los valores de pre-fase, más largos pueden ser los polinucleótidos.

10

 Como se puede observar a partir de los gráficos 192 y 194, un rango óptimo para la relación entre el volumen de barrido total y el consumo de fluido total, en el que se puede lograr el porcentaje de pendiente previo a la fase más bajo, es igual
15 o mayor que aproximadamente 6. Un intervalo óptimo alternativo, que se puede determinar a partir de los gráficos 192, 194 de los datos trazados del ejemplo de trabajo de la figura 5, también sería de aproximadamente 6 a aproximadamente 12.

20

 Los intervalos óptimos están asociados con pendientes bajas pre-fase. En la mayoría de los casos, en el ejemplo de trabajo de la figura 6, los intervalos óptimos están asociados con porcentajes de pendiente pre-fase que están por debajo del 2,0 %. Tales porcentajes de pendiente pre-fase bajos
25 proporcionaron resultados sorprendentes, obtenidos a partir del ejemplo de trabajo de las figuras 5 y 6, de permitir que un segundo polinucleótido 110 complementario se acumule en longitudes de bases más largas que las obtenidas previamente con una cantidad finita de reactivo, dentro de una precisión
30 aceptable. En el ejemplo de trabajo de las figuras 5 y 6, los sistemas de instrumentos basados en cartuchos fueron capaces

de construir con precisión los segundos polinucleótidos 110 complementarios hasta longitudes de 200 bases o más en un alto porcentaje de tiempo (por ejemplo, por encima del 90 % del tiempo). Por lo tanto, los pares de bases del primer y segundo 5 polinucleótidos 108, 110 también pudieron construirse con precisión hasta longitudes de 200 pares de bases o más ese mismo alto porcentaje de tiempo.

Por referencia a la Figura 7, se representa un ejemplo de 10 un diagrama esquemático de un instrumento 200 según los aspectos descritos en el presente documento. El instrumento, en este ejemplo particular, incluye un cartucho 230 acoplado en el mismo. El cartucho 230 incluye una celda 202 de flujo en comunicación fluida con un sistema 204 de gestión de reactivos 15 (RMS). En este ejemplo en particular, el RMS 204 está en comunicación fluida con la celda 202 de flujo a través de una conexión 206 intermedia. El cartucho 230 se puede insertar de forma extraíble en el instrumento 200, lo que significa que el cartucho se puede insertar y extraer del instrumento.

Aunque el ejemplo de esta figura 7 ilustra un instrumento 200 basado en cartucho que tiene un RMS 204 y una celda 202 de flujo contenida en un cartucho 230, otros instrumentos 200 pueden no incluir tal sistema basado en cartuchos. Más bien, 25 en algunos instrumentos 200, los componentes del RMS 204 pueden estar montados de manera integral y rígida dentro del instrumento 200, y solo la celda 202 de flujo puede separarse del instrumento 200. Es más, la celda 202 de flujo puede, o no, ser desmontable del cartucho 230.

El RMS incluye una pluralidad de pocillos 232 de

reactivos. Cada pocillo 232 de reactivo es operable para
contener un reactivo de una pluralidad de reactivos 208-218
colocados en el mismo. El RMS 204 es operable para seleccionar
un flujo de reactivo 234 de uno de la pluralidad de reactivos
5 208-218.

El RMS también es operable para dirigir el flujo de
reactivo 234 en la dirección hacia delante y la dirección hacia
atrás. El flujo hacia adelante, como se usa en el presente
10 documento, se refiere a la dirección del flujo 234 de reactivo
desde los pocillos 232 de reactivo hasta la celda 202 de flujo.
Flujo hacia atrás, como se usa en el presente documento, se
refiere a la dirección del flujo 234 de reactivo desde la celda
202 de flujo a los pocillos 232 de reactivo.

15 Los reactivos 208-218 pueden ser cualquiera de varios
tipos o combinaciones de reactivos dependiendo del tipo y
secuencia de las reacciones químicas que se van a realizar en
la celda de flujo. Por ejemplo, los reactivos 208-218 pueden
20 ser de los tipos siguientes:

Los reactivos 208 y 209 pueden ser formulaciones diferentes de
un reactivo de incorporación.

25 Los reactivos 210 y 211 pueden ser diferentes formulaciones de
un reactivo de barrido.

El reactivo 212 puede ser un reactivo de escisión.

30 Los reactivos 214 y 216 pueden ser diferentes formulaciones de
un reactivo tampón.

El reactivo 218 puede ser aire.

La conexión 206 incluye un primer canal 236 en comunicación fluida con el RMS 204 a través de un puerto 256 de salida del RMS. El primer canal 236 es operable para dirigir el flujo de reactivo 234 a través de un puerto 220 de entrada de la celda 202 de flujo y hacia el canal 224 de flujo de la celda 202 de flujo. La conexión 206 también incluye un segundo canal 238 en comunicación fluida con el canal 224 de flujo a través de un puerto 222 de salida de la celda 202 de flujo. El segundo canal 238 es operable para dirigir el flujo de reactivo 234 desde la celda 202 de flujo, a través de un puerto 258 de entrada del RMS y de regreso al RMS 204 después de que el flujo de reactivo 234 haya pasado a través del canal 224 de flujo.

La celda 202 de flujo del instrumento 200 incluye el canal 224 de flujo en comunicación fluida con el primer canal 236 a través del puerto 220 de entrada y en comunicación fluida con el segundo canal 238 a través del puerto 222 de salida. El canal 224 de flujo es operable para realizar diversas reacciones químicas entre los diversos flujos de reactivo 234 de la pluralidad de reactivos 208-218 y polinucleótidos, tales como los polinucleótidos 108 de la figura 2, colocados en el canal 224 de flujo.

