



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019028107-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 14/07/2020

(54) Título: SENSOR E SISTEMA SENSORIAL

(51) Int. Cl.: G01N 27/327; B82Y 30/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/07/2018 NL N2021376; 29/06/2018 US 62/692,468.

(71) Depositante(es): ILLUMINA, INC..

(72) Inventor(es): JOHN MOON.

(86) Pedido PCT: PCT US2019036979 de 13/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/005557 de 02/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 27/12/2019

(57) **Resumo:** Um sensor inclui dois eletrodos e um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos. O canal condutor eletricamente modulável inclui um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos. O polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado inclui duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si, um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que as bases de nucleotídeos estão faltando e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

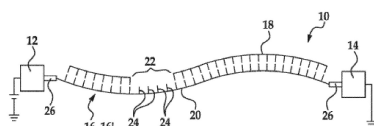


FIG. 1A

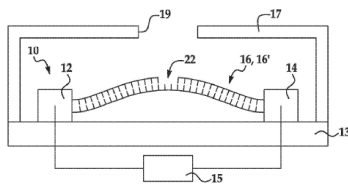


FIG. 1B

SENSOR E SISTEMA SENSORIALREFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do pedido provisório norte-americano com número de série US 62/692,468, depositado em 29 de junho de 2018, e pedido holandês com número de série N2021376, depositado em 23 de julho de 2018; o conteúdo de cada um deles é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0002] A Listagem de Sequências aqui submetida por meio do EFS-Web é aqui incorporada por referência na sua totalidade. O nome do arquivo é ILI149BPCT_IP-1687-PCT_sequence_listing_ST25.txt, o tamanho do arquivo é de 366 bytes, e a data de criação do arquivo é 7 de junho de 2019.

ANTECEDENTES

[0003] Diversos protocolos na pesquisa biológica ou química envolvem a realização de um grande número de reações controladas em superfícies de suporte locais ou dentro de câmaras de reação pré-definidas. As reações designadas podem então ser observadas ou detectadas e as análises subsequentes podem ajudar a identificar ou revelar propriedades dos agentes químicos envolvidos na reação. Por exemplo, em alguns ensaios multiplex, um analito desconhecido apresentando uma marcação identificável (por exemplo, um marcador fluorescente) pode ser exposto a milhares de sondas conhecidas sob condições controladas. Cada sonda conhecida pode ser depositada em um poço correspondente de uma microplaca. A observação de quaisquer

reações químicas que ocorram entre as sondas conhecidas e o analito desconhecido dentro dos poços pode ajudar a identificar ou revelar propriedades do analito. Outros exemplos de tais protocolos incluem processos conhecidos de sequenciamento de DNA, tais como sequenciamento por síntese (SBS) ou sequenciamento cíclico. Com técnicas de sequenciamento de polinucleotídeo, a análise pode ajudar a identificar ou revelar propriedades do polinucleotídeo envolvido nas reações.

INTRODUÇÃO

[0004] Um primeiro aspecto aqui descrito é um sensor. Em um exemplo, o sensor compreende dois eletrodos que apresentam um espaço entre os mesmos; e um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos, o canal condutor eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo: duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si; um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

[0005] Em um exemplo do sensor, o espaço apresenta um comprimento que varia de cerca de 10 nm a cerca de 50 nm.

[0006] Um exemplo do sensor ainda compreende uma

polimerase ligada ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado.

[0007] Em um exemplo do sensor, i) ligantes ligam, respectivamente, cada extremidade da primeira das cadeias de polinucleotídeos ao respectivo um dos dois eletrodos; ou ii) ligantes ligam, respectivamente, cada extremidade da segunda das cadeias de polinucleotídeos ao respectivo um dos dois eletrodos; ou iii) ambos i e ii.

[0008] Em um exemplo do sensor, pelo menos uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço é uma base guanina.

[0009] Em um exemplo do sensor, cada uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço é uma base guanina.

[0010] Um exemplo do sensor ainda compreende um detector para detectar uma resposta a partir do polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado quando um fio de comutação, incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço, associa-se a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos no espaço.

[0011] Um exemplo do sensor ainda compreende um substrato que suporta os dois eletrodos; e uma polimerase ligada ao substrato.

[0012] Um exemplo do sensor ainda compreende um sistema fluídico para introduzir um reagente ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado. Em um exemplo, o reagente inclui nucleotídeos marcados, pelo

menos um dos nucleotídeos marcados incluindo: um nucleotídeo; uma molécula ligante ligada ao grupo fosfato do nucleotídeo; e um fio de comutação ligada à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

[0013] Um exemplo do sensor ainda compreende uma pluralidade de outros canais condutores eletricamente moduláveis ligados aos dois eletrodos, cada um dos canais condutores eletricamente moduláveis incluindo um respectivo polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos.

[0014] Em um exemplo do sensor, o canal condutor eletricamente modulável exibe uma primeira condutância quando a pluralidade de bases de nucleotídeos são expostas no espaço; e uma segunda condutância que é diferente da primeira condutância quando pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos no espaço está associadas com bases de nucleotídeos complementares.

[0015] Deve ser entendido que quaisquer características do sensor aqui descrito podem ser combinadas de qualquer maneira e/ou configuração desejável, e/ou com qualquer outro exemplo aqui descrito.

[0016] Um segundo aspecto aqui descrito é um nucleotídeo marcado, compreende um nucleotídeo; uma molécula ligante ligada ao grupo fosfato do nucleotídeo; e um fio de comutação ligada à molécula ligante, o fio de

comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço do sensor do primeiro aspecto.

