

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 498**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/77** (2006.01)

**G01N 21/84** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/6869** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008 E 19159834 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 3561494**

54 Título: **Método para identificar una secuencia de nucleótidos en una especie desconocida de ácido nucleico; y dispositivo para llevar a cabo el método**

30 Prioridad:

**06.12.2007 US 537207 P**

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

**01.07.2022**

73 Titular/es:

**GENALYTE, INC. (100.0%)  
5627 Oberlin Drive, 120  
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**GUNN, LAWRENCE CARY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 916 498 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para identificar una secuencia de nucleótidos en una especie desconocida de ácido nucleico; y dispositivo para llevar a cabo el método

5 Este documento reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos Ser. N.º 61/005.372 titulada "Method and Apparatus for Clocked Synthesis of Genetic Matter" y presentada el 6 de Diciembre de 2007.

10 **Antecedentes**

Este documento se refiere a detección sin marcador de materiales químicos y biológicos y aplicaciones de dicha detección sin marcador.

15 Diversas técnicas de secuenciación usan un marcador que se une a una molécula y la molécula marcada se monitorea y se interroga para identificar qué base se ha añadido o eliminado de una cadena de ácido nucleico (AN). Dicha marcación puede lograrse por diversas técnicas de marcación, entre las que se incluyen la marcación molecular basada en la radiactividad, la fluorescencia y la quimioluminiscencia. Sin embargo, un marcador puede provocar efectos no deseados, tales como la alteración de las cinéticas de unión molecular, que interfieren con la  
20 precisión de la reacción, y que limitan la longitud de una lectura contigua, y pueden requerir múltiples lecturas para construir una secuencia de alta confianza. Además, la marcación molecular puede requerir numerosas etapas de procesamiento tales como la unión del marcador, el lavado, la retirada del marcador, la exploración, etc. y, por tanto, podrían complicar el procedimiento, podrían requerir tiempo prolongado para el procesamiento y añadir un coste significativo.

25 El documento US 2002012930 A1 divulga los métodos y los aparatos para la secuenciación de un ácido nucleico. Estos métodos divulgados permiten una gran cantidad de reacciones de secuenciación independientes que se disponen en paralelo, lo que permite secuenciación simultánea de una cantidad muy grande (>10.000) de diferentes oligonucleótidos.

30 **Sumario**

La invención está definida por las reivindicaciones independientes, a las que, a continuación, se hace referencia. Las características preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes. Las técnicas, el aparato y el sistema se describen para proporcionar sensores sin marcador usados para monitorear los procedimientos enzimáticos. Dichos  
35 sensores sin marcador pueden usarse para detectar la secuenciación del ácido nucleico, por ejemplo.

En un aspecto, un procedimiento enzimático sin marcador que monitorea el sistema incluye una matriz de sensores ópticos sin marcador para detectar una señal óptica en respuesta a la modificación de una o más estructuras genéticas diana mediante la adición de una base por síntesis. Cada sensor óptico sin marcador se somete a funcionalización con una respectiva estructura genética diana. El sistema incluye un módulo de control de flujo de fluidos que incluye unidades receptoras de fluidos para proporcionar trayectorias para que diferentes fluidos fluyan dentro del módulo de control de flujo de fluidos. El módulo de control de flujo de fluidos incluye al menos un interruptor conectado a las unidades receptoras de fluidos para cambiar selectivamente entre las unidades receptoras de fluidos para recibir una secuencia exclusiva de los fluidos a través de las unidades receptoras de fluidos. La secuencia exclusiva de los fluidos incluye al menos una base nucleotídica o deoxirribonucleósido 5'-trifosfato (dNTP). Un canal de fluidos está conectado entre el módulo de control de flujo de fluidos y la matriz de sensores sin marcador para permitir que la secuencia exclusiva de los fluidos fluya desde el módulo de control de flujo de fluidos hasta la matriz de sensores ópticos sin marcador.

50 Las implementaciones pueden incluir opcionalmente una o más de las características siguientes. La matriz de sensores ópticos sin marcador puede incluir un sensor óptico de campo evanescente para retener la respectiva estructura genética diana dentro del campo evanescente. El sensor óptico de campo evanescente sin marcador puede incluir una cavidad resonante. La cavidad resonante puede incluir una cavidad resonante de anillo. La matriz de sensores ópticos sin marcador puede medir un cambio en una frecuencia resonante de la cavidad resonante. La matriz de sensores ópticos sin marcador puede medir un cambio en un índice refractivo complejo de la cavidad resonante. El módulo de control de flujo de fluidos puede proporcionar una especie única de dNTP o nucleótido a la matriz de sensores ópticos sin marcador. El módulo de control de flujo de fluidos puede proporcionar un reactivo para modificar la estructura genética diana a la matriz de sensores. La matriz de sensores ópticos sin marcador  
60 puede detectar la señal óptica mientras se añade la base nucleotídica.

En otro aspecto, la secuenciación de ácidos nucleicos incluye someter a funcionalización una superficie de un sensor óptico sin marcador con especie desconocida de ácido nucleico. Un reactivo que comprende los materiales de síntesis y una base nucleotídica conocida se introducen a la especie desconocida de ácido nucleico. Se mide un cambio en una señal de salida del sensor óptico sin marcador para detectar la síntesis del ácido nucleico cuando una base nucleotídica en la especie desconocida de ácido nucleico reacciona con el conocido dNTP o base

nucleotídica. Se identifica la siguiente base nucleotídica en el ácido nucleico desconocido que reacciona en función del conocido dNTP o base nucleotídica introducido y el cambio medido en la señal de salida.

5 Las implementaciones pueden incluir una o más de las siguientes características. Se puede medir una magnitud de la señal de salida para determinar un número de la base nucleotídica conocida introducida incorporada durante la síntesis detectada. El sensor óptico sin marcador que incluye un resonador óptico puede usarse para monitorear el procedimiento de síntesis que ocurre dentro del campo óptico del resonador. La especie desconocida de ácido nucleico puede amplificarse usando un cebador selectivamente unido y secuencias de hibridación. La amplificación en fase sólida y la hibridación de la especie desconocida de ácido nucleico pueden realizarse en paralelo. Puede medirse una cantidad de especies desconocidas de ácido nucleico en función de la señal de salida del sensor óptico antes y después de la funcionalización. Puede aplicarse una secuencia conocida de bases nucleotídicas y los materiales unidos involuntariamente o no selectivamente pueden retirarse aplicando un agente de lavado entre las bases nucleotídicas. La superficie del sensor óptico puede someterse a funcionalización con una especie única de ácido nucleico en función de la señal de salida del sensor óptico. La medición de un cambio en una señal de salida del sensor óptico sin marcador puede incluir: la medición de una señal de salida del sensor óptico sin marcador antes de introducir la base nucleotídica conocida; la medición de otra señal de salida del sensor óptico sin marcador después de introducir la base nucleotídica conocida; y la identificación de una diferencia entre las señales de salida medidas. La especie desconocida de ácido nucleico puede retenerse dentro del campo evanescente.

20 En otro aspecto más, la monitorización de un procedimiento enzimático dentro de un campo óptico de un resonador óptico sin marcador incluye detectar una señal óptica del resonador óptico sin marcador en respuesta a una aplicación de una o más enzimas para identificar un procedimiento enzimático que da como resultado una modificación del ácido nucleico. El procedimiento enzimático puede incluir una de las siguientes reacciones: extensión de base conducida por polimerasa; escisión de base conducida por la actividad de reparación de la polimerasa; extensión de ADN conducida por transcriptasa inversa; actividad de la ARN exonucleasa conducida por transcriptasa inversa; escisión de ADN conducida por la actividad de la endonucleasa específica a sitio; apareamiento conducido por la actividad de la enzima ligasa y/o la acción de la topoisomerasa y/o las enzimas de recombinación; fosforilación conducida por cinasa; desfosforilación conducida por fosfatasa; corte y empalme de ARN conducido por enzimas de corte y empalme y/o fragmentos de corte y empalme de ARN catalíticos; y escisión por ARNm conducida por el complejo DICER.

35 En otro aspecto más, un procedimiento enzimático sin marcador que monitorea el sistema puede incluir una matriz de sensores ópticos sin marcador para detectar una señal óptica en respuesta a la modificación de una o más estructuras genéticas diana. Cada sensor óptico sin marcador retiene una respectiva estructura genética diana dentro de un campo evanescente. El sistema incluye un módulo de control de flujo de fluidos para recibir uno o más fluidos que comprenden un reactivo para modificar una o más estructuras genéticas diana. Un canal de fluidos está conectado entre el módulo de control de flujo de fluidos y la matriz de sensores sin marcador para permitir que uno o más fluidos fluyan desde el módulo de control de flujo de fluidos hasta la matriz de sensores ópticos sin marcador.

40 Las técnicas, el aparato y el sistema como se describen en esta memoria descriptiva pueden proporcionar potencialmente una o más de las siguientes ventajas. Por ejemplo, se puede medir la cantidad de material diana en un sensor para permitir una calibración precisa de la cantidad en el sensor. Asimismo, el sistema puede evaluar cuándo se ha alcanzado la finalización de la adición de una base. Para acelerar la velocidad de reacción de síntesis, se puede realizar una monitorización en tiempo real de la reacción. Además, la incorporación en tiempo real de las bases en una reacción de extensión de secuencia puede realizarse en función del pequeño tamaño del sensor y la alta sensibilidad.

### Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 ilustra una sección transversal de un sensor óptico de campo evanescente ilustrativo adecuado para las aplicaciones de secuenciación.

La Figura 2 ilustra una sección transversal en perspectiva de otro ejemplo de un sensor óptico que tiene una cavidad resonante de anillo y una guía de ondas de acoplamiento, formado sobre un sustrato de silicio.

55 La Figura 3a ilustra una vista cenital de otro ejemplo de un sensor óptico que incluye una cavidad resonante de anillo y dos guías de ondas de acoplamiento en acoplamiento evanescente con la cavidad resonante de anillo.

La Figura 3b-3d ilustra ejemplos de cavidades resonantes de anillo no en forma circular.

60 La Figura 4a ilustra un esquema de un ejemplo de un sistema de síntesis con un módulo de control de flujo de fluidos y una matriz de sensores basada en sensores sin marcador.

La Figura 4b ilustra otro ejemplo de un sistema de síntesis.

65 La Figura 5a-d ilustra varias opciones de secuencia de las diferentes soluciones que pueden aplicarse sobre los

sensores.

La Figura 6 muestra un ejemplo de un procedimiento para sintetizar un ácido nucleico.

- 5 La Figura 7 muestra un ejemplo de procedimiento para monitorear un procedimiento enzimático dentro de un campo óptico de un resonador óptico sin marcador.

Estas opciones de fluidos y secuencias son con fines ilustrativos, y pueden combinarse de modo que se empleen uno o más de estos planteamientos en una diversidad de diferentes órdenes y combinaciones.