Aunque el ejemplo de la figura 7 ilustra una celda 202 de flujo con un solo puerto 220 de entrada y un solo puerto 222 de salida, también se pueden utilizar otras configuraciones de celdas de flujo. Por ejemplo, la celda 202 de flujo puede incluir múltiples puertos 220 de entrada para recibir flujos de reactivo desde múltiples canales de la conexión 206. Además,

a modo de ejemplo, la celda de flujo puede incluir múltiples puertos 222 de salida para dirigir el flujo de reactivo a múltiples canales de la conexión 206.

5 Aunque el ejemplo de la figura 7 ilustra la celda 202 de flujo en comunicación fluida con el RMS 204 a través de una conexión 206 intermedia, la celda 202 de flujo puede
alternativamente conectarse directamente al RMS 204 sin una conexión 206 entre ellos. Esto es, el puerto 256 de salida del
10 RMS puede conectarse directamente al puerto 220 de entrada de la celda de flujo y el puerto 258 de entrada del RMS puede conectarse directamente al puerto 222 de salida de la celda de flujo.

15 El RMS 204, en este Ejemplo, incluye una válvula 242 rotativa para seleccionar los reactivos 208-218. La válvula 242 rotativa tiene un cuerpo 244 de válvula rotativa interna. El cuerpo 244 de la válvula incluye un puerto 246 central y un
puerto 248 que se puede rotar, que están conectados por un
20 canal 250 rotativo. El cuerpo 244 de la válvula pivota alrededor del puerto 246 central para mover el puerto 248 que se puede rotar.

La pluralidad de pocillos 232 de reactivos, que contienen
25 los reactivos 208-218, pueden estar dispuestos alrededor de la periferia de la válvula 242 rotativa o alejado de la válvula 242 rotativa de otro modo. Cada pocillo 232 de reactivo está en comunicación fluida con un canal 252 de pocillo correspondiente. Cada canal 252 de pocillo incluye un puerto
30 254 de canal de pocillo con el que el puerto 248 que puede rotar de la válvula 242 rotativa puede alinearse con el fin de

recibir el flujo de reactivo 234 desde cualquier pocillo 232 de reactivo dado.

Cuando el puerto 248 que puede rotar se alinea con uno de los puertos 254 de canal de pocillo, se establece una ruta de flujo para un flujo de reactivo 234 que permite que el flujo de reactivo 234 fluya desde el pocillo 232 seleccionado, a través del canal 252 de pocillo, a través de la válvula 242 rotativa, a través de una línea 255 común y por el puerto 256 de salida del RMS. El flujo de reactivo 234 luego continúa a través del primer canal 236, al puerto 220 de entrada de la celda 202 de flujo y a través del canal 224 de flujo, donde el reactivo seleccionado de la pluralidad de reactivos 208-218 puede reaccionar con los polinucleótidos 108.

15

Los reactivos y/o subproductos de la reacción que no han reaccionado pueden fluir fuera del puerto 222 de salida de la celda 202 de flujo y a través del segundo canal 238. El flujo 234 de reactivo puede volver a entrar en el RMS 204 a través del puerto 258 de entrada del RMS.

20

El puerto 258 de entrada al RMS del RMS 204 está en comunicación fluida con una primera válvula 260 de pinza. La primera válvula 260 de pinza está en comunicación fluida con una segunda válvula 262 de pinza. Las válvulas 260, 262 de pinza primera y segunda incluyen una parte central elástica que puede accionarse mecánica o neumáticamente para apretar o liberar el flujo de reactivo 234 a través de las válvulas 260, 262 de pinza. Adicionalmente, aunque las válvulas 260, 262 de pinza se ilustran en este ejemplo, se pueden utilizar otros tipos de válvulas para realizar la misma función. Por ejemplo,

25

30

las válvulas 260, 262 pueden ser válvulas rotativas.

Una bomba 264 integrada (como una bomba de jeringa, o similar) también está dispuesta en el RMS 204. Aunque la bomba
5 264 integrada puede ser de otros tipos de bombas, se denominará en el presente documento bomba 264 de jeringa. La bomba 264 de jeringa está conectada en forma de T entre la primera y la segunda válvulas 260, 262 de pinza. Ambas válvulas 260, 262 de pinza son abiertas y cerradas por el instrumento 200 para
10 acoplar o desacoplar la bomba 264 de jeringa de la celda 202 de flujo y/o un tanque 270 de residuos.

La bomba 264 de jeringa incluye un émbolo 266 alternativo dispuesto en un cilindro 268, que tiene un diámetro interior
15 del cilindro 270. El émbolo 266 se aloja dentro del orificio 270 del cilindro para formar un sello del orificio del cilindro del émbolo. El émbolo 266 es impulsado por el instrumento 200 para alternar dentro del orificio 270 del cilindro y para bombear los reactivos 208-218 en una dirección de flujo hacia
20 adelante desde los pocillos 232 de reactivos al tanque 272 de residuos.

Además de que el instrumento 200 es operable para bombear el flujo de reactivos 234 en una dirección hacia delante desde
25 los pocillos 232 de reactivos a la celda 202 de flujo y a la bomba 264, el instrumento 200 puede ser operable para bombear el flujo de reactivos 234 en la dirección hacia atrás. Esto es, los reactivos 208-218 pueden bombearse en una dirección de flujo hacia atrás desde la bomba 264 a la celda 202 de flujo y
30 sobre los pocillos 232 de reactivos. Por consiguiente, el instrumento es operable para, por ejemplo, los reactivos 214,

216 de tampón del flujo a través del RMS 204 y la celda 202 de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones consecutivas de flujo hacia adelante y hacia atrás de acuerdo con los métodos 130 de la figura 3 y 150 de la figura 4.

5

El instrumento 200 también incluye el módulo de 226 detección, que es operable para detectar fotones de luz u otras formas de propiedades detectables, cuando una reacción química provocada por los reactivos 208-218 induce a los
10 polinucleótidos 108 a afectar tales propiedades detectables.