[0017] Um terceiro aspecto aqui descrito é um kit, compreendendo: um componente eletrônico, incluindo: um suporte; e dois eletrodos operativamente dispostos no suporte e separados por um espaço; e uma solução polimérica, incluindo: um carreador líquido; e um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado no carreador líquido, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo: duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si e apresentando extremidades opostas; um ligante ligada ao cada uma das extremidades opostas, cada ligante para ligar-se ao respectivo um dos dois eletrodos; um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos; o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado para formar um canal condutor eletricamente modulável no espaço entre os dois eletrodos quando cada um dos ligantes se liga ao respectivo um dos dois eletrodos.

[0018] Em um exemplo, o kit ainda compreende uma solução de reagente incluindo nucleotídeos marcados, pelo menos um dos nucleotídeos marcados incluindo: um nucleotídeo; uma molécula ligante ligada ao grupo fosfato

do nucleotídeo; e um fio de comutação ligada à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço. Em um exemplo do kit, as bases no fio de comutação são completamente complementares à pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço. Em outro exemplo do kit, o fio de comutação ainda inclui pelo menos um nucleotídeo apresentando uma base incompatível que é não complementar a correspondente uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço. Ainda em outro exemplo do kit, o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresenta pelo menos um nucleotídeo a menos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço. Ainda em um exemplo adicional do kit, o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresenta um número mais alto de nucleotídeos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço, e em que uma porção do fio de comutação forma uma estrutura de haste e alça quando associada ao espaço. Em um exemplo do kit, o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresenta um número mais alto de nucleotídeos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço; uma porção do fio de comutação forma uma estrutura de haste e alça quando associada ao espaço; e outra porção do fio de comutação é completamente complementar à pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço ou inclui pelo menos um nucleotídeo apresentando uma base incompatível que é não complementar a correspondente uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

[0019] Deve ser entendido que quaisquer características do kit podem ser combinadas de qualquer maneira desejável. Além disso, deve ser entendido que qualquer combinação de características do kit e/ou do sensor e/ou do nucleotídeo marcado pode ser usada junto e/ou combinada com quaisquer dos exemplos aqui descritos.

[0020] Em um quarto aspecto, um sistema sensorial compreende uma célula de fluxo; e um sensor eletrônico integrado na célula de fluxo, o sensor eletrônico incluindo: dois eletrodos que apresentam um espaço entre os mesmos; um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos, o canal condutor eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo: duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si; um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

[0021] Em um exemplo, o sistema sensorial ainda compreende um sistema de distribuição de reagentes para introduzir seletivamente um reagente a uma entrada da célula de fluxo. Em um exemplo, o reagente está em um recipiente de amostra, o reagente incluindo nucleotídeos marcados, pelo menos um dos nucleotídeos marcados

incluindo: um nucleotídeo; uma molécula ligante ligada ao grupo fosfato do nucleotídeo; e um fio de comutação ligada à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

[0022] Um exemplo do sistema sensorial ainda compreende um detector para detectar uma resposta do sensor eletrônico.

[0023] Um exemplo do sistema sensorial ainda compreende uma polimerase ancorada ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado ou um suporte do sensor eletrônico; e uma cadeia de polinucleotídeo modelo para ser introduzida no sensor eletrônico.

[0024] Deve ser entendido que quaisquer características do sistema sensorial podem ser combinadas de qualquer maneira desejável. Além disso, deve ser entendido que qualquer combinação de características do sistema sensorial e/ou do sensor e/ou do kit e/ou do nucleotídeo marcado pode ser usada junto e/ou combinada com quaisquer dos exemplos aqui descritos.

[0025] Um quinto aspecto aqui descrito é um método. Em um exemplo, o método compreende a introdução de uma cadeia de polinucleotídeo modelo a um sensor eletrônico apresentando uma polimerase ligada a i) um canal condutor eletricamente modulável que faz a ponte entre o espaço, e está eletricamente conectado a dois eletrodos ou ii) um substrato que suporta os dois eletrodos, o canal condutor

eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, o qual inclui: duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si; um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos; a introdução de reagentes incluindo nucleotídeos marcados no sensor eletrônico, em que um nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados se associa à polimerase e um fio de comutação específico para o nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados se associa com pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço; e, em resposta à associação no espaço, a detecção de uma resposta do sensor eletrônico.

[0026] Um exemplo do método ainda compreende a associação da resposta do sensor eletrônico com o fio de comutação específico para o nucleotídeo associado; e com base no fio de comutação específico para o nucleotídeo associado, a identificação do nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados.

[0027] Um exemplo do método ainda compreende o aquecimento para a dissociação do fio de comutação específico para o nucleotídeo do espaço.

[0028] Deve ser entendido que quaisquer características do método podem ser combinadas de qualquer maneira desejável. Além disso, deve ser entendido que qualquer combinação de características do método e/ou do

sistema sensorial e/ou do sensor e/ou de quaisquer dos kits e/ou do nucleotídeo marcado pode ser usada junto e/ou combinada com quaisquer dos exemplos aqui descritos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0029] As características dos exemplos da presente divulgação se tornarão aparentes por referência à seguinte descrição detalhada e figuras, nas quais os números de referência iguais correspondem a componentes semelhantes, embora talvez não idênticos. Por uma questão de brevidade, os números de referência ou características que apresentam uma função previamente descrita podem ou não ser descritos em relação a outras figuras em que eles aparecem.