10

### Descripción detallada

Las técnicas sin marcador pueden proporcionar detección molecular y detección sin usar un marcador molecular. Dichas técnicas sin marcador pueden usarse para mitigar determinados efectos no deseados en la marcación molecular. Por ejemplo, pueden eliminarse etapas del procedimiento relacionadas con el marcador que requieren tiempo y que potencialmente causan efectos secundarios. En particular, las técnicas sin marcador pueden usarse para llevar a cabo una reacción de síntesis a una velocidad sustancialmente mayor a la de una reacción de síntesis basada en el marcaje molecular. Así, el tiempo de procesamiento de una técnica sin marcador puede reducirse a un tiempo determinado por las cinéticas de la reacción de síntesis. Por ejemplo, una técnica sin marcador puede usarse para reducir el tiempo desde decenas de minutos por lectura en un sistema basado en el marcaje molecular bajado a segundos, o incluso milisegundos por identificación de nucleótido.

15

20

25

30

Las técnicas, los sistemas y el aparato como se describen en esta memoria descriptiva pueden usarse para proporcionar sensores sin marcador para monitorear los procedimientos enzimáticos, tales como la síntesis del material genético. Una cavidad resonante con un campo evanescente puede usarse para secuenciar una secuencia de ácido nucleico desconocida sin marcadores. En un aspecto, el material genético se retiene dentro del campo evanescente de la cavidad resonante y los precursores químicos para la extensión de los pares de bases del ácido nucleico se añaden de manera repetitiva en secuencia. El sensor se interroga de manera sincronizada con la adición de cada posterior base de ácido nucleico. Un cambio en las propiedades de la cavidad resonante que corresponde a la adición de una base particular indica la incorporación en el producto de síntesis e indica la siguiente base correspondiente.

35

40

A continuación, se describen ejemplos de las técnicas sin marcador, los sistemas y el aparato para secuenciar un ácido nucleico. Por ejemplo, un aparato de secuenciación sin marcador puede incluir uno o más sensores sin marcador para detectar un material biológico y químico, un mecanismo para retener un ácido nucleico en interacción con un sensor sin marcador, un medio para introducir de manera controlada un reactivo y los componentes para la modificación del ácido nucleico, y un medio sin marcador para interrogar uno o más sensores sin marcador para obtener la salida de uno o más sensores sin marcador y evaluar si se modifica un ácido nucleico en interacción con un sensor. Dicho sensor sin marcador puede implementarse para lograr un límite de detección en o por debajo de la adición de una única base.

45

50

Como ejemplo específico, dicho sensor sin marcador puede implementarse usando un sensor óptico que monitorea la presencia física de una base mediante la detección de la onda evanescente óptica para determinar la síntesis, y no requiere de un marcador unido a la base. En el anterior aparato ilustrativo, se coloca un ácido nucleico en el campo evanescente óptico de un sensor óptico sin marcador. En otro ejemplo, puede implementarse un método para secuenciar ácidos nucleicos basándose en uno o más sensores ópticos sin marcador. En este método, se coloca una especie de ácido nucleico dentro del rango de un sensor óptico de campo evanescente y los materiales de síntesis que contienen un reactivo y un conocido dNTP o base se introducen a las especies unidas. Se monitorea la salida del sensor óptico de campo evanescente para medir un cambio y el cambio medido se usa para determinar si ha ocurrido síntesis. Este método también incluye determinar la siguiente base en la secuencia basándose en el conocimiento de que el dNTP o base está presente en el momento en que una señal sensor del sensor óptico de campo evanescente indica la presencia de una materia unida adicional.

55

60

En una implementación de un aparato de secuenciación sin marcador, se coloca un sensor óptico sobre un sustrato de tal manera que el sensor óptico puede interrogarse mientras que permite simultáneamente que ocurra una reacción en la región de detección del sensor óptico. El sensor óptico puede implementarse usando un sensor de campo evanescente. Ejemplos de un sensor de campo evanescente incluyen: cavidades resonantes, interferómetros de Mach-Zehnder, u otros interferómetros aplicables con un mecanismo de detección que implica un cambio en el índice refractivo complejo en el camino óptico. Un ejemplo es un resonador de anillo, que se puede dirigir usando guías de ondas que se encaminan fuera de la región de detección.

65

Una cavidad resonante de anillo óptica forma una guía de ondas en forma de bucle cerrado. En la cavidad resonante de anillo óptica, la luz se propaga en forma de modos de galería susurrantes (WGM) que resultan de la reflexión interna total de la luz a lo largo de la superficie curvada del anillo. El WGM es un modo superficial que circula a lo largo de la superficie del resonador de anillo e interactúa repetidamente con cualquier material (por ejemplo, el material genético diana) sobre la superficie a través del campo evanescente WGM. A diferencia del sensor de guía

de ondas rectas, la longitud de la interacción luz-material eficaz de un sensor de resonador de anillo no se determina más por el tamaño físico del sensor, sino por el número de revoluciones de la luz soportada por el resonador, que se caracteriza por el factor de calidad del resonador, o el factor Q. La longitud eficaz  $L_{ef}$  se relaciona con el factor Q por la ecuación 1 de a continuación.

5

$$L_{ef} = \frac{Q\lambda}{2\pi n} \quad (2)$$

En donde  $\lambda$  es la longitud de onda y  $n$  es el índice refractario del resonador de anillo. Debido al gran factor Q, la cavidad resonante de anillo puede proporcionar un rendimiento de detección mayor que un sensor de guía de ondas recta mientras que usa órdenes de magnitud menores de área superficial y volumen muestra. Además, el pequeño tamaño del resonador de anillo permite una implementación de una gran cantidad de cavidades resonantes de anillo en una matriz de sensores.

10

Un sensor óptico sobre un sustrato puede fabricarse usando una técnica litográfica. La unión del sensor óptico a un sustrato puede proporcionar un medio conveniente para manejar el sensor óptico y fabricar sensores múltiples en matrices. En otros diseños, se puede separar un sensor óptico de un sustrato y puede estar flotando libre.

15

La Figura 1 ilustra una sección transversal de un sensor óptico de campo evanescente ilustrativo adecuado para las aplicaciones de secuenciación. Este sensor incluye un resonador óptico o una estructura interferométrica óptica que incluye una guía de ondas 102 formada sobre un sustrato 106 que puede ser, por ejemplo, un sustrato de silicio. En primer lugar, se forma la capa de revestimiento inferior 101 con un índice inferior al de la guía de ondas 102 sobre el sustrato 106 y se ubica debajo de la guía de ondas 102. Se forma una segunda capa de revestimiento superior 103 sobre la guía de ondas 102 y tiene un índice inferior que el de la guía de ondas 102. La capa de revestimiento superior 103 se estampa para tener una o más regiones 103A en las que el material de revestimiento para la capa de revestimiento superior 103 se elimina para formar una región de detección 103A. La región de detección se estructura para o bien exponer completamente una sección de la guía de ondas 102 o para tener una capa fina del material de revestimiento, para permitir que una cantidad suficiente de campo evanescente óptico de la luz guiada en la guía de ondas 102 esté presente en la región de detección 103A. Un material genético 104 (por ejemplo, ADN, ARN, ALN, etc.) se deposita sobre una superficie mediante un procedimiento de funcionalización en la región de detección 103A cerca de la guía de ondas 102, de tal manera que el campo evanescente de la guía de ondas 102 puede interactuar con el material genético 104. Se muestra que las regiones de revestimiento en la capa de revestimiento superior 103 definen una región de detección ilustrativa 103A que determina qué parte de la guía de ondas 102 se va a someter a funcionalización con el material genético 104. Se forma un canal de flujo o cavidad fluidica 105 en la parte superior del sensor y se proporciona un mecanismo de control fluidoico para dirigir diferentes soluciones en el canal de flujo o cavidad fluidica 105 durante un procedimiento de secuenciación para sintetizar una estructura genética diana, tal como una especie única de ácido nucleico en una región de detección 103A. Además, el mecanismo de control fluidoico puede dirigir las soluciones dentro del canal de flujo o cavidad fluidica 105 para otros procedimientos enzimáticos.

20

25

30

35

La Figura 2 ilustra una sección transversal en perspectiva de otro ejemplo de un sensor óptico de campo evanescente que tiene una cavidad resonante de anillo 203 y una guía de ondas de acoplamiento 202, formado sobre un sustrato de silicio 106. Las guías de ondas 202 y 203 se desplazan del sustrato por una capa aislante enterrada 101 como capa de revestimiento inferior, que puede ser, por ejemplo, dióxido de silicio. La funcionalización puede ocurrir cerca de la superficie o superficies de la cavidad resonante de anillo 203. En una implementación, igual al diseño de la Figura 1, una capa de revestimiento superior sobre la cavidad resonante de anillo 203 puede estamparse para formar regiones de detección cerca de la superficie de la cavidad resonante de anillo 203 para la síntesis de una estructura genética diana, tal como un ácido nucleico de especie sustancialmente única.

40

45

La Figura 3a ilustra una vista cenital de otro ejemplo de un sensor óptico de campo evanescente que incluye una cavidad resonante de anillo 203 y dos guías de ondas de acoplamiento 301 y 302 en acoplamiento evanescente con la cavidad resonante de anillo 203. Se forma una capa de revestimiento superior 103 sobre la primera guía de ondas 301 y se estampa para definir una o más regiones de detección por encima de la primera guía de onda 301 como se muestra en la Figura 1. La capa de revestimiento 103 se puede usar para confinar la interacción del material genético en cada región de detección para estar solamente hasta la proximidad inmediata del anillo 203. La segunda guía de ondas 302 es una guía de ondas óptica y puede usarse para guiar la luz junto con la detección evanescente en una región de detección en la primera guía de ondas 301.