Aunque la implementación ilustrada en la figura 7 es el de un instrumento 200 que utiliza una válvula 242 rotativa que dirige los diversos reactivos 208-218 a través de una línea
15 255 común y hacia la celda 202 de flujo, otros instrumentos 200 pueden no utilizar una válvula 242 rotativa. Por ejemplo, los canales 252 de pocillo de cada pocillo 232 de reactivo pueden extenderse directamente a uno de una pluralidad de puertos 256 de salida del RMS separados.

20

En ese caso, cada uno de los canales 252 de pocillo puede incluir una válvula (no mostrada) para controlar el flujo 234 de reactivo desde cada pocillo 232 de reactivo. Adicionalmente, el primer canal 236 puede ser una pluralidad de primeros
25 canales para recibir cada uno el flujo correspondiente de reactivo 234 desde un puerto 256 de salida correspondiente. Por otra parte, el puerto 220 de entrada de la celda 202 de flujo puede ser una pluralidad de puertos 220 de entrada para recibir los diversos flujos de reactivo 234 de cada uno de la
30 pluralidad de primeros canales 236.

Por referencia a la Figura 8, se representa un ejemplo de un diagrama de bloques esquemático del instrumento 200 de la figura 7. El instrumento 200 incluye una estación 274 de acoplamiento para recibir el cartucho 230. Varios conjuntos eléctricos y mecánicos dentro del instrumento 200 interactúan con el cartucho 230 para operar el cartucho durante una operación de análisis de microfluidos de las diversas reacciones químicas que se realizan en la celda 202 de flujo.

El instrumento 200 puede incluir, entre otras cosas, uno o más procesadores 276 que van a ejecutar instrucciones de programa almacenadas en una memoria 278 para realizar las operaciones de análisis de microfluidos. Los procesadores están en comunicación electrónica con un conjunto 280 de accionamiento de válvula rotativa, un conjunto 282 de accionamiento de bomba de jeringa, un conjunto 284 de accionamiento de válvula de pinza, el módulo 226 de detección y un conjunto 306 de regulación de temperatura.

Se proporciona una interfaz 286 de usuario para que los usuarios controlen y supervisen el funcionamiento del instrumento 200. Una interfaz 288 de comunicaciones puede transmitir datos y otra información entre el instrumento 200 y ordenadores remotos, redes y similares.

El conjunto 280 de accionamiento de válvula rotativa incluye un eje 290 de accionamiento, que está acoplado mecánicamente a un soporte 292 de interfaz de la válvula rotativa. El soporte 292 de interfaz de la válvula rotativa está acoplado mecánicamente de forma selectiva a la válvula 242 rotativa del cartucho 230. El conjunto 280 de accionamiento

de la válvula rotativa incluye un motor 294 de rotación y, en algunas implementaciones, un motor 296 de traslación. El motor 296 de traslación puede mover el eje 290 de accionamiento en una dirección de traslación entre un estado acoplado y un estado desacoplado con la válvula 242 rotativa. El motor 294 rotativo controla la rotación del cuerpo 244 de la válvula rotativa de la válvula 242 rotativa.

El conjunto 280 de accionamiento de válvula rotativa también incluye un codificador 298 de posición que supervisa la posición del eje 290 de accionamiento. El codificador 298 proporciona datos de posición al procesador 276.

El conjunto 282 de accionamiento de bomba de jeringa incluye un motor 300 de bomba de jeringa acoplado a un eje 302 extensible. El eje 302 es accionado por el motor 300 de la bomba de jeringa entre una posición extendida y una posición retraída para alternar el émbolo 366 dentro del orificio 270 del cilindro 268 en la bomba 264 de jeringa.

20

El conjunto 284 de accionamiento de la válvula de pinza incluye un conjunto de dos motores 304 de accionamiento de la válvula de pinza accionados neumáticamente. Los dos motores 304 de accionamiento de la válvula de pinza están acoplados mecánicamente a una correspondiente de la primera y segunda válvulas 260, 262 de pinza. Los motores 304 de accionamiento de la válvula de pinza pueden utilizar presión de aire para apretar o liberar una parte central elástica de la primera y/o segunda válvulas 260, 262 de pinza para abrir y cerrar neumáticamente la primera y/o la segunda válvulas 260, 262 de pinza. Como alternativa, los motores 304 de accionamiento de

la válvula de pinza pueden ser accionados eléctricamente.

El módulo 226 de detección puede contener todas las cámaras y/o sensores de detección adecuados y/o necesarios para
5 permitir la detección de fotones de luz emisiva u otras formas de propiedades detectables, en relación con los polinucleótidos
108 en la celda 202 de flujo. La circuitería del dispositivo (no mostrada) dentro del instrumento 200 puede entonces procesar y transmitir señales de datos derivadas de esas
10 emisiones detectadas. A continuación, las señales de datos pueden analizarse para revelar las propiedades de los polinucleótidos 108.

También puede incluirse en el instrumento 200 un conjunto
15 306 de regulación de temperatura (u otro dispositivo de control ambiental). El conjunto 306 de regulación de temperatura puede utilizarse para proporcionar control de temperatura de la celda 202 de flujo durante las diversas reacciones químicas. De manera más específica, el conjunto 306 de regulación de
20 temperatura puede proporcionar tanto calentamiento como enfriamiento de la celda 202 de flujo, permitiendo así el termociclado de la celda 202 de flujo. Un dispositivo de control ambiental puede controlar o regular otros parámetros además de la temperatura (por ejemplo, la presión).