[0030] A Fig. 1A é um diagrama esquemático de um exemplo de um sensor aqui descrito;

[0031] A Fig. 1B é um diagrama esquemático de um exemplo de um sensor e um exemplo de um sistema fluídico para introduzir um reagente ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado do sensor;

[0032] A Fig. 2 é um diagrama esquemático de um exemplo de um nucleotídeo marcado aqui descrito;

[0033] As Figs. 3A a 3D são diagramas esquemáticos de corte de diferentes exemplos de nucleotídeos marcados, incluindo diferentes fios de comutação, associados às bases de nucleotídeos expostas em um espaço de um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado;

[0034] A Fig. 4 é um diagrama esquemático em perspectiva de um exemplo de um sistema sensorial incluindo uma célula de fluxo e um exemplo do sensor aqui descrito;

[0035] A Fig. 5 é um diagrama esquemático de um

exemplo de um sistema sensorial; e

[0036] A Fig. 6 é um diagrama de fluxo de um exemplo de um método aqui descrito.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0037] Um sensor eletrônico/elétrico é aqui descrito o qual pode ser usado para a detecção de uma única molécula em procedimentos de sequenciamento de ácidos nucleicos. O sensor inclui um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos. O canal condutor eletricamente modulável inclui um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado (aqui referido como "dsNA" modificado) e, então, pode ser referido como um nanofio molecular condutor. Uma cadeia de polinucleotídeo ou fio do dsNA modificado apresenta um espaço em que as bases de nucleotídeos são expostas. As outras cadeias ou fitas de polinucleotídeos se estendem de um dos eletrodos para o outro dos eletrodos e, então, o canal condutor eletricamente modulável fornece um caminho de condução entre os dois eletrodos mesmo quando as bases de nucleotídeos no espaço são expostas (e a detecção de uma única molécula não ocorre). As bases de nucleotídeos no espaço são capazes de se associar com um fio de comutação apresentando pelo menos algumas bases de nucleotídeos complementares às bases de nucleotídeos no espaço. Quando o fio de comutação se associa no espaço, o caminho de condução aumenta e a condutância do canal eletricamente condutor é modulada. Como tal, o canal condutor eletricamente modulável exibe uma primeira condutância quando a pluralidade de bases de nucleotídeos são expostas

no espaço; e uma segunda condutância que é diferente da primeira condutância quando pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos no espaço estão associadas com bases de nucleotídeos complementares. Em um exemplo, quando as bases de nucleotídeos no espaço são expostas, a condutividade do canal condutor eletricamente modulável é relativamente baixa. Por outro lado, quando o fio de comutação se associa ao espaço, a condutividade do canal condutor eletricamente modulável muda (por exemplo, aumenta ou diminui), em alguns casos, em ordens de magnitude.

[0038] O fio de comutação pode ser parte de um nucleotídeo marcado, o qual inclui um nucleotídeo específico ligado ao fio de comutação. Como o nucleotídeo específico está sendo incorporado em uma fita nascente durante um procedimento de sequenciamento de ácido nucleico, a troca associa o espaço, o qual resulta em uma mudança na condutividade do canal condutor eletricamente modulável. Uma vez que o nucleotídeo e o fio de comutação são específicos um para o outro, a mudança de condutividade associada à troca está também associada ao nucleotídeo. Como tal, a mudança na condutividade pode ser usada para identificar a base de nucleotídeo a ser incorporada na fita nascente.

[0039] Agora, com referência à Fig. 1A, um exemplo do sensor 10 é mostrado. O sensor exemplo 10 é um sensor elétrico/eletrônico. O sensor 10 inclui dois eletrodos 12, 14 que apresentam um espaço entre os mesmos, e um canal condutor eletricamente modulável 16 ligado aos dois

eletrodos 12, 14. O canal condutor eletricamente modulável inclui um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado (isto é, dsNA modificado) 16' eletricamente conectado aos dois eletrodos 12, 14 e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos 12, 14, o dsNA modificado 16' incluindo duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente ligadas entre si; um espaço 22 em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos 18 em que os nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos 24 de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos 20 expostas no espaço 22 na primeira das cadeias de polinucleotídeos 18.

[0040] Os eletrodos 12, 14 estão em comunicação elétrica com o dsNA modificado 16'/canal condutor eletricamente modulável 16 e, então, um caminho de condução constante existe entre os eletrodos 12, 14 quando o sensor 10 está em operação. Tal como mencionado, este caminho de condução é modulável pela associação de um fio de comutação no espaço 22.

[0041] Qualquer material de eletrodo adequado pode ser usado que possa se ligar quimicamente e eletricamente ao dsNA modificado 16'. Exemplos de materiais de eletrodo adequados incluem ouro, platina, carbono, óxido de estanho índio, etc.

[0042] O dsNA modificado 16' é um polímero de ácido nucleico o qual inclui duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente ligadas entre si. Por "parcialmente ligadas entre si", entende-se que algumas das bases de nucleotídeos das duas cadeias 18, 20 são ligadas por ligações hidrogênio

uma a outra para formar uma dupla hélice, porém uma das cadeias 18 apresenta um espaço 22 sem quaisquer nucleotídeos. No espaço 22 na uma das cadeias 18, as bases de nucleotídeos da outra das cadeias 20 estão expostas. Por "exposta", entende-se que as bases destes nucleotídeos não estão ligadas a outro nucleotídeo e, então, estão disponíveis para serem ligadas, hibridizadas ou, de outra forma, associadas aos nucleotídeos complementares.

[0043] Os nucleotídeos das duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 podem ser nucleotídeos naturais. Nucleotídeos naturais incluem uma base heterocíclica contendo nitrogênio, um açúcar e um ou mais grupos fosfato. Exemplos de nucleotídeos naturais das duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 incluem ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos. Nos ribonucleotídeos, o açúcar é uma ribose e, nos desoxirribonucleotídeos, o açúcar é uma desoxirribose, isto é, um açúcar que não tem um grupo hidroxila que está presente na 2' posição na ribose. Em um exemplo, o nucleotídeo está na forma de polifosfato porque ele inclui diversos grupos fosfato (por exemplo, trifosfato (isto é, gamafosfato), tetrafosfato, pentafosfato, hexafosfato (tal como mostrado na Fig. 5), etc.). A base heterocíclica (isto é, nucleobase) pode ser uma base purina ou uma base pirimidina ou qualquer outro análogo da nucleobase. As bases purinas incluem adenina (A) e guanina (G) e derivados ou análogos modificados das mesmas. As bases pirimidina incluem citosina (C), timina (T) e uracila (U) e derivados ou análogos modificados das mesmas. O átomo C-1 da desoxirribose está ligado a N-1 de uma pirimidina ou

N-9 de uma purina. As cadeias de polinucleotídeos 18, 20 podem também incluir qualquer análogo de ácido nucleico. Um análogo de ácido nucleico pode apresentar qualquer uma da estrutura de fosfato, açúcar ou nucleobase alterada. Exemplos de análogos de ácido nucleico incluem, por exemplo, análogos de bases universais ou de estruturas de fosfato-açúcar, tais como ácido nucleico de peptídeo (PNA).