50

55

La cavidad resonante de anillo 203 de las Figuras 2 y 3 pueden formarse mediante una guía de ondas en un bucle cerrado en diversas configuraciones. En la Figura 3a, la cavidad resonante de anillo es un bucle de guía de ondas cerrado en forma circular. El bucle de guía de ondas cerrado circular puede soportar uno o más modos de galería susurrantes a lo largo de la trayectoria circular del bucle de guía de ondas cerrado en y alrededor de la superficie exterior de la guía de ondas circular y puede ser independiente de la superficie interna de la guía de ondas circular

60

debido a que el modo de galería susurrante existe en y alrededor de la superficie exterior de la guía de ondas circular. La entrada óptica a la cavidad resonante de anillo 203 puede alcanzarse por acoplamiento evanescente entre la guía de ondas 301 y la cavidad resonante de anillo 203 que están separadas una de otra. En otras implementaciones, el bucle de guía de ondas cerrado puede ser en forma no circular que no soporta un modo de galería susurrante. Las Figuras 3b, 3c y 3d muestran ejemplos de formas de cavidades resonantes de anillo no circulares que funcionan en función de los modos de guía de ondas en lugar de los modos de galería susurrantes. Un modo de guía de ondas es soportado por la estructura de guía de ondas que incluye tanto las superficies exteriores como interiores como límites de la guía de ondas y, por tanto, es diferente de un modo de galería susurrante. Cada cavidad resonante de anillo se separa de la guía de ondas 201 por una distancia  $d$  que se selecciona para proporcionar el acoplamiento evanescente deseado. La configuración de acoplamiento evanescente deseado está indicado por el número 320. Un aspecto de dicho bucle de guía de ondas cerrado no circular que forma la cavidad resonante de anillo es proporcionar la misma configuración de acoplamiento evanescente 320 mientras que se proporciona diferentes guías de ondas de bucle cerrado. La Figura 3b y la Figura 3c muestran una cavidad resonante de anillo en una forma elíptica en una modo de guía de ondas en dos orientaciones 310 y 320. Las geometrías específicas del bucle de guía de ondas cerrado pueden seleccionarse en función de la necesidad de un diseño de sensor específico. El bucle de guía de ondas cerrado en forma de circuito de carreras, por ejemplo, puede ser usado. La Figura 3d muestra un ejemplo en donde el bucle de guía de ondas cerrado 340 tiene una forma irregular que puede estar diseñada para instalarse sobre un chip. Una cavidad resonante de anillo puede usarse para alcanzar un alto factor  $Q$  en la cavidad resonante de anillo en parte debido a la recirculación de la señal óptica guiada y dicho alto factor  $Q$  se puede aprovechar para alcanzar una alta sensibilidad de detección en la detección de una cantidad mínima de un material sobre la superficie de la cavidad resonante de anillo en un procedimiento enzimático sin marcador basado en la detección por sensor óptico y monitorización.

La Figura 4a ilustra un esquema de un sistema de monitorización con un módulo de control de flujo de fluidos 420 y una matriz de sensores 409 basada en sensores sin marcador. El módulo de control de flujo de fluidos 420 incluye unidades receptoras de fluidos, tales como los puertos 402, 403, 404, 405, 406 y 407 para recibir diversos tipos de fluidos en el módulo de control de flujo de fluidos. Asimismo, se proporcionan uno o más interruptores 401 en el módulo de control de flujo de fluidos para intercambiar o recibir selectivamente uno o más de los tipos de fluidos en el módulo de control de flujo de fluidos. La matriz de sensores 409 incluye una matriz de sensores sin marcador 411 dispuestos en diversas configuraciones. Por ejemplo, los sensores sin marcador 411 pueden disponerse en una configuración cuadrada o rectangular con un número  $N$  de filas y un número  $M$  de columnas de sensores. Los sensores sin marcador 411 pueden disponerse en otras configuraciones, tales como un círculo o un triángulo. Los sensores sin marcador 411 pueden ser sensores ópticos basados en los ejemplos de sensores en las Figuras 1-3b y otros diseños de sensores.

El módulo de control de flujo de fluidos 420 está conectado a la matriz de sensores 409 usando un canal de flujo 408. Las soluciones en el módulo de control de flujo de fluidos 420 fluyen a través del canal de flujo 408 y llegan a la matriz de sensores 409. Se pueden obtener diferentes soluciones en el módulo de control de flujo de fluidos 420 recibiendo los diversos tipos de fluidos usando el interruptor 401 y mezclando los fluidos recibidos. Por ejemplo, se puede añadir una mezcla de los diversos ácidos nucleicos y los compuestos de síntesis asociados a través de los puertos 402-405. Además, se pueden intercambiar diversas soluciones de lavado y limpieza, tales como los tampones a través de los puertos 406 y 407. La cantidad y el tipo de fluidos para recibir y mezclar en el módulo de control de flujo de fluidos 420 se controlan usando uno o más de los interruptores 401. Después de que los fluidos se combinen y se mezclen en una región cruce en el módulo de control de flujo de fluidos 420, la solución resultante se puede aplicar a través del canal de fluidos 408 y sobre la matriz de sensores 409. En esta configuración, cada sensor sin marcador podría tener unida una secuencia desconocida diferente.

La solución del módulo de control de flujo de fluidos 420 fluye sobre la matriz de sensores 409 y sale del sistema a través de la salida 410. Por tanto, se puede proporcionar un flujo continuo de soluciones a través de la matriz de sensores 409. En algunas implementaciones, la solución se puede mantener estática en la matriz de sensores 409 parando el flujo.

La Figura 4b muestra otro sistema de monitorización con un módulo de control de flujo de fluidos 420 y una matriz de sensores 409 basada en sensores sin marcador. Cada una de las unidades de entrada 402, 403, 404, 405, 406 y 407 está conectada a un respectivo interruptor 401. Para que un fluido entre selectivamente a través de una de las unidades de entrada de fluidos 402, 403, 404, 405, 406 y 407, se usa el respectivo interruptor. Los restantes componentes del sistema de monitorización son similares al sistema mostrado en la Figura 4a.

En los sensores sin marcador de la matriz de sensores 409, la superficie del sensor puede someterse a funcionalización para tener una estructura genética diana, tal como una secuencia de ácido nucleico retenida dentro de un modo óptico, por ejemplo, mediante la unión a la superficie del sensor. La funcionalización de la superficie del sensor puede conseguirse mediante diversas técnicas químicas de superficie. Una única cadena o un pequeño número de cadenas pueden unirse a la superficie del sensor. Una vez que la superficie del sensor se haya sometido a funcionalización con una cadena o cadenas de la secuencia del ácido nucleico diana, se puede realizar la síntesis en fase sólida.

En algunas implementaciones, el sistema de monitorización de las Figuras 4a y 4b puede usarse para someter a funcionalización la superficie del sensor uniendo la especie de la secuencia de ácido nucleico diana en grandes cantidades. Para lograr las grandes cantidades de la especie, la especie deseada se puede purificar y amplificar, según se necesite. El AN se puede unir covalentemente, hibridar con el molde, o retener uniéndose a una proteína. Además, el AN se puede retener directamente sobre una superficie, o se puede retener en una película porosa, tal como un gel, hidrogel o sol-gel.

Para la síntesis en fase sólida, se puede usar el sistema de monitorización de las Figuras 4a-b para amplificar la secuencia diana solo en la región de detección activa del sensor. Para amplificar solo la secuencia diana, se puede usar el cebador selectivamente unido y las secuencias de hibridación. Esto se puede lograr usando síntesis *in situ*, fotomodelado o técnicas de enmascaramiento, por ejemplo. El fotomodelado del cebador podría lograrse usando química de unión sensible al ultravioleta (UV). La selectividad deseada podría lograrse usando una capa enmascaradora formada fuera de un material que no permite la unión superficial, tal como material basado en Teflón. Este material en sí se puede estampar usando propuestas litográficas y otras técnicas.

Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse en aplicaciones en donde la secuencia diana se une en cantidades suficientemente grandes, y se proporciona una superficie activa para unirse solo en la región del sensor. Este tratamiento superficial puede ser más genérico y puede no requerir contener cebadores o secuencias de hibridación específicas. Sin embargo, para algunas aplicaciones, puede ser ventajoso proporcionar una secuencia de hibridación para una parte conocida de una molécula diana.

Por ejemplo, en el caso de un ensayo de polimorfismo de nucleótido único, la mayoría de la secuencia diana es conocida, y se podría diseñar una sonda de hibridación para precipitar la pieza particular de ácido nucleico de interés. A continuación, puede tener lugar la secuenciación de la región desconocida para exponer las adiciones, deleciones, sustituciones y otras mutaciones de interés.

El sistema de monitorización de las Figuras 4a-b puede usarse para proporcionar una combinación de unión multicadena y un procedimiento de amplificación para la unión multicadena. Por ejemplo, la hibridación de una muestra podría obtenerse usando secuencias sonda conocidas y, a continuación, se podría realizar la amplificación en fase sólida para incrementar los números.

En algunas implementaciones, la amplificación en fase sólida se podría realizar en solución, quizás en tiempo real, mientras que la hibridación ocurre en los sensores. Por ejemplo, los sensores en el sistema de síntesis pueden colocarse en una solución que se somete a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que realiza la amplificación.

Usando estas técnicas para la unión de AN diana al sensor, se puede medir la cantidad de material diana. Esto permite la calibración precisa de la cantidad de material diana en los sensores. Dicha calibración precisa de la cantidad de material diana permite la normalización de las posteriores reacciones de síntesis, y permite que un usuario determine cuándo se ha acumulado una cantidad apropiada de la secuencia diana para proceder con la síntesis. Esto puede observarse en tiempo real haciendo una sucesión rápida de mediciones durante la unión de AN diana y/o el procedimiento de amplificación. Asimismo, las mediciones pueden realizarse en momentos significativos en el procedimiento, tales como entres ciclos de la PCR. Con el conocimiento de la respuesta del sensor antes de la unión y durante o después de la unión, se puede determinar la cantidad de material diana unido.

En los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b, puede retirarse de la superficie del sensor cualquier material unido de manera inadvertida o no selectiva. La retirada puede lograrse mediante cualquiera de varias técnicas bien conocidas, tales como el lavado y la modificación de la astringencia del sensor, por ejemplo, pero sin limitación, calentando y/o cambiando la concentración de sal o el pH de la solución ambiente.

El examen en tiempo real de los sensores puede proporcionar información respecto al progreso del procedimiento de retirada. Además, puede proporcionarse retroalimentación de información para determinar cuándo parar el lavado, o cuándo parar el calentamiento del material diana. Por ejemplo, la solución ambiente puede calentarse hasta que el material unido de manera no selectiva se ha fundido fuera de los sensores. Sin embargo, la temperatura se mantiene por debajo de un punto en el que la secuencia diana estaría completamente eliminada. Observando la velocidad a la que se retira el material no deseado, se podría conseguir una valoración de qué temperatura usar, y cuándo parar el calentamiento. Se podría usar un planteamiento similar para regular el número de ciclos de lavado.

Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse en aplicaciones en donde una gran cantidad de diferentes especies diana están presentes en el mismo analito. El sistema puede usarse para controlar las condiciones de unión superficial para depositar solo una especie en cada sensor. Por ejemplo, la matriz de sensores 409 puede estar diseñada para incluir sensores múltiples con cada sensor enmascarado de tal manera para proporcionar unión superficial en el sensor. La concentración, el tiempo de reacción, la temperatura, etc., pueden modificarse para permitir estadísticamente que solo se deposite una única molécula diana dentro de cada región sensor. Una posterior amplificación en fase sólida puede aumentar el número de moléculas diana hasta un nivel apropiado para la observación de la síntesis.