25

Debería apreciarse que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y los conceptos adicionales que se analizan con superior detalle en el presente documento (siempre que dichos conceptos no sean mutuamente incoherentes) se
30 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

Aunque la divulgación anterior se ha descrito con referencia a ejemplos específicos, debe entenderse que pueden realizarse numerosos cambios dentro del espíritu y alcance de los conceptos inventivos descritos. Por consiguiente, se
10 pretende que la divulgación no se limite a los ejemplos descritos, pero que tiene el ámbito completo definido por el lenguaje de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método, que comprende:

hacer fluir un reactivo de incorporación, a través de un
5 sistema de gestión de reactivos y una celda de flujo de un
instrumento, teniendo la celda de flujo un primer
polinucleótido colocado en su interior, en el que el reactivo
de incorporación añade una primera base a una secuencia de
bases, comprendiendo la secuencia de bases un segundo
10 polinucleótido complementario al primer polinucleótido;

capturar una imagen, de una señal de identificación
procedente de la primera base, después de que la primera base
se haya añadido al segundo polinucleótido;

hacer fluir un reactivo de escisión, a través del sistema
15 de gestión de reactivos y la celda de flujo, para eliminar un
primer terminador desde la primera base con el fin de permitir
que una base posterior en la secuencia de bases se añada al
segundo polinucleótido; y

hacer fluir un reactivo tampón, a través del sistema de
20 gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de
ciclos de direcciones consecutivas de flujo hacia adelante y
hacia atrás.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad
25 de ciclos comprende 4 o más ciclos.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad
de ciclos comprende 12 o más ciclos.

30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en
el que el sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo

se colocan en un cartucho del instrumento, siendo el cartucho insertable de forma extraíble en el instrumento.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el reactivo de incorporación, el reactivo de escisión y el reactivo tampón se almacenan en pocillos de reactivo del sistema de gestión de reactivos, los pocillos de reactivo operables para almacenar un volumen total finito de cada reactivo.

10

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el flujo del reactivo tampón comprende:

hacer fluir un primer volumen de flujo hacia adelante del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia adelante de cada ciclo de la pluralidad de ciclos; y

15

hacer fluir un segundo volumen de flujo hacia atrás del reactivo tampón en la dirección de flujo hacia atrás de cada ciclo de la pluralidad de ciclos, siendo el primer volumen de flujo hacia adelante mayor que el segundo volumen de flujo hacia atrás.

20

7. El método de la reivindicación 6, en el que el volumen de flujo hacia adelante es mayor que el volumen de flujo hacia atrás en aproximadamente un 3 % o más.

25

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el flujo del reactivo tampón comprende:

un período de incubación sustancialmente sin flujo de reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo durante aproximadamente 10 segundos o más después del último ciclo de la pluralidad de ciclos; y

30

hacer fluir un tercer volumen de flujo hacia delante del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia delante después del período de incubación.

5 9. El método de la reivindicación 8, en el que el volumen de barrido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón, está sustancialmente determinado por la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$, en la que:

1^{er} FFV es el primer volumen de flujo hacia delante,

10 El 2^o RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás,

N es el número total de ciclos en la pluralidad de ciclos,

y

El 3^{er} FFV es el tercer volumen de flujo hacia delante.

15 10. El método de la reivindicación 9, en el que el consumo de fluido total del reactivo tampón, durante el flujo del reactivo tampón, está sustancialmente determinado por la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$.

20 11. El método de la reivindicación 10, en el que la relación entre el volumen de barrido total del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo tampón es igual o superior a aproximadamente 6.

25 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el flujo en la dirección del flujo hacia adelante y el flujo en la dirección del flujo hacia atrás están separados por un tiempo de retardo de aproximadamente 1 segundo o menos para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de
30 flujo hacia adelante y hacia atrás.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el flujo en la dirección del flujo hacia adelante y el flujo en la dirección del flujo hacia atrás está separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 200 milisegundos o
5 menos para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de flujo hacia adelante y hacia atrás.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que cada ciclo de la pluralidad de ciclos de direcciones de
10 flujo hacia adelante y hacia atrás está separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 200 milisegundos o menos.

15. Un instrumento que comprende:

un sistema de gestión de reactivos, colocado en el
15 instrumento, comprendiendo el sistema de gestión de reactivos una pluralidad de pocillos de reactivos, teniendo los pocillos de reactivo al menos un primer, un segundo y un tercer reactivo bien operables para contener un reactivo de incorporación, un reactivo de escisión y un reactivo tampón colocados
20 respectivamente en el mismo, el sistema de gestión de reactivos para seleccionar un flujo de reactivo de uno de la pluralidad de pocillos de reactivo; y

una celda de flujo, colocado en el instrumento, comprendiendo la celda de flujo un canal de flujo en
25 comunicación fluida con el sistema de gestión de reactivos, el canal de flujo para dirigir el flujo de reactivo sobre un primer polinucleótido posicionado en el canal de flujo;

en el que el instrumento es operable para:

hacer fluir el reactivo de incorporación, a través
30 del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo, para añadir una primera base a una secuencia de bases, comprendiendo

la secuencia de bases un segundo polinucleótido complementario al primer polinucleótido;

capturar una imagen, de una señal de identificación procedente de la primera base, después de que la primera base se haya añadido al segundo polinucleótido;

hacer fluir el reactivo de escisión, a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo, para eliminar un primer terminador desde la primera base con el fin de permitir que una base posterior en la secuencia de bases se añada al segundo polinucleótido; y

hacer fluir el reactivo tampón, a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones consecutivas de flujo hacia adelante y hacia atrás.

15

16. El instrumento de la reivindicación 15, en el que, el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de 4 o más ciclos de direcciones de flujo consecutivas hacia adelante y hacia atrás.

17. El instrumento de la reivindicación 15, en el que, el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo en una pluralidad de 12 o más ciclos de direcciones de flujo consecutivas hacia adelante y hacia atrás.

18. El instrumento de cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón de manera que el flujo en una dirección de flujo hacia adelante y el flujo en una dirección de flujo hacia

atrás esté separado por un tiempo de retardo de aproximadamente 200 milisegundos o menos para cada ciclo de la pluralidad de ciclos de las direcciones de flujo hacia delante y hacia atrás.

5 19. El instrumento de cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que el sistema de gestión de reactivos se puede insertar de forma extraíble en el instrumento.

20. El instrumento de cualquiera de las reivindicaciones 15-10 19, en el que la celda de flujo se puede insertar de forma extraíble en el instrumento.