[0044] Tal como aqui mencionado, a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 apresenta um espaço 22 em que os nucleotídeos não estão presentes. O espaço 22 pode estar localizado em qualquer lugar ao longo da cadeia 18, por exemplo, no ou próximo do centro, tanto na extremidade da cadeia 18, entre o centro e uma extremidade da cadeia 18, etc. Como tal, em alguns exemplos, a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 inclui duas cadeias mais curtas separadas pelo espaço 22. Em outros exemplos (por exemplo, quando o espaço 22 está em qualquer uma das extremidades da cadeia 18), a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 é uma cadeia contínua única. Ainda em outros exemplos, a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 pode apresentar múltiplos espaços 18 ao longo da estrutura do polímero. O(s) espaço(s) 22 podem apresentar qualquer comprimento que é mais curto do que o comprimento total do dsNA 16'. Em um exemplo, o comprimento de cada espaço 22 varia de cerca de 5 nm a cerca de 60 nm. Em outro exemplo, o comprimento de cada espaço 22 varia de cerca de 10 nm a cerca de 50 nm. Ainda em outro exemplo, o comprimento de cada espaço 22 varia de cerca de 20 nm a cerca de 40 nm. Enquanto o comprimento do espaço 22 é definido como uma unidade

métrica, deve ser entendido que o comprimento do espaço pode também ser definido em termos do número de nucleotídeos que poderia caber no espaço 22, ou o número de bases de nucleotídeos da segunda cadeia polimérica 20 que são expostas no espaço 22. O(s) espaço(s) 22 na primeira cadeia de polinucleotídeo 18 reduz a condutividade do dsNA modificado 16'.

[0045] No espaço 22 na primeira cadeia de polinucleotídeo 18, uma pluralidade de nucleotídeos da segunda cadeia polimérica 20 são expostos. Em particular, as bases 24 destes nucleotídeos são expostas. As bases 24 expostas podem ser todas as mesmas bases ou podem ser uma combinação de diferentes bases. Em um exemplo, pelo menos uma das bases expostas 24 é guanina (G). Neste exemplo, as outras bases expostas 24 podem ser qualquer uma ou qualquer combinação de adenina (A), citosina (C), timina (T) e/ou uracila (U). Em outro exemplo, cada uma das bases expostas 24 é guanina (G). Pode ser desejável incluir diversas bases guanina (G) em uma fila exposta no espaço 22, uma vez que as bases guanina (G) conduzem a eletricidade melhor do que as outras bases.

[0046] As duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas apresentam extremidades opostas, e um ligante pode estar ligado a cada uma das extremidades opostas. Nos exemplos aqui descritos, i) ligantes ligam, respectivamente, cada extremidade da primeira das cadeias de polinucleotídeos 18 ao respectivo um dos dois eletrodos 12, 14; ou ii) ligantes ligam, respectivamente, cada extremidade da segunda das cadeias de polinucleotídeos ao

respectivo um dos dois eletrodos; ou iii) ambos i e ii. Enquanto a Fig. 1 ilustra a segunda cadeia de polinucleotídeo 20 ligada aos eletrodos 12, 14 através dos ligantes 26, deve ser entendido que a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 ou ambas as cadeias 18, 20 podem estar ligadas aos eletrodos 12, 14 através dos respectivos ligantes 26. Como tal, as respectivas extremidades 5' e 3' da primeira e/ou da segunda cadeia de polinucleotídeo 18, 20 podem apresentar um ligante 26 ligado na mesma. Os ligantes 26 conectam eletricamente o dsNA modificado 16' aos eletrodos 12, 14. Os ligantes 26 podem também ser capazes de ligar quimicamente os respectivos eletrodos 12, 14, então, fazendo a ponte do dsNA modificado 16' entre os eletrodos 12, 14. Sendo assim, os ligantes 26 podem depender do material do eletrodo. Como exemplos, ligantes de tiolato ou amina podem se ligar a eletrodos de ouro, ligantes de tiol podem se ligar a eletrodos de platina, e ligantes de silano (por exemplo, silano azida) podem se ligar a eletrodos ITO. A ligação ao respectivo ligante 26 a um dos eletrodos 12, 14 pode ser através de ligação covalente, ligação de coordenação ou outra ligação química ou física, dependendo do ligante e do material do eletrodo. Os ligantes 26 são também eletricamente condutores de modo que o caminho de condução entre os eletrodos 12, 14 é estabelecido quando o dsNA modificado 16' está ligado a cada um dos eletrodos 12, 14.

[0047] Qualquer exemplo do sensor 10 aqui descrito pode incluir uma pluralidade de outros canais condutores eletricamente moduláveis 16 ligado aos dois eletrodos 12,

14, cada um dos canais condutores eletricamente moduláveis 16 incluindo um respectivo polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16' eletricamente conectado aos dois eletrodos 12, 14, e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos 12, 14. Em outras palavras, o sensor 10 pode incluir dois ou mais polímeros de ácido nucleico parcialmente de dupla fita 16', em que cada dsNA modificado 16' está eletricamente conectado aos dois eletrodos 12, 14. Múltiplos canais 16 são relativamente fáceis de fabricar (ao permitir que múltiplas fitas de dsNA modificado 16' se liguem) e fornecem diversos espaços 22 com os quais o(s) fio(s) de comutação(s) podem se associar. Com múltiplos canais 16, o sinal da base (por exemplo, quando nenhum fio de comutação está associado, o espaço 33 é maior e, quando os respectivos fios de comutação se associam com os múltiplos canais condutores eletricamente moduláveis 16, o sinal detectado pode ser melhorado.