Los problemas potenciales con este planteamiento de unión de especie única incluyen las posibilidades de que más de una especie se deposite en un sensor único, o no ocurra deposición en un sensor particular. Durante la síntesis se pueden investigar ambos casos de no especie única. Por ejemplo, cuando más de una especie se unen a un único sensor, se obtiene una respuesta irregular del sensor debido a que solo está disponible una proporción fraccional de los sitios para la adición de una base particular. Esta reducción de los sitios disponibles puede dar como resultado una respuesta del sensor fraccional en comparación con un sensor uniformemente hibridado. Los sensores sin moléculas diana proporcionan poca respuesta o ninguna. De tal forma, se puede distinguir un sensor bueno (unión de especie única) de un sensor malo (unión de múltiples especies o ninguna) durante el transcurso del procedimiento de síntesis.

Después de la unión de la molécula diana, el resto de los sitios de unión superficial activos pueden eliminarse o bloquearse para prevenir la acumulación de material no unido selectivamente. Debido a que el material no unido selectivamente puede inhibir la precisión de la medición, el bloqueo del resto de sitios de unión superficial activos puede proporcionar un resultado más preciso.

Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse para realizar la síntesis de AN usando varias técnicas. Por ejemplo, se pueden usar una polimerasa y sus soluciones tampón asociadas para realizar la síntesis. Cuando los sensores del sistema de síntesis incluyen un sensor de campo evanescente, la polimerasa y las soluciones tampón pueden provocar una desviación medible para la respuesta del sensor. Esta desviación puede lograrse de varias maneras. La síntesis puede realizarse en condiciones que fomentan una condición de unión de la polimerasa en estado estable. La unión de la polimerasa en estado estable da como resultado una desviación estable y la señal de síntesis deseada es la delta fuera de esta desviación de referencia. La desviación de referencia puede cambiar como los procedimientos de síntesis.

Asimismo, la polimerasa se puede conducir fuera de la secuencia diana para realizar la lectura y, a continuación, unirse de nuevo cuando proceda la posterior adición de bases. Cuando se separa la polimerasa, la polimerasa puede mantenerse en la solución ambiente o extraerse mediante lavado fuera de la región sensor y, a continuación, posteriormente recolocarse. Para una etapa de síntesis única, tal como la necesaria en una reacción de polimorfismo de nucleótido único (SNP), la retirada de la polimerasa no es crítica debido a que necesariamente no se requiere posterior reunión. Cuando hay que sintetizar grandes cantidades de bases, entonces es ventajoso mantener la polimerasa unida, si es posible.

Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse para detectar una variación genética denominada polimorfismos de nucleótido único (SNP). Los SNP comúnmente se determinan por matrices de hibridación que contienen cada una de las 4 posibles variantes como parte de una cadena 25-mero de ADN. Para detectar los SNP, el ADN apropiadamente preparado se expone a las matrices de hibridación. Un elemento matriz con la unión más fuerte indica el tipo de SNP presente. En los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b, se prepara una matriz de hibridación en un sensor sin marcador, en donde la secuencia de hibridación está diseñada para unirse al ADN proximal a la localización de SNP, pero sin abandonar la base de SNP expuesta para la secuenciación por síntesis. La matriz de hibridación puede estar diseñada sobre el sensor sin marcador de modo que el SNP es la siguiente base en la secuencia. Asimismo, la matriz de hibridación puede estar diseñada sobre el sensor sin marcador de modo que el SNP es un número conocido de bases desde la terminación de la secuencia de hibridación. En cualquier caso, la secuenciación por síntesis se realiza como se ha descrito anteriormente, y la identidad del SNP puede determinarse en función de la respuesta del sensor.

Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden implementarse para permitir que diferentes bases fluyan secuencialmente sobre los sensores. Los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden diseñarse para bombear diferentes bases en la secuencia sobre los sensores. El flujo puede ser continuo, o puede pararse una vez que la mezcla deseada está sobre la región sensor. Entre las diferentes soluciones que contienen las diferentes bases, se pueden añadir una cantidad de otras soluciones funcionales.

Las Figuras 5a-d ilustran ejemplos de una secuencia de diferentes soluciones que pueden aplicarse sobre los sensores en una matriz de sensores. La Figura 5a muestra una configuración básica de una mezcla de síntesis que permite la adición de dNTP o bases AN en orden secuencial. En este ejemplo, el dATP o base A se aplica sobre los sensores (por ejemplo, los sensores en la matriz de sensores 409 de los sistemas de monitorización) y se hace una medición. Después las bases o dATP, dCTP, dTTP, dGTP, etc. se aplican secuencialmente sobre los sensores. Opcionalmente, se puede añadir la enzima de síntesis (tal como polimerasa) con cada dNTP o base. La enzima de síntesis puede añadirse antes de dNTP o base si la enzima de síntesis mantiene un comportamiento estable o de otro modo predecible. Asimismo, se puede incluir la enzima de síntesis con todas las soluciones para garantizar la presencia de la enzima.

La secuencia de solución en la Figura 5b muestra una solución tampón, B, aplicada entre los diferentes dNTP o bases. Por ejemplo, los sensores pueden lavarse entre dNTP o bases. Una solución de lavado, tal como un tampón, B, puede añadirse a la secuencia de reactivos aplicados sobre los sensores, potencialmente entre cada solución de dNTP o base nucleotídica sucesiva. La solución tampón, B, se aplica para asegurar que el anterior dNTP o base se ha arrastrado o lavado de la región de reacción antes de la adición del siguiente dNTP o base. Por ejemplo, la

solución tampón se aplica entre la aplicación de dATP o base A y tampón B para prevenir o reducir la combinación de dATP y B (o bases A y B). Esto asegura que cada adición de base está separada en el tiempo y por la solución y, por tanto, se puede aislar. La solución tampón también puede usarse para eliminar la unión no selectiva.

5 Además, se pueden añadir regiones de no mezcla en el sistema de síntesis para prevenir que se entremezclen las diferentes soluciones de base. Esto podría conseguirse aplicando una burbuja de aire u otro fluido de no mezcla inyectado en serie con los reactivos. Asimismo, se puede aplicar una cantidad lo suficientemente grande del nuevo tipo de solución de dNTP o base para garantizar la retirada de la anterior solución de dNTP o base.

10 Incluso pequeñas cantidades de la anterior solución base restante en el sensor pueden llegar a ser un problema, a pesar del hecho de que la anterior etapa de síntesis debería haber reaccionado completamente. Si el nuevo dNTP o base reacciona, es posible que el siguiente dNTP o base posterior sea el siguiente en la línea para reaccionar y, por tanto, una pequeña cantidad de cadenas habrá saltado una base. Esta anomalía puede minimizarse mediante la retirada a fondo de la vieja solución base (por ejemplo, usando la solución de lavado) antes de la introducción de la próxima.

15 La secuencia de soluciones en la Figura 5c muestra la adición y la retirada de una enzima de síntesis a cada consulta de base. Por ejemplo, una enzima de síntesis, tal como la polimerasa, P, puede añadirse antes de cada dNTP o base. La polimerasa añadida, P, se retira antes de que se añada el siguiente dNTP o base usando una solución que fomenta la disociación de la polimerasa con la cadena diana, RP. Asimismo, después de retirar la polimerasa, se añade otra polimerasa antes del siguiente dNTP o base. Por ejemplo, la Figura 5c muestra la adición de la polimerasa, P, antes de la adición de dATP o base A. A continuación, después de la adición de dATP o base A y antes de la adición de la siguiente base, dCTP, la polimerasa añadida, P, se retira usando RP. A continuación, se añade otra polimerasa, P, antes de dCTP o base. La adición o retirada de la polimerasa se repite antes de la adición de cada dNTP o base.

20 La secuencia de fluidos en la Figura 5d muestra una polimerasa y dNTP o base asociada que se añaden para obtener una reacción de síntesis (A+P). La polimerasa añadida se retira usando una solución que disocia la polimerasa de la cadena diana, RP. Asimismo, se añade un tampón conocido que facilita una medida más precisa, M, del sensor. La adición y la retirada de la polimerasa y la adición del tampón para medir se repiten antes de la adición de cada dNTP o base.

25 En algunas implementaciones, estas opciones de secuencia de fluidos de las Figuras 5a-d se combinan de modo que emplee uno o más de estos planteamientos en una diversidad de diferentes órdenes y combinaciones.

30 Asimismo, un dNTP o base particular pueden unirse varias veces en un línea durante una secuencia particular. Por ejemplo, la secuencia de A, A-A o A-A-A puede reaccionar. Dicha incorporación repetida por un único dNTP o base puede determinarse midiendo la amplitud de la respuesta del sensor. Si la incorporación completa de una base única da como resultado una determinada respuesta, la incorporación completa de dos bases doblará aproximadamente la respuesta y de tres bases triplicará aproximadamente la respuesta, etc. Por tanto, sabiendo la magnitud de la respuesta cuantitativamente, se puede determinar las múltiples adiciones de un tipo único de base.

35 Asimismo, se pueden usar las bases que terminan la reacción después de la adición de un único nucleótido. Sin embargo, el uso de las bases de terminación requiere química adicional para procesar una serie de bases con el fin de permitir que suceda la reacción.

40 Además, los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse para evaluar cuándo se ha alcanzado la finalización. Debido a que es ventajoso acelerar la velocidad de reacción de síntesis, se puede realizar una monitorización en tiempo real de la reacción. Cuando se determina que la reacción está completa, o que no va a ocurrir ninguna reacción, puede comenzarse el procedimiento para introducir el siguiente dNTP o base.

45 Ya que se añaden más y más bases al producto de síntesis, la localización para la base adicional se puede estar moviendo o bien más cerca o más lejos de la superficie del sensor, dependiendo de la configuración de cebador empleada y de cómo la secuencia diana se une a los sensores. Para un sensor de campo evanescente de los sistemas de monitorización mostrados en las Figuras 4a-b, se puede obtener una respuesta no uniforme en función de la proximidad a la superficie del sensor. Por tanto, se puede corregir la señal del sensor para este cambio. La respuesta de referencia de la señal esperada puede ajustarse en función del tiempo debido a que la respuesta de la señal se ha calibrado para la localización conocida de la reacción de polimerización o debido a que la respuesta señal se está ajustando al deterioro del campo.

50 Este planteamiento es aplicable para el ADN, ARN o cualquier tipo de complejo de ácido nucleico que puede sintetizarse secuencialmente. En el caso del ARN, antes de la cualquier procedimiento de amplificación se podría requerir una conversión a ADNc, pero en absoluto es necesario.

55 Este planteamiento se puede escalar para altos grados de paralelismo incorporando una gran cantidad de sensores y/o sistemas de exploración. Por ejemplo, pueden emplearse muchos sensores sobre un único chip de un sistema

de síntesis. Asimismo, pueden implementarse muchos chips en un sistema de síntesis para lograr el escalado.

En algunas implementaciones, los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden implementarse para incluir un colector de conmutación microfluídica en la proximidad inmediata al sensor o sensores para permitir tiempos de conmutación fluidica más rápida. Dicho colector de conmutación microfluídica puede acelerar el procedimiento de secuenciación.