21. El instrumento de las reivindicaciones 15-20, que comprende:

15 un cartucho para contener el sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo;

en el que el reactivo de incorporación, el reactivo de escisión y el reactivo tampón se almacenan en pocillos de reactivo del sistema de gestión de reactivos, en el que los 20 pocillos de reactivo almacenan un volumen total finito de cada reactivo.

22. El instrumento de la reivindicación 21, en el que el cartucho se puede insertar de forma extraíble en el 25 instrumento.

23. El instrumento de cualquiera de las reivindicaciones 15-22, en el que el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón de manera que:

30 se hace fluir un primer volumen del reactivo tampón en la dirección del flujo hacia delante de cada ciclo de la

pluralidad de ciclos;

se hace fluir un segundo volumen del reactivo tampón en la dirección de flujo hacia atrás de cada ciclo de la pluralidad de ciclos, siendo el primer volumen mayor que el segundo
5 volumen.

24. El instrumento de la reivindicación 23, en el que el volumen de flujo hacia delante es mayor que el volumen de flujo hacia atrás en aproximadamente un 3 % o más.

10

25. El instrumento de cualquiera de las reivindicaciones 23 o 24, en el que el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón de manera que:

se impone un período de incubación de sustancialmente
15 ningún flujo del reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo durante aproximadamente 10 segundos o más después del último ciclo de la pluralidad de ciclos; y

se hace fluir un tercer volumen de flujo hacia adelante
20 del reactivo tampón fluye en la dirección del flujo hacia adelante después del período de incubación.

26. El instrumento de la reivindicación 25, en el que, el instrumento es operable para hacer fluir el reactivo tampón de
25 manera que:

un volumen de barrido total del reactivo tampón se determina sustancialmente mediante la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} + 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$, en el que:

$1^{\text{er}} \text{ FFV}$ es el primer volumen de flujo hacia delante,
30 El 2° RFV es el segundo volumen de flujo hacia atrás,
N es el número total de ciclos en la pluralidad de

ciclos, y

el 3^{er} FFV es el tercer volumen de flujo hacia adelante;

un consumo de fluido total del reactivo tampón se
5 determina sustancialmente mediante la fórmula $((1^{\text{er}} \text{ FFV} - 2^{\circ} \text{ RFV}) * N) + 3^{\text{er}} \text{ FFV}$; y

en el que la relación entre el volumen de barrido total del reactivo tampón y el consumo de fluido total del reactivo tampón es igual o superior a aproximadamente 6.

INTERCAMBIO DE REACTIVO EN UN INSTRUMENTO

5 Un método incluye hacer fluir un reactivo de incorporación a través de un sistema de gestión de reactivos y una celda de flujo de un instrumento. La celda de flujo tiene un primer polinucleótido colocado en su interior. El reactivo de incorporación añade una primera base a una secuencia de bases.

10 La secuencia de bases incluye un segundo polinucleótido complementario al primer polinucleótido. Se captura una imagen de una señal de identificación que emana de la primera base después de que la primera base se haya añadido al segundo polinucleótido. Se hace fluir un reactivo de escisión a través

15 del sistema de gestión de reactivos y la celda de flujo para eliminar un primer terminador de la primera base con el fin de permitir que una base posterior en la secuencia de bases se añada al segundo polinucleótido. Se hace fluir un reactivo tampón a través del sistema de gestión de reactivos y la celda

20 de flujo en una pluralidad de ciclos de direcciones de flujo consecutivas hacia adelante y hacia atrás.