[0048] Embora não mostrado na Fig. 1A, o sensor 10 pode também incluir um substrato ou suporte sobre o qual os eletrodos 12, 14 estão posicionados. Um exemplo do suporte/substrato 13 é mostrado na Fig. 1C. O suporte/substrato 13 pode ser qualquer superfície sólida sobre a qual os eletrodos 12, 14 podem ser colocados. Qualquer superfície sólida não condutora ou semi condutora pode ser usada. A superfície sólida pode também ser não permeável e inerte a líquidos, reagentes etc. usados em uma operação de sequenciamento de uma única molécula. Alguns exemplos de suportes/substratos adequados 13 incluem epóxi

siloxano, vidro e vidro modificado ou funcionalizado, plásticos (incluindo acrílicos, poliestireno e copolímeros de estireno e outros materiais, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, politetrafluoroetileno (tal como TEFLON® de Chemours), polímeros de olefinas cíclicas/ciclo olefinas (COP) (tal como ZEONOR® de Zeon), poliimidas etc., nylon, cerâmicas/óxidos de cerâmicas, sílica, sílica fundida ou materiais a base de sílica, silicato de alumínio, silício e silício modificado (por exemplo, silício p+ dopado com boro), nitreto de silício (Si_3N_4), óxido de silício (SiO_2), pentóxido de tântalo (TaO_5) ou outros óxidos de tântalo (TaO_x), óxido de háfnio (HfO_2), vidros inorgânicos ou similares. O suporte ou substrato 13 pode também ser vidro ou silício, com uma camada de revestimento de dióxido de silício ou óxido de tântalo ou outro óxido cerâmico na superfície.

[0049] Também embora não mostrado na Fig. 1A, o sensor 10 pode também incluir um detector que pode detectar uma resposta elétrica do sensor 10. Exemplos do detector 15 são mostrados nas Figs. 1B, 4 e 5. Em um exemplo, o detector 15 é um amperímetro. Como será descrito em maiores detalhes com referência a Fig. 5, a condutividade do dsNA modificado 16' (e, então, o canal condutor eletricamente modulável 16) pode aumentar quando um fio de comutação 28 (mostrado na Fig. 2), incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22, associa-se a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos 24 no espaço 22.

[0050] Tal como mostrado na Fig. 1B, o sensor 10 pode ainda incluir um sistema fluídico 17 para introduzir um reagente ao canal condutor eletricamente modulável 16. Este sistema fluídico 17 pode ser qualquer dispositivo fluídico que pode distribuir o reagente ao dsNA 16' ou que permita que o reagente esteja contido dentro da proximidade do dsNA 16'. Tal como mostrado na Fig. 1B, o sistema fluídico 17 pode ser uma tampa de célula de fluxo que pode estar ligada ao e removida do suporte/substrato 13. Este exemplo do sistema fluídico 17 inclui uma entrada 19 através da qual o reagente pode ser introduzido. As paredes do sistema fluídico mantém o reagente dentro da proximidade do dsNA 16'. Como outro exemplo (não mostrado), o sistema fluídico 17 pode ser uma pipeta (ou outro dispositivo de distribuição) que pode ser usado para distribuir o reagente ao canal condutor eletricamente modulável 16/dsNA 16'. Neste exemplo, o suporte/substrato 13 pode apresentar um fosso adjacente ao canal condutor eletricamente modulável 16/dsNA 16' que pode receber o reagente e permitir que o reagente entre em contato com o canal condutor eletricamente modulável 16/dsNA 16'. Enquanto alguns exemplos de sistemas fluídicos tenham sido fornecidos, deve ser entendido que o sensor 10 pode incluir qualquer sistema fluídico 17 que pode distribuir um reagente para o canal condutor eletricamente modulável 16/dsNA 16' e/ou que permita que o reagente esteja contido dentro da proximidade do canal condutor eletricamente modulável 16/dsNA 16'.

[0051] O sensor 10 aqui descrito pode permitir sensibilidade a uma única molécula. Além disso, quando

disposto em uma matriz (isto é, diversos sensores 10 posicionados em um substrato/suporte 13), distâncias entre sensores muito pequenas podem ser usadas de modo que a densidade (isto é, sensor/área) pode ser muito alta.

[0052] Para formar o sensor 10, quaisquer métodos adequados podem ser usados. Em um exemplo, o dsNA modificado 16' pode ser sintetizado e, então, o dsNA modificado 16' pode estar ligado aos eletrodos 12, 14 para formar o canal condutor eletricamente modulável 16 no espaço entre os dois eletrodos 12, 14.

[0053] O dsNA modificado 16' pode ser feito pela síntese da segunda cadeia de polinucleotídeo 20 e, então, a mistura da segunda cadeia de polinucleotídeo 20 com fitas complementares que irão de ligar à segunda cadeia de polinucleotídeo 20 na posição adequada. A mistura pode, então, ser anelada para iniciar a ligação. Em um exemplo, duas fitas complementares podem se ligar às respectivas porções da segunda cadeia de polinucleotídeo 20 de modo que o espaço 22 é formado em algum lugar entre as duas extremidades do dsNA modificado 16' resultante. Em outro exemplo, uma fita complementar que é mais curta do que a segunda cadeia de polinucleotídeo 20 pode se ligar a uma porção da segunda cadeia de polinucleotídeo 20 de modo que o espaço 22 é formado em uma extremidade do dsNA modificado 16' resultante. Deve ser entendido que a segunda cadeia de polinucleotídeo 20 e as fitas complementares que se ligam para formar a primeira cadeia de polinucleotídeo 18 podem ser selecionadas para controlar o comprimento do espaço 22 e as bases de nucleotídeos 24 que são expostas no espaço

22.