En algunas implementaciones, los sistemas de monitorización de las Figuras 4a-b pueden usarse para monitorear un procedimiento enzimático, distinto de la síntesis anteriormente descrita, dentro de un campo óptico de un resonador óptico. Un procedimiento enzimático puede dar como resultado una modificación del ácido nucleico cuando se aplican una o más enzimas. Ejemplos del procedimiento enzimático pueden incluir una de las siguientes reacciones: (1) extensión de base conducida por polimerasa; (2) escisión de base conducida por la actividad de reparación de la polimerasa; (3) extensión de ADN conducida por transcriptasa inversa; (4) actividad de la ARN exonucleasa conducida por transcriptasa inversa; (5) escisión de ADN conducida por la actividad de la endonucleasa específica a sitio; (6) apareamiento conducido por la actividad de la enzima ligasa y/o la acción de la topoisomerasa y/o las enzimas de recombinación; (7) fosforilación conducida por cinasa; (8) desfosforilación conducida por fosfatasa; (9) corte y empalme de ARN conducido por enzimas de corte y empalme y/o fragmentos de corte y empalme de ARN catalíticos; y (10) escisión por ARNmi conducida por el complejo DICER.

La Figura 6 muestra un ejemplo de un procedimiento para sintetizar un ácido nucleico. Los sensores ópticos sin marcador se someten a funcionalización con una especie única de un ácido nucleico desconocido (602). Un reactivo que comprende los materiales de síntesis y un conocido dNTP o base se introducen selectivamente a la especie desconocida de ácido nucleico (604). Se mide un cambio en una señal de salida del sensor óptico sin marcador para detectar la síntesis del ácido nucleico cuando una base nucleotídica en la especie desconocida de ácido nucleico se empareja con el dNTP conocido (606). Se identifica una siguiente base nucleotídica en el ácido nucleico desconocido para reaccionar basándose en el conocido dNTP o base introducido y el cambio medido en la señal de salida (608). Este procedimiento se puede repetir aplicando una secuencia de dNTP o base como se muestra en las Figuras 5a-d.

Asimismo, se puede medir una magnitud de la señal de salida para determinar una cantidad del conocido dNTP o base introducido incorporada durante la síntesis detectada. La especie desconocida de ácido nucleico puede amplificarse usando un cebador selectivamente unido y secuencias de hibridación. La amplificación en fase sólida y la hibridación de la especie desconocida de ácido nucleico pueden realizarse en paralelo. Puede medirse una cantidad de especies desconocidas de ácido nucleico en función de la señal de salida del sensor óptico antes y después de la funcionalización. Puede aplicarse no solo una sino una secuencia de conocidos dNTP o bases y los dNTP o bases unidos involuntariamente o no selectivamente pueden retirarse mediante la aplicación de un agente de lavado entre los dNTP o bases. La superficie del sensor óptico puede someterse a funcionalización con una especie única de ácido nucleico en función de la señal de salida del sensor óptico. Además, la medición de un cambio en una señal de salida del sensor óptico sin marcador puede incluir: la medición de una señal de salida del sensor óptico sin marcador antes de introducir el conocido dNTP o base; la medición de otra señal de salida del sensor óptico sin marcador después de introducir el conocido dNTP o base; y la identificación de una diferencia entre las señales de salida medidas. La especie desconocida de ácido nucleico puede retenerse dentro del campo evanescente.

La Figura 7 muestra un ejemplo de procedimiento para monitorear un procedimiento enzimático dentro de un campo óptico de un resonador óptico sin marcador. Los sensores ópticos sin marcador pueden usarse para retener una especie única de ácido nucleico dentro de un campo evanescente (702). Un reactivo para modificar el ácido nucleico de especie única se aplica la especie única de ácido nucleico (704). Se mide una señal óptica del resonador óptico sin marcador en respuesta al reactivo aplicado para identificar un procedimiento enzimático que da como resultado una modificación del ácido nucleico (706). El procedimiento enzimático puede incluir una de las siguientes reacciones: extensión de base conducida por polimerasa; escisión de base conducida por la actividad de reparación de la polimerasa; extensión de ADN conducida por transcriptasa inversa; actividad de la ARN exonucleasa conducida por transcriptasa inversa; escisión de ADN conducida por la actividad de la endonucleasa específica a sitio; apareamiento conducido por la actividad de la enzima ligasa y/o la acción de la topoisomerasa y/o las enzimas de recombinación; fosforilación conducida por cinasa; desfosforilación conducida por fosfatasa; corte y empalme de ARN conducido por enzimas de corte y empalme y/o fragmentos de corte y empalme de ARN catalíticos; y escisión por ARNmi conducida por el complejo DICER.

En algunas implementaciones, uno o más sensores de onda evanescente incluyen ácido nucleico múltiple unido a la superficie de los sensores. Los sensores pueden incluir un medio para introducir un reactivo que contiene todos los componentes necesarios para la síntesis y una base de elección. Los sensores pueden incluir un medio para interrogar los sensores y evaluar si la materia está unida.

Un método para secuenciar puede incluir la unión de múltiples especies conocidas de ácido nucleico dentro del rango de un sensor de campo evanescente. Un reactivo que contiene los materiales de síntesis y una base conocida se introducen a la especie unida. Se observa el cambio en la salida del sensor de campo evanescente para

determinar si ha ocurrido síntesis. La siguiente base en la secuencia se determina basándose en el conocimiento de que la base estaba presente en el momento en que la señal del sensor indica la presencia del material unido adicional. El sensor puede ser una cavidad resonante. La cavidad resonante puede ser un resonador de anillo. El resonador de anillo puede estar hecho principalmente de silicio y el anillo está dispuesto sobre una oblea de silicio sobre aislante.

5  
10 Uno o más sensores de onda evanescente pueden incluir una pluralidad de ácido nucleico de una especie sustancialmente única retenido dentro del campo evanescente, un medio para introducir de manera controlable un reactivo y los componentes para la modificación del ácido nucleico, y un medio sin marcador para interrogar el sensor y evaluar si se modifica el ácido nucleico. Uno o más sensores de onda evanescente pueden incluir una pluralidad de ácido nucleico de especie sustancialmente única unido a la superficie, un medio para introducir un reactivo que contiene todos los componentes necesarios para la síntesis, y una base de elección, y un medio sin marcador para interrogar el sensor y evaluar si se une la materia.

15 Un método para secuenciar ácidos nucleicos puede incluir la retención de una pluralidad de especies desconocidas de ácido nucleico dentro del rango de un sensor de campo evanescente, la introducción de un reactivo que contiene los materiales de síntesis y una base conocida a la especie unida, la observación del cambio en la salida del sensor de campo evanescente para determinar si ha ocurrido síntesis, y la determinación de la siguiente base en la secuencia basándose en el conocimiento de que la base estaba presente en el momento en que la señal del sensor  
20 indica la presencia de materia unida adicional.

25 Un resonador óptico puede usarse para monitorear un procedimiento enzimático que ocurre dentro del campo óptico de dicho resonador. El procedimiento enzimático puede dar como resultado una modificación del ácido nucleico, tal como: extensión de base conducida por polimerasa, escisión de base conducida por la actividad de reparación de la polimerasa, extensión de ADN conducida por transcriptasa inversa, actividad de la ARN exonucleasa conducida por transcriptasa inversa, escisión de ADN conducida por la actividad de la endonucleasa específica a sitio, apareamiento conducido por la actividad de la enzima ligasa y/o la acción de la topoisomerasa y/o las enzimas de recombinación, fosforilación, conducida por cinasa, desfosforilación conducida por fosfatasa, corte y empalme de ARN conducido por enzimas de corte y empalme y/o fragmentos de corte y empalme de ARN catalíticos, o escisión  
30 por ARNm conducida por el complejo DICER.

Aunque esta memoria descriptiva contiene muchos detalles, estos no deben interpretarse como limitaciones del ámbito de la invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, sino como descripciones de las características específicas a las realizaciones particulares de la invención. Determinadas características que se describen en esta  
35 memoria descriptiva en el contexto de las realizaciones separadas también pueden implementarse en combinación en una combinación única que cae dentro de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Por el contrario, también se pueden implementar diversas características descritas en el contexto de una única realización en realizaciones múltiples por separado o en cualquier subcombinación adecuada que está dentro de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas. Es más, aunque las características pueden haberse descrito  
40 anteriormente como que actúan en determinadas combinaciones e incluso inicialmente reivindicadas como tales, una o más características de una combinación reivindicada en algunos casos pueden suprimirse de la combinación, y la combinación reivindicada pueden dirigirse a una subcombinación o una variación de una subcombinación que está dentro de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

45 Solo se divulgan unas pocas implementaciones. Las variaciones y mejoras de las implementaciones descritas y otras implementaciones pueden hacerse basándose en lo que está descrito e ilustrado.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una secuencia de nucleótidos en una especie desconocida de ácido nucleico, comprendiendo el método:
- 5 proporcionar una pluralidad de fluidos que comprenden cada uno un respectivo nucleótido; provocar (604) una secuencia conocida de los fluidos, comprendiendo cada uno de los fluidos uno correspondiente de los nucleótidos, para fluir continuamente por un sensor óptico de resonador de anillo sin marcador que tiene una superficie que se somete a funcionalización con la especie desconocida de ácido nucleico;
- 10 medir (606) los cambios en una señal salida del sensor óptico de resonador de anillo para detectar las reacciones de síntesis entre la especie desconocida de ácido nucleico y la secuencia conocida de nucleótidos, en donde cada uno de los cambios en la señal de salida resulta de un cambio en una propiedad óptica del sensor óptico de resonador de anillo provocado por uno de los nucleótidos que se añade a la especie desconocida de ácido nucleico; e identificar (608) una secuencia de nucleótidos en la especie desconocida de ácido nucleico en función de los cambios medidos en la señal salida y la secuencia conocida de nucleótidos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además evitar la combinación de diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en donde la evitación de la combinación de diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos comprende proporcionar soluciones tampón entre los diferentes nucleótidos.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la evitación de la combinación de diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos comprende proporcionar burbujas de aire entre los diferentes nucleótidos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar la incorporación repetida de un nucleótido, de la secuencia conocida de nucleótidos, en la especie desconocida de ácido nucleico en función de una magnitud de cambio en la señal salida del sensor óptico de resonador de anillo.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, que comprende además detectar la incorporación doble de un nucleótido, de la secuencia conocida de nucleótidos, en la especie desconocida de ácido nucleico en función de un cambio doble en la señal salida del sensor óptico de resonador de anillo.
- 35 7. Un dispositivo para identificar una secuencia de nucleótidos en una especie desconocida de ácido nucleico, comprendiendo el dispositivo:
- un sensor óptico de resonador de anillo sin marcador que tiene una superficie (103A) que se somete a funcionalización con la especie desconocida del ácido nucleico (104);
- 40 una pluralidad de fluidos que comprenden cada uno un respectivo nucleótido; una pluralidad de unidades receptoras de fluidos que cada una se configuran para recibir uno respectivo de la pluralidad de fluidos de manera que cada unidad receptora de fluidos se configura para proporcionar uno respectivo de la pluralidad de fluidos que comprende uno correspondiente de los nucleótidos; y un módulo de control de flujo de fluidos configurado para provocar una secuencia conocida de los nucleótidos de las unidades receptoras de fluidos para fluir constantemente por el sensor óptico de resonador de anillo sin marcador;
- 45 en donde el dispositivo se configura para medir los cambios en una señal de salida del sensor óptico de resonador de anillo para detectar las reacciones de síntesis entre la especie desconocida de ácido nucleico y la secuencia conocida de nucleótidos, en donde cada uno de los cambios en la señal de salida resulta de un cambio en una propiedad óptica del sensor óptico de resonador de anillo provocado por uno de los nucleótidos que se añade a la especie desconocida de ácido nucleico; y
- 50 en donde el dispositivo se configura para identificar una secuencia de nucleótidos en la especie desconocida de ácido nucleico en función de los cambios medidos en la señal de salida y la secuencia conocida de nucleótidos.
- 55 8. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde el módulo de control de flujo de fluidos se configura para evitar la combinación de diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos.
9. El dispositivo de la reivindicación 8, en donde el módulo de control de flujo de fluidos se configura para proporcionar soluciones tampón entre los diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos.
- 60 10. El dispositivo de la reivindicación 8, en donde el módulo de control de flujo de fluidos se configura para proporcionar burbujas de aire entre los diferentes nucleótidos en la secuencia conocida de nucleótidos.
- 65 11. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde el dispositivo se configura para detectar la incorporación repetida de un nucleótido, de la secuencia conocida de nucleótidos, en la especie desconocida de ácido nucleico en función de una magnitud de cambio en la señal salida del sensor óptico de resonador de anillo.