FIG. 1

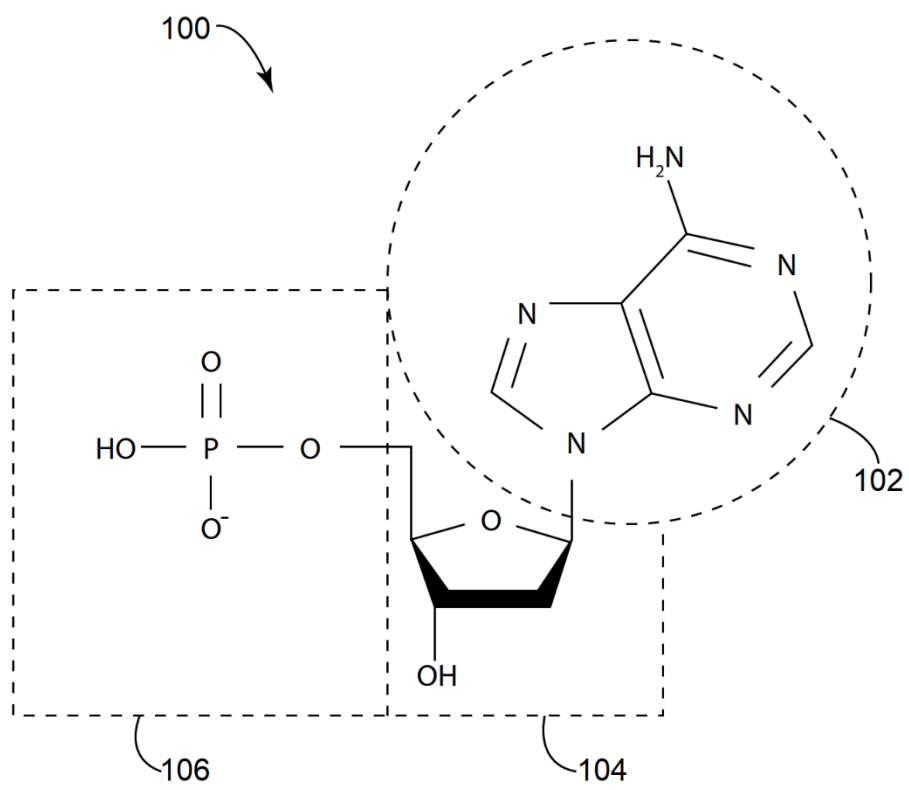


FIG. 2

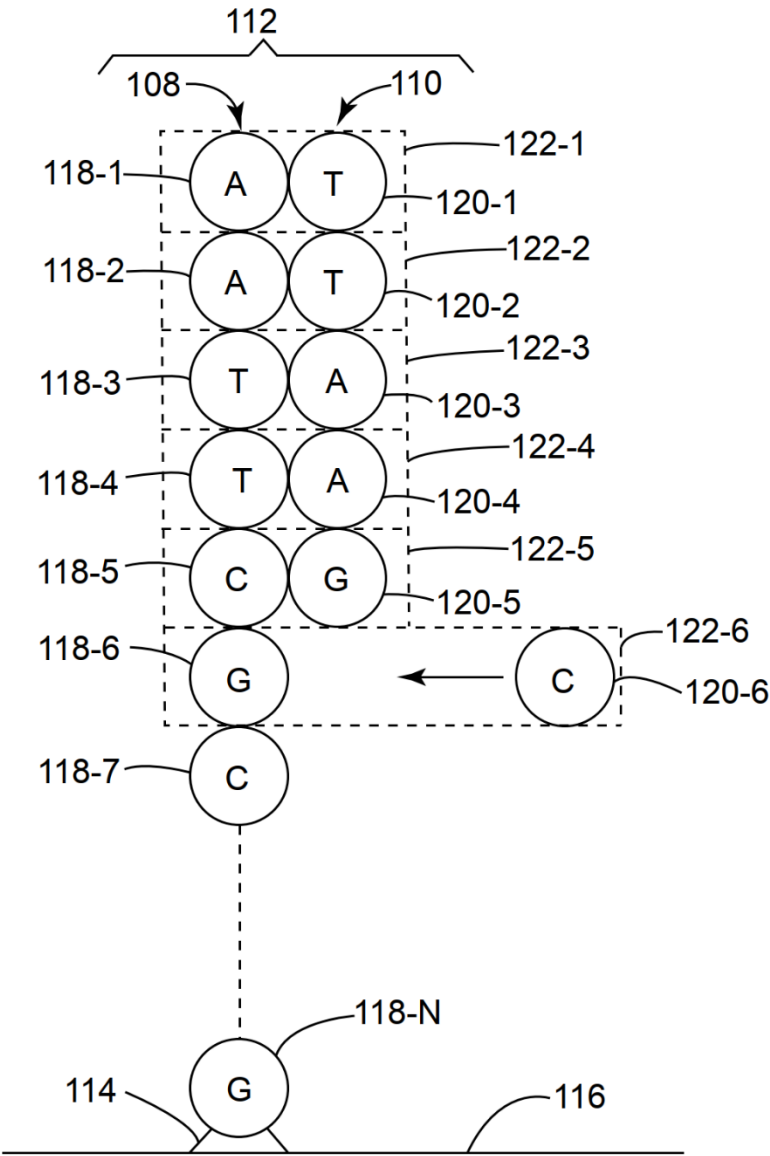


FIG. 3

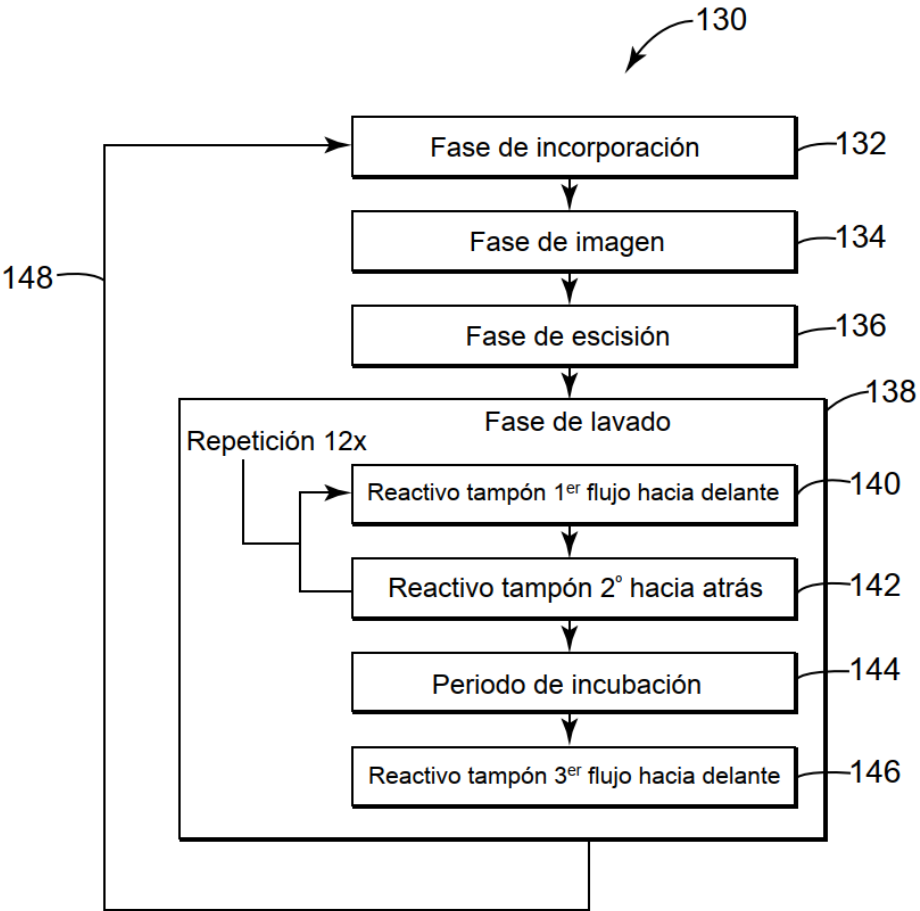


FIG. 4

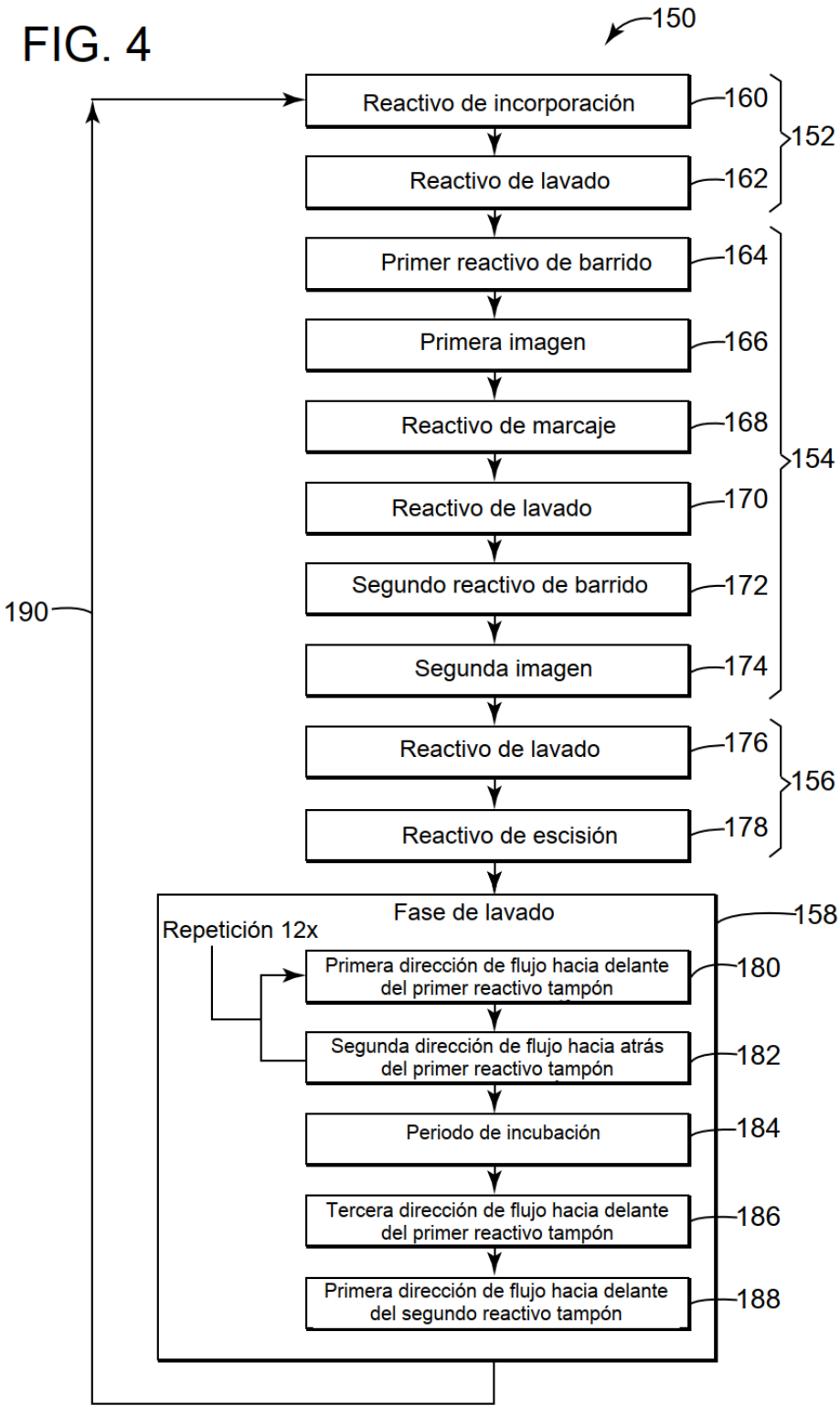


FIG. 5

Consumo de fluido total retenido a 48 (μl)

190 

Volumen de barrido total (μl) Consumo de fluido total (μl)	Volumen de barrido total (μl)	Primer volumen de flujo hacia delante (μl)	Segundo volumen de flujo hacia atrás (μl)	n.º de ciclos	Tercer volumen de flujo hacia delante (μl)
48/48 = 1	48	0	0	0	48 — 190-1
100/48 = 2,08	100	25	13	2	24 — 190-2
200/48 = 4,16	200	25	19	4	24 — 190-3
300/48 = 6,25	300	25	21	6	24 — 190-4
444/48 = 9,25	444	25	22	9	21 — 190-5
600/48 = 12,5	600	25	23	12	24 — 190-6
1200/48 = 25	1200	25	24	24	24 — 190-7