[0054] O dsNA modificado 16' pode então estar ligado aos eletrodos 12, 14. Os ligantes 26 podem estar ligados ao dsNA modificado 16' utilizando qualquer técnica adequada e, então, os ligantes 26 podem estar ligados aos eletrodos 12, 14. Em um exemplo, bases de DNA modificadas com tiol podem ser conjugadas nas extremidades 3' e 5' das cadeias 18, 20. Em um exemplo, o dsNA modificado 16' pode estar imobilizado nos eletrodos 12, 14 pela exposição dos eletrodos 12, 14 em uma solução do dsNA modificado 16' por um tempo adequado, seguido pela rinsagem com um tampão adequado para remover dsNA modificado 16' não ligado.

[0055] Em um método de fabricação do sensor 10, os eletrodos 12, 14 podem também estar eletricamente conectados ao detector 15.

[0056] Em alguns exemplos, o sensor 10 pode estar pré-montado.

[0057] Em outros exemplos, os componentes do sensor podem ser parte de um kit e os componentes do kit podem ser usados para montar o sensor 10. Um exemplo do kit inclui um componente eletrônico e uma solução polimérica. O componente eletrônico inclui o suporte 13 e dois eletrodos 12, 14 operativamente dispostos no suporte e separados por um espaço. Por "operativamente dispostos", entende-se que os eletrodos 12, 14 podem estar conectados ao circuito eletrônico que permite sua operação (por exemplo, uma vez ligado a um detector 15 e fonte de energia). O circuito eletrônico pode estar eletricamente conectável ao detector 15 e à fonte de energia. A solução polimérica inclui um

carreador líquido e um dsNA modificado 16' no carreador líquido, em que o dsNA modificado 16' é qualquer um dos exemplos aqui descritos. Tal como aqui descrito, o dsNA modificado 16' inclui as duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente ligadas entre si e apresentando extremidades opostas. O dsNA modificado 16' pode apresentar ligantes 26 ligados ao uma ou ambas as faixas 18 e/ou 20 em cada uma das extremidades opostas. Em um exemplo, o dsNA modificado 16' está em uma solução iônica de tampão salino, tal como citrato salino em concentrações de milimolar a molar.

[0058] Ao utilizar o kit, o usuário pode depositar a solução polimérica nos componentes eletrônicos, permitir que a solução polimérica permaneça nos componentes eletrônicos durante um tempo adequado para que os ligantes 26 se fixem aos respectivos eletrodos 12, 14 e, depois, o componente eletrônico pode ser rinsado com um tampão adequado para remover o dsNA modificado 16'.

[0059] Além de conter componentes para formar o sensor 10, alguns exemplos do kit também podem incluir uma solução de reagente que deve ser usada com o sensor 10. A solução de reagente inclui nucleotídeos marcados, os quais são descritos em referência à Fig. 2.

[0060] Agora, com referência a Fig. 2, um exemplo de um nucleotídeo marcado 30, o qual inclui o fio de comutação 28 acima mencionado, é mostrado. O nucleotídeo marcado 30 inclui um nucleotídeo 32, uma molécula ligante 34 ligada ao grupo fosfato do nucleotídeo 22, e o fio de comutação 28 ligado à molécula ligante 34, o fio de

comutação 28 incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases 36 complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 do sensor 10. O nucleotídeo marcado 30 pode ser considerado um nucleotídeo não natural ou sintético porque ele é estruturalmente ou quimicamente distinto de um nucleotídeo natural.

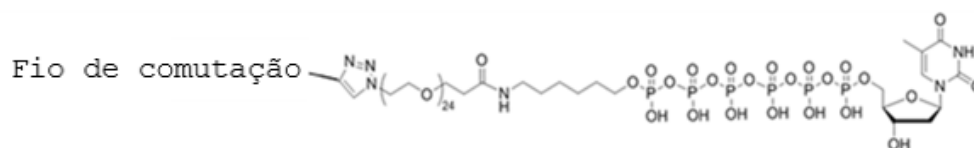
[0061] O nucleotídeo 32 do nucleotídeo marcado 30 pode ser um nucleotídeo natural. Nucleotídeos naturais incluem uma base heterocíclica contendo nitrogênio, um açúcar e três ou mais grupos fosfatos. Exemplos de nucleotídeos naturais incluem, por exemplo, ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos. Tal como mencionado acima, em um ribonucleotídeo, o açúcar é uma ribose e, em um desoxirribonucleotídeos, o açúcar é uma desoxirribose. Em um exemplo, o nucleotídeo 32 está na forma de polifosfato porque esta inclui diversos grupos fosfato (por exemplo, trifosfato, tetrafosfato, pentafosfato, hexafosfato, etc.). A base heterocíclica (isto é, nucleobase) pode ser uma base purina (por exemplo, adenina (A) ou guanina (G)) ou uma base pirimidina (por exemplo, citosina (C), timina (T) e uracila (U)).