12. El dispositivo de la reivindicación 11, en donde el dispositivo se configura para detectar una incorporación doble de un nucleótido, de la secuencia conocida de nucleótidos, en la especie desconocida de ácido nucleico en función de un cambio doble en la señal salida del sensor óptico de resonador de anillo.
- 5
13. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde la señal de salida es no uniforme en función de la distancia entre el sensor óptico de resonador de anillo y la localización de las reacciones de síntesis, y en donde el dispositivo se configura para corregir la no uniformidad.
- 10
14. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde el dispositivo se configura para monitorear la señal de salida en tiempo real para determinar cuándo una reacción de síntesis con uno de los nucleótidos está completa y, a continuación, para provocar que el módulo de control de flujo de fluidos comience un procedimiento para introducir el siguiente nucleótido en la secuencia conocida.
- 15
15. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde el sensor óptico de resonador de anillo comprende una guía de ondas, una capa de revestimiento superior, y una capa de revestimiento inferior, y en donde una parte de la capa de revestimiento superior se elimina para exponer una sección de la guía de ondas, comprendiendo la sección expuesta de la guía de ondas la superficie funcionalizada con la especie desconocida de ácido nucleico.

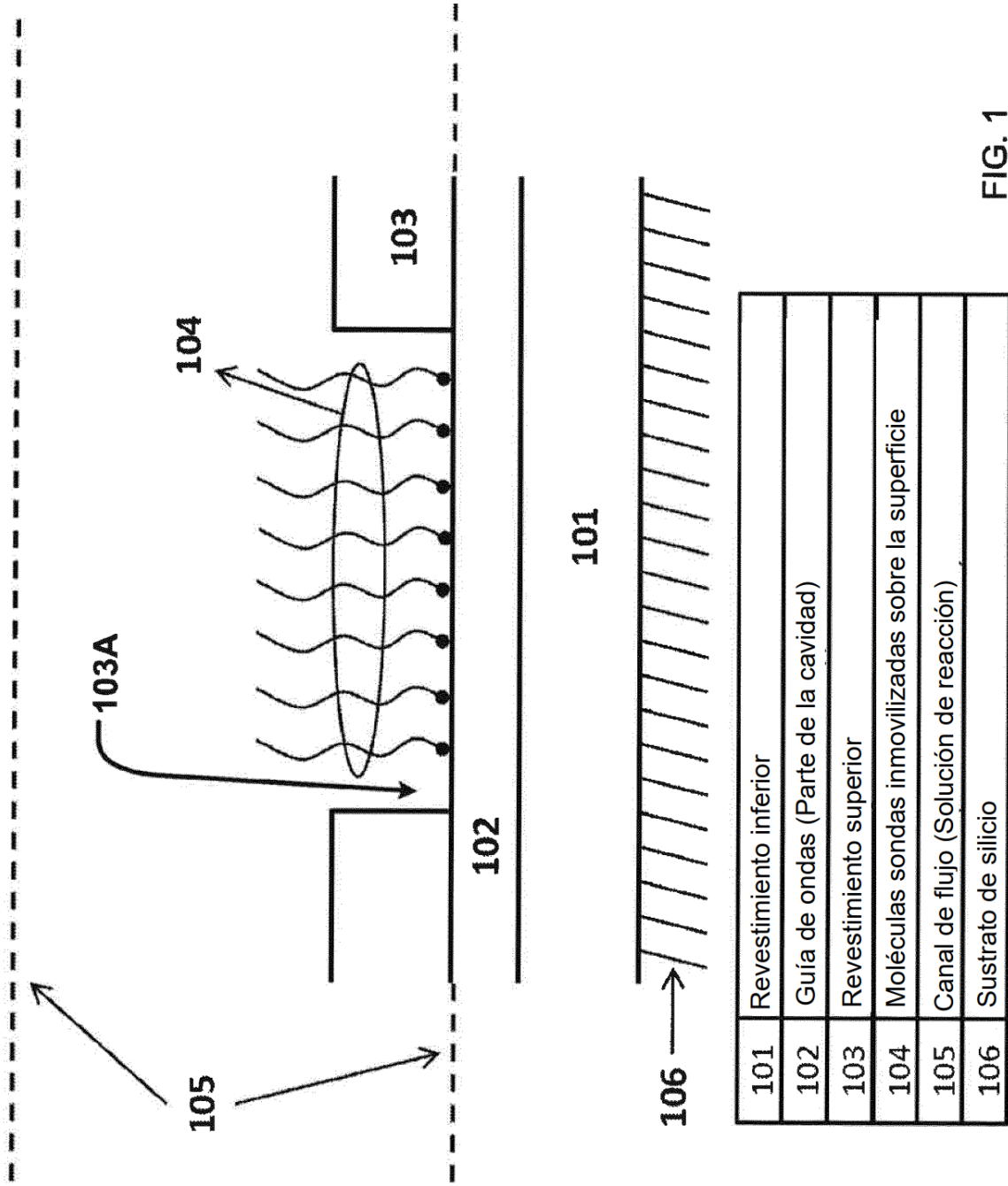
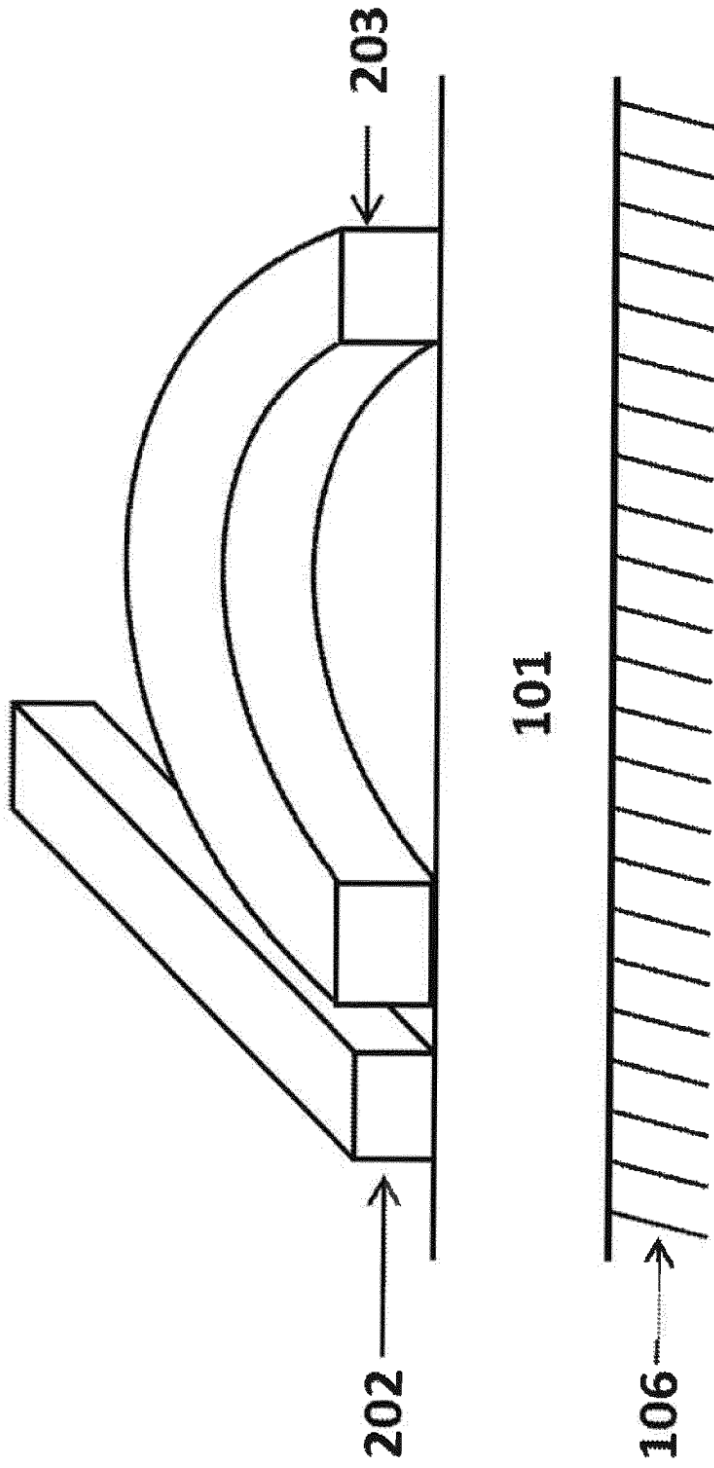
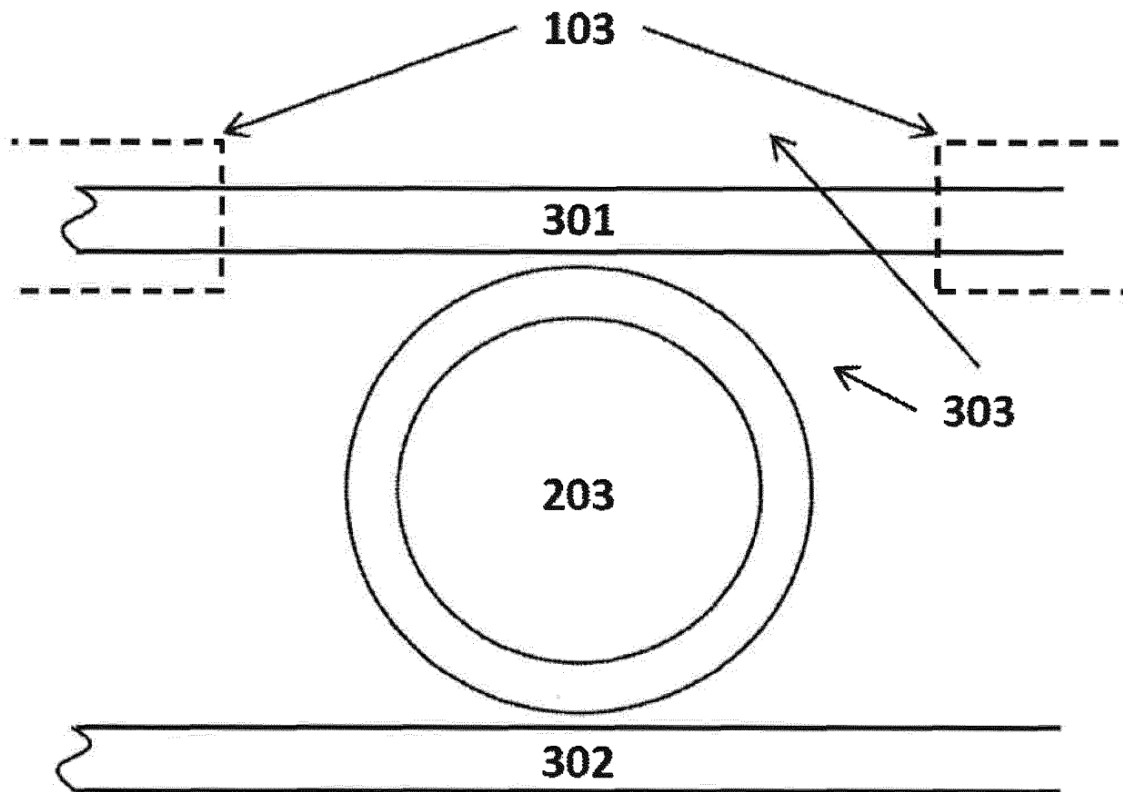