FIG. 6

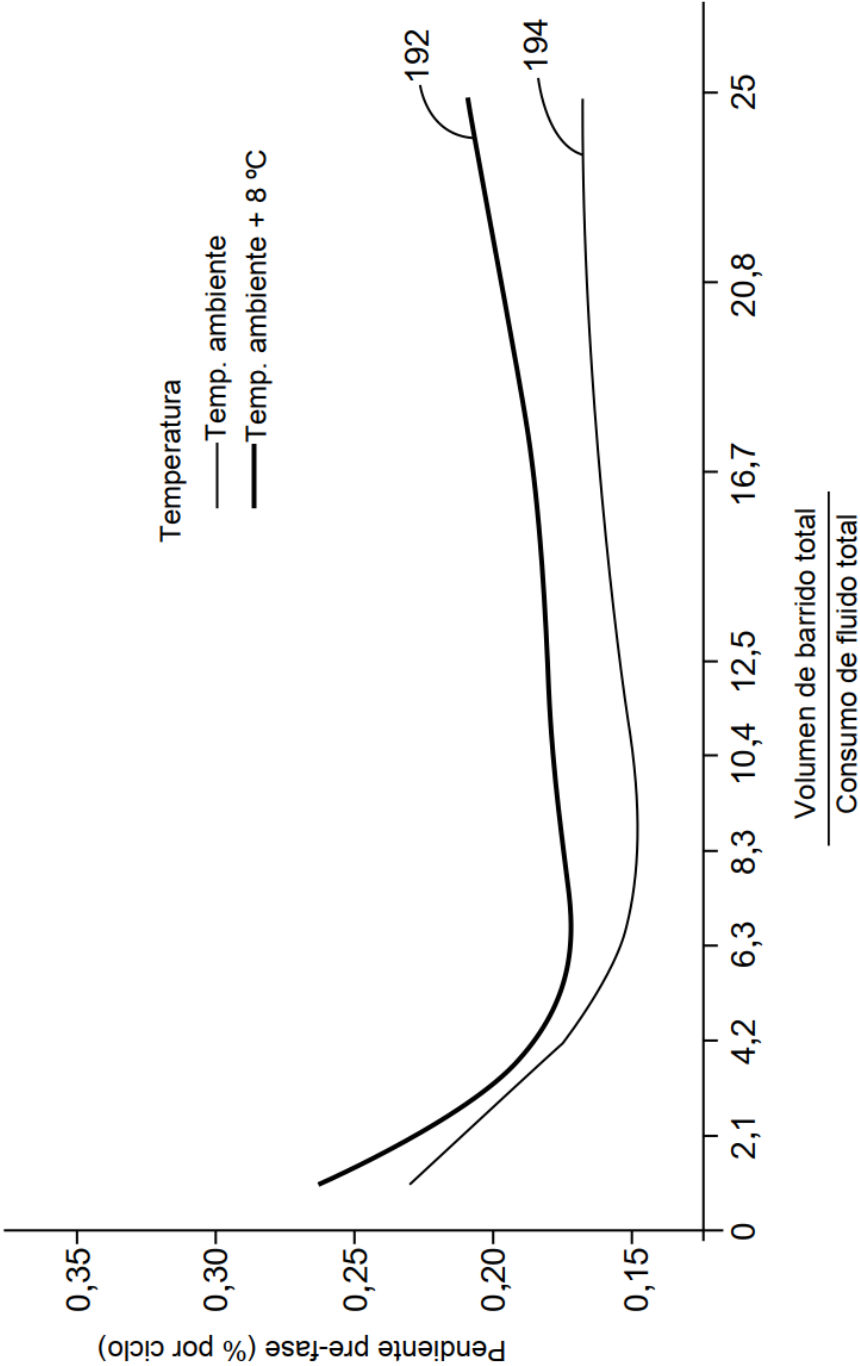


FIG. 7

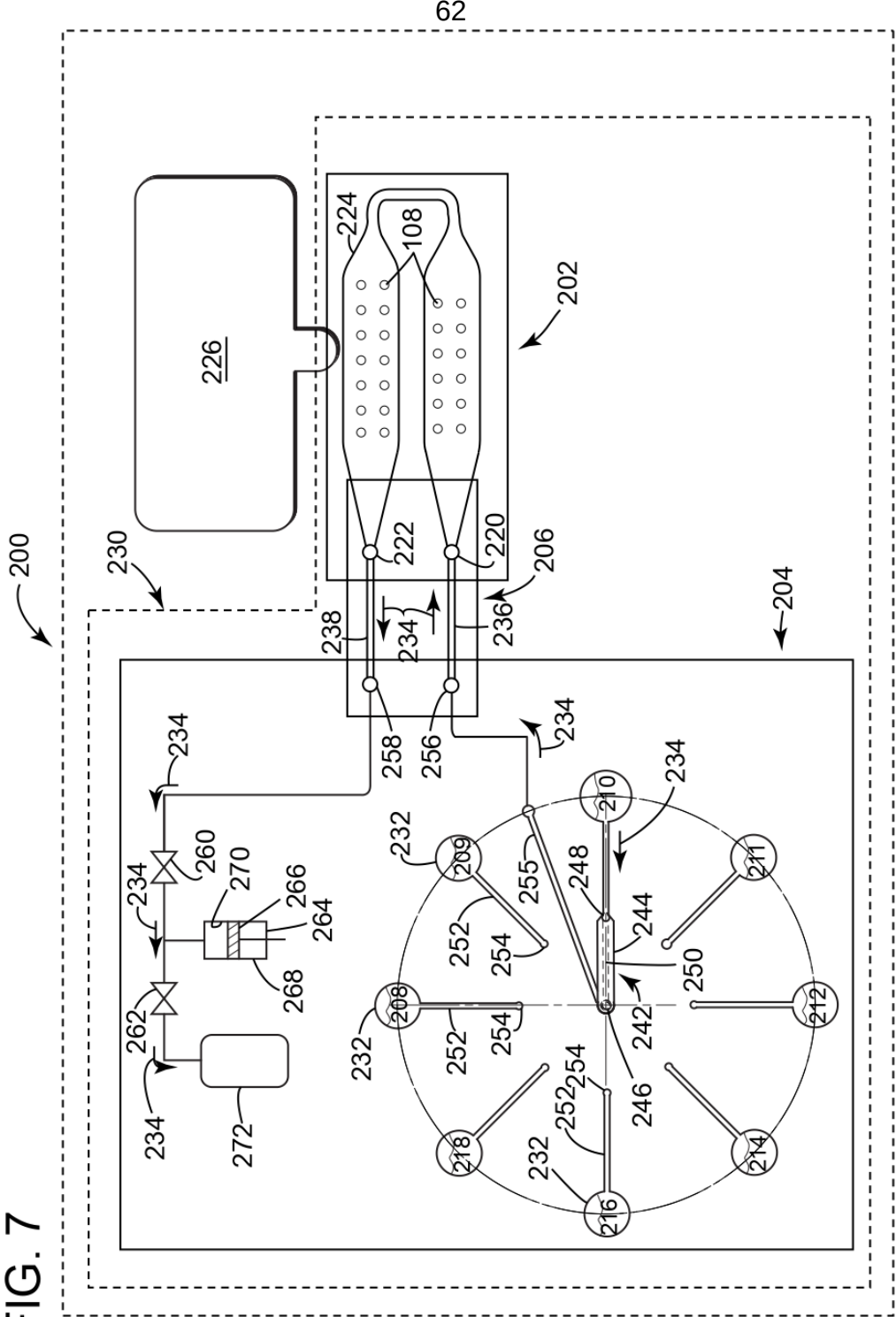


FIG. 8