[0062] O nucleotídeo marcado 30 também inclui a molécula ligante 34. A molécula ligante 34 pode ser qualquer molécula de cadeia longa que podem se ligar quimicamente, em uma extremidade, ao(s) grupo(s) fosfato(s) do nucleotídeo 32 e que podem se ligar quimicamente, na outra extremidade, ao fio de comutação 28. A molécula ligante 34 pode também ser selecionada de modo que ela não

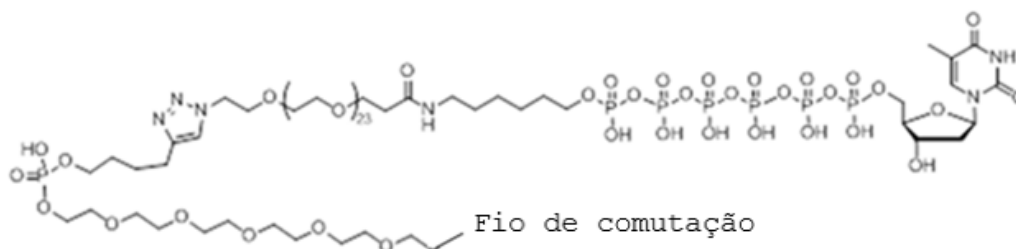
irá interagir com uma polimerase 38 usada no sistema 40, 40' (vide Figs. 4 e 5) aqui descrito. A molécula ligante 34 é selecionada de modo que ela seja longa o suficiente para permitir que o fio de comutação 28 se associe com as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 do sensor elétrico 10 enquanto, por exemplo, o nucleotídeo 32 é mantido pela polimerase 38.

[0063] Como exemplos, a molécula ligante 34 pode incluir uma cadeia alquílica, uma cadeia de poli (etilenoglicol), um grupo amida, um grupo fosfato, um heterociclo tal como um triazol, nucleotídeos ou combinações dos mesmos. Exemplos da cadeia alquílica podem incluir pelo menos 6 átomos de carbono e exemplos da cadeia de poli (etilenoglicol) podem incluir pelo menos 3 unidades de etilenoglicol.

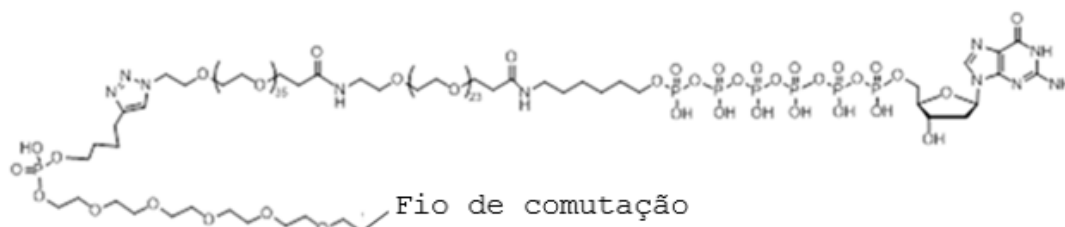
[0064] O exemplo a seguir ilustra um exemplo do nucleotídeo marcado 30, em que a molécula ligante 34 compreende uma cadeia alquílica, um grupo amida, uma cadeia de poli (etilenoglicol) e um triazol:



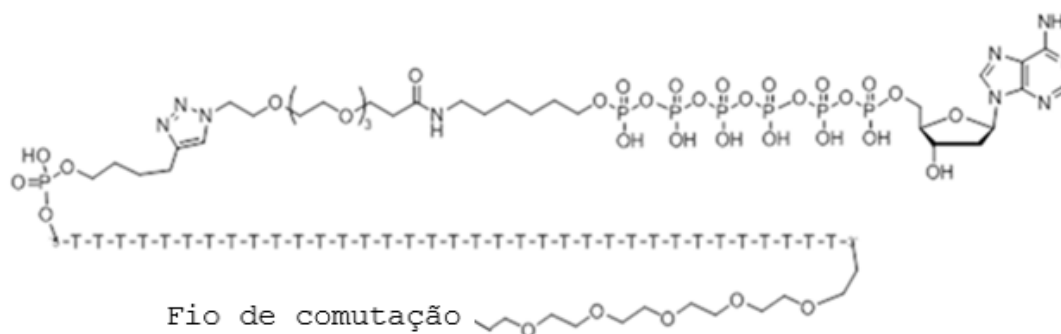
[0065] O exemplo a seguir ilustra outro exemplo do nucleotídeo marcado 30, em que a molécula ligante 34 compreende cadeias alquílicas, um grupo amida, cadeias de poli (etilenoglicol), um triazol e um grupo fosfato:



[0066] O exemplo a seguir ilustra ainda outro exemplo do nucleotídeo marcado 30, em que a molécula ligante 34 compreende cadeias alquílicas, grupos amida, cadeias de poli (etilenoglicol), um triazol e um grupo fosfato:



[0067] O exemplo a seguir ilustra ainda um exemplo adicional do nucleotídeo marcado 10, em que a molécula ligante 14, 14' compreende cadeias alquílicas, um grupo amida, cadeias de poli (etilenoglicol), um triazol, um grupo fosfato e uma cadeia de polinucleotídeo:



[0068] Enquanto diversos exemplos de moléculas ligantes 34 foram descritos, deve ser entendido que outras moléculas ligantes 34 podem ser usadas.

[0069] O fio de comutação 28 é um fio de

nucleotídeos. Os nucleotídeos no fio de comutação 28 são similares ao nucleotídeo 32, isto é, eles incluem a base heterocíclica contendo nitrogênio, o açúcar e três ou mais grupos fosfato. Pelo menos algum dos nucleotídeos no fio de comutação 28 incluem bases 36 que são complementares às bases 24 que são expostas no espaço 22 do sensor 10. Como tal, a sequência dos nucleotídeos no fio de comutação 28 depende, pelo menos em parte, da sequência das bases 24 expostas.