FIG. 1



101	Revestimiento inferior
106	Sustrato
202	Guía de ondas
203	Anillo

FIG. 2



Vista cenital del resonador de anillo con segunda guía de ondas opcional	
203	Anillo de silicio
301	Guía de onda
302	Guía de onda n.º 2 (Opcional)
103	Región de revestimiento
303	Óxido del campo

FIG. 3a

FIG. 3b

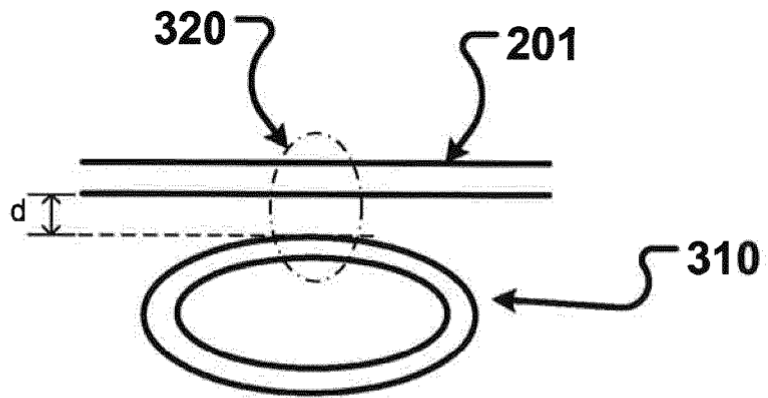


FIG. 3c

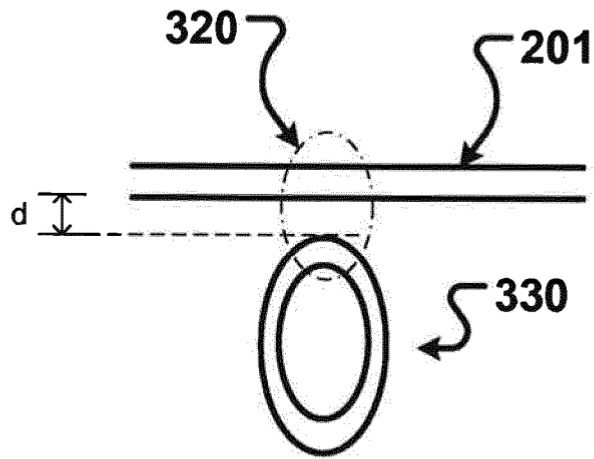
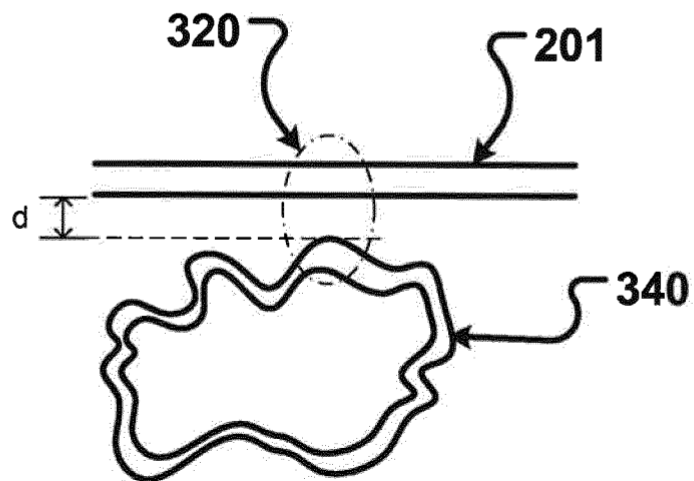


FIG. 3d



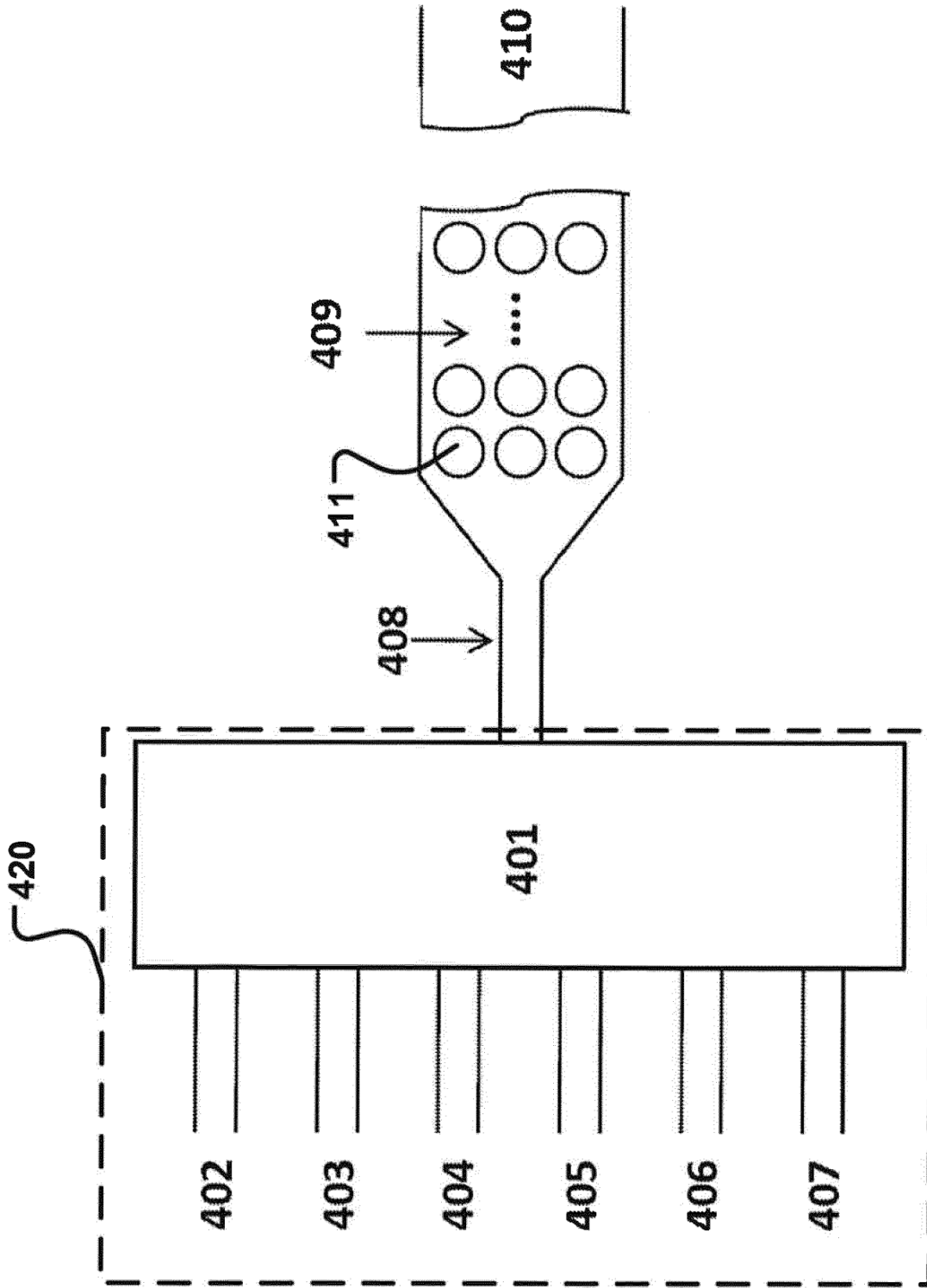


FIG. 4a

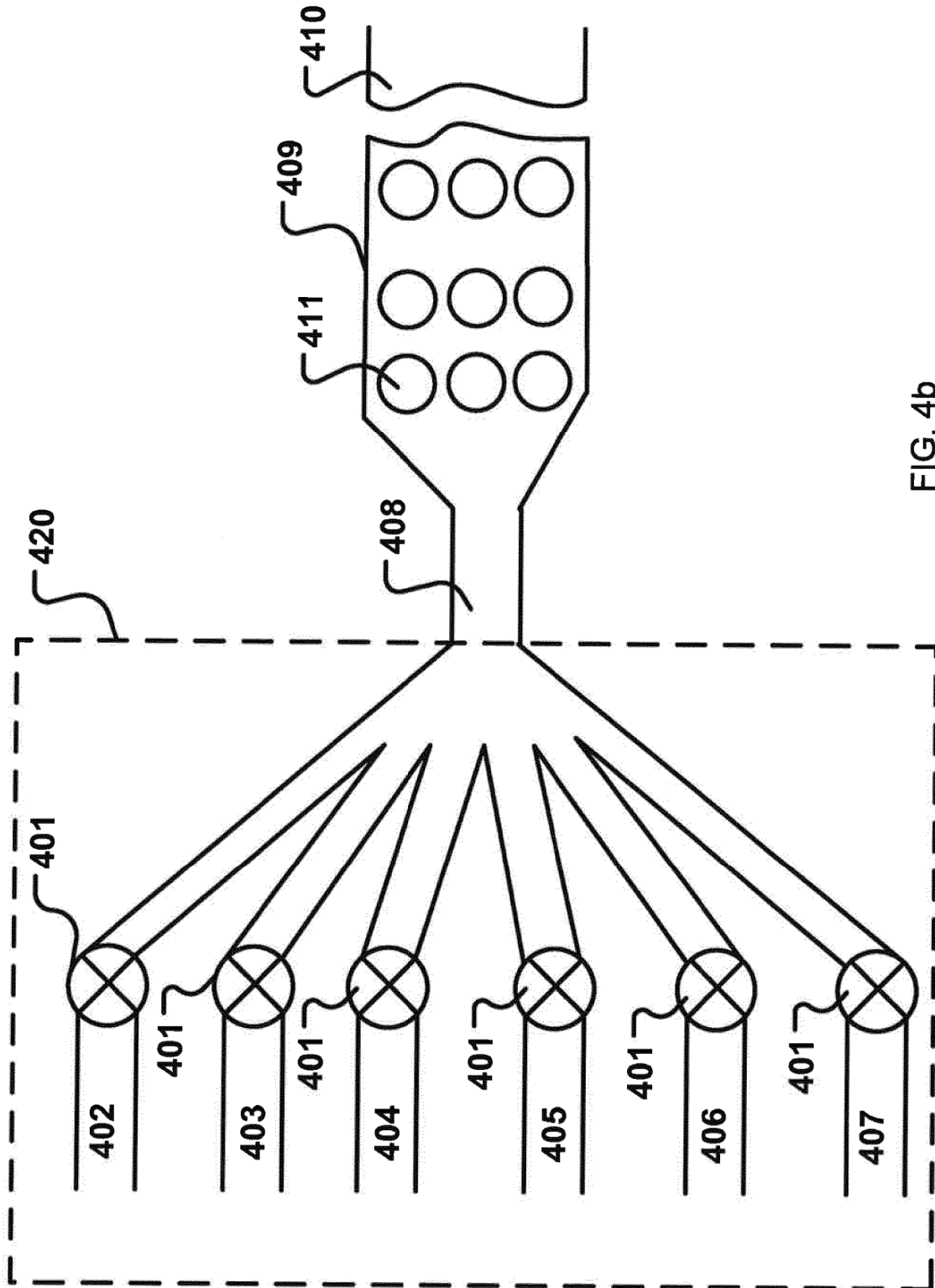


FIG. 4b

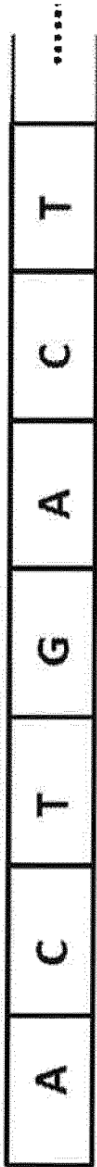


FIG. 5a

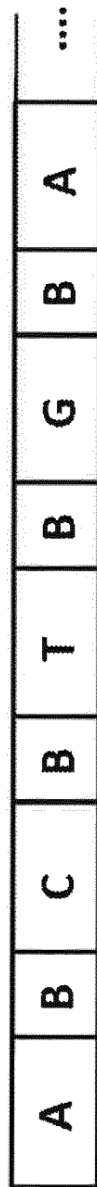


FIG. 5b



FIG. 5c



FIG. 5d

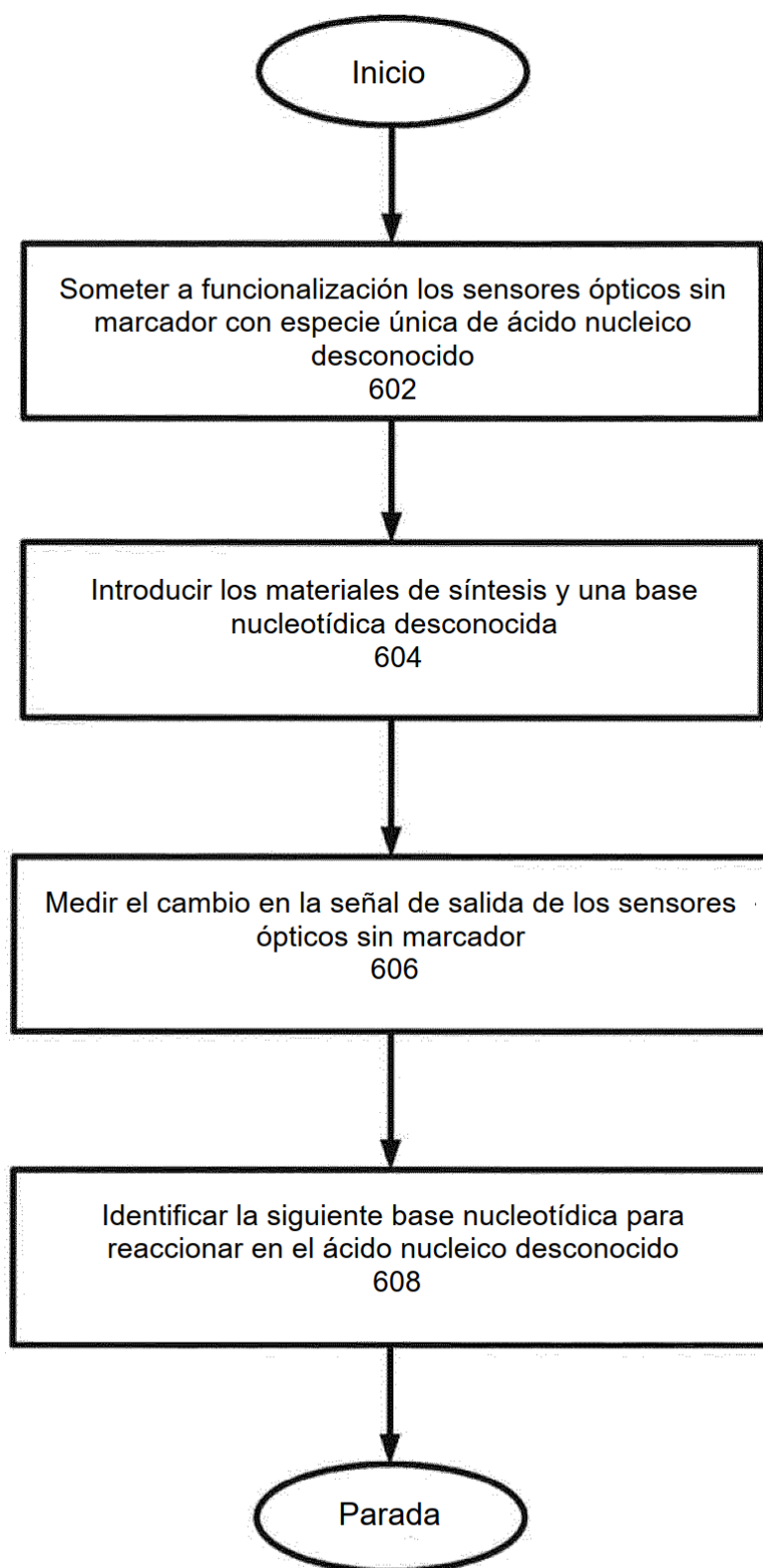


FIG. 6

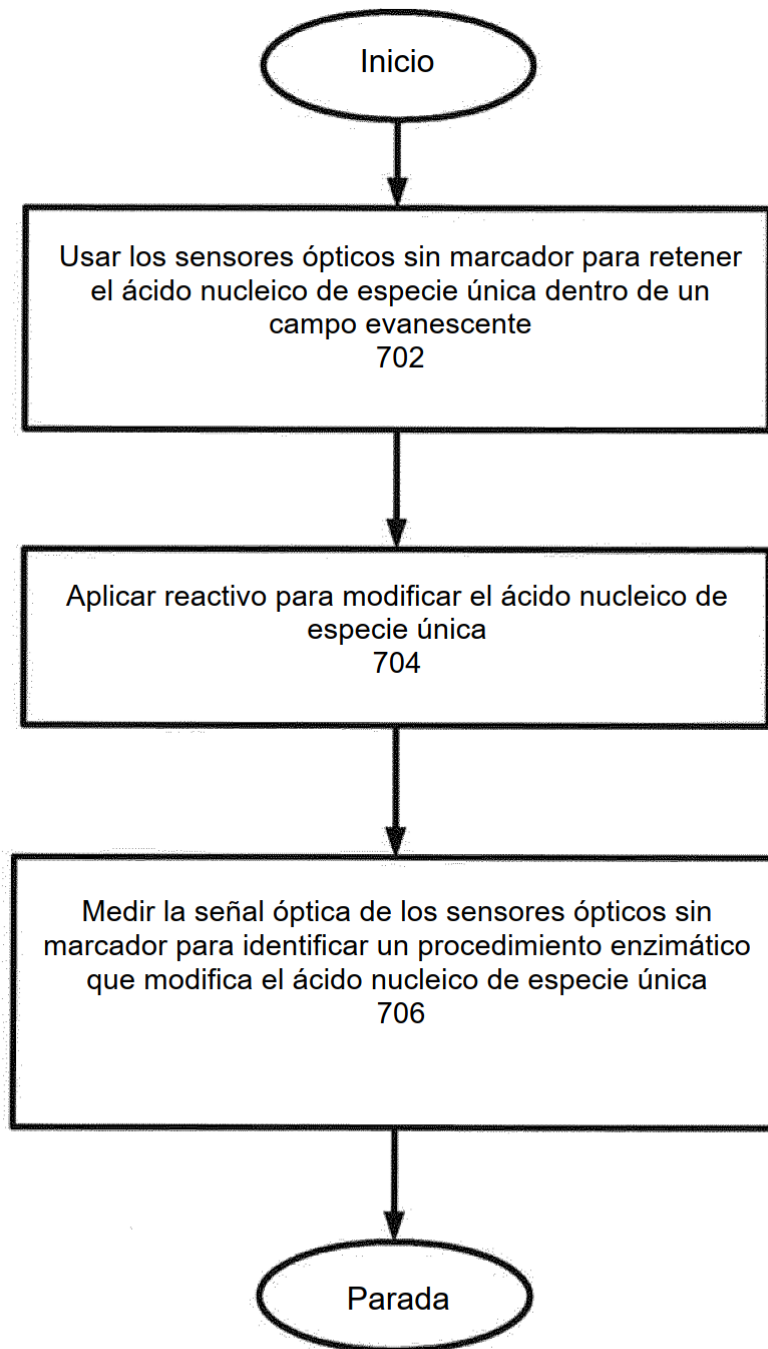


FIG. 7