[0070] Em um exemplo, as bases 36 no fio de comutação 28 são completamente complementares à pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. Como um exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-G-G-G-G-G-G e o fio de comutação 28A pode ser C-C-C-C-C-C-C. Como outro exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-A-G-T-G-C-G-G e o fio de comutação 28A pode ser C-T-C-A-C-G-C-C. Em um exemplo mostrado na Fig. 3A, qualquer sequência adequada pode ser usada para o fio de comutação 28A, desde que ela apresente o mesmo número de bases que, e que seja completamente complementar a, as bases 24 expostas no espaço 22. Um exemplo do nucleotídeo marcado 30A incluindo um fio de comutação 28A completamente complementar é mostrado na Fig. 3A. Tal como mostrado, o fio de comutação 28A do nucleotídeo marcado 30A associa o mesmo com as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. Mais especificamente, neste exemplo, cada uma das bases de nucleotídeos 36 no fio de comutação 28A hibridiza temporariamente e pelo menos parcialmente a sua base

complementar 24 (da cadeia de polinucleotídeo 20) que está exposta no espaço 22 na cadeia de polinucleotídeo 18. Em alguns exemplos, a hibridização não é completa, e em outros exemplos, a hibridização é completa. Para alcançar a hibridização parcial ou completa, a temperatura de fusão da interação entre as bases complementares pode ser ajustada. Diferentes graus de hibridização entre os diferentes fios de comutação 28A e bases de nucleotídeos 24 permitem diferentes assinaturas de tempo a serem alcançadas com diferentes fios de comutação 28A. Quando incorporado, o fio de comutação 28A fecha um trocador do dsNA modificado 16', que altera significativamente (por exemplo, aumenta) a condutividade do dsNA 16', modula o canal 16, e resulta em uma mudança detectável.

[0071] Em outro exemplo, as bases 36 no fio de comutação 28 não são completamente complementares à pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22; mas sim, o fio de comutação 28B inclui pelo menos um nucleotídeo apresentando uma base incompatível 42 que é não complementar a correspondente uma da (mostrada como 24') pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22, tal como mostrado na Fig. 3B. Em outras palavras, a base trocada 42 não é complementar à base de nucleotídeo 24' correspondente exposta no espaço 22. Como um exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-G-G-G-G-G-G e o fio de comutação 28B pode ser C-C-C-A-C-C-C. Neste exemplo, a adenina do fio de comutação 28B é a base trocada 42 porque ela não é complementar à guanina correspondente exposta no espaço 22 da cadeia de

polinucleotídeo 20. Como outro exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-A-G-T-G-C-G-G e o fio de comutação 28B pode ser C-C-C-A-C-G-C-C. Neste exemplo, a segunda citosina do fio de comutação 28B é a base trocada 42 porque ela não é complementar à adenina correspondente exposta no espaço 22 da cadeia de polinucleotídeo 20. No exemplo mostrado na Fig. 3B, qualquer sequência adequada pode ser usada para o fio de comutação 28B, desde que ela tenha o mesmo número de bases, seja parcialmente complementar a e inclua pelo menos uma base trocada nas bases 24 expostas no espaço 22. Como mostrado, o fio de comutação 28B do nucleotídeo marcado 30B se associa às bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. Mais especificamente, neste exemplo, enquanto algumas das bases de nucleotídeos 36 no fio de comutação 28B hibridizam temporariamente as respectivas bases complementares 24, a base trocada 42 e a base de nucleotídeo correspondente 24' na cadeia de polinucleotídeo 20 permanece não ligada. Quando incorporada, o fio de comutação 28B fecha substancialmente um trocador do dsNA modificado 16' (porém não fecha completamente o trocador devido à base trocada 42), a qual modifica significativamente (por exemplo, aumenta) a condutividade do dsNA 16', modula o canal 16 e resulta em uma mudança detectável. Deve ser entendido que, em alguns exemplos, o aumento da condutividade com o fio de comutação 28B pode não ser tão grande quanto o aumento observado com o fio de comutação 28A, devido à base trocada 42.

[0072] Ainda em outro exemplo, o fio de

nucleotídeos no fio de comutação 28 apresenta pelo menos um nucleotídeo a menos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. Um exemplo deste fio de comutação 28C é mostrado na Fig. 3C. Os nucleotídeos no fio de comutação 28C são complementares a algumas das bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22; no entanto, após o fio de comutação 28C estar associado ao espaço 22, pelo menos uma das bases de nucleotídeos 24'' permanece não ligada devido ao comprimento mais curto do fio de comutação (por causa das bases faltantes). Como um exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-G-G-G-G-G-G e o fio de comutação 28C pode ser C-C-C-C-C. Neste exemplo, o fio de comutação 28C tem duas bases faltantes, ou é dois nucleotídeos mais curta do que o número total de bases de nucleotídeos 24 (incluindo 24'') expostas no espaço 22. Como outro exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 pode ser G-A-G-T-G-C-G-G e o fio de comutação 28C pode ser T-C-A-C-G-C-C. Neste exemplo, o fio de comutação 28C tem uma base faltante, ou é um nucleotídeo mais curta do que o número total de bases de nucleotídeos 24 (incluindo 24'') expostas no espaço 22. No exemplo mostrado na Fig. 3C, qualquer sequência adequada pode ser usada para o fio de comutação 28C, desde que ela apresente menos do que o número total de bases 24 expostas no espaço 22 e seja complementar a algumas das bases 24 expostas no espaço 22. Como mostrado na Fig. 3C, quando o fio de comutação 28C do nucleotídeo marcado 30C se associa ao espaço 22, i) as bases de nucleotídeos 36 no fio de comutação 28C hibridizam temporariamente e pelo menos

parcialmente às respectivas bases complementares 24, e ii) algumas das bases de nucleotídeos 24'' na cadeia de polinucleotídeo 20 permanecem não ligadas porque o fio de comutação 28 tem bases faltantes. Quando incorporado, o fio de comutação 28C fecha substancialmente um trocador do dsNA modificado 16' (porém não fecha completamente o trocador devido à(s) base(s) faltante(s)), o qual modifica significativamente (por exemplo, aumenta) a condutividade do dsNA modificado 16' (e o canal 16) e resulta em uma mudança detectável. Deve ser entendido que, em alguns exemplos, o aumento da condutividade com o fio de comutação 28C pode não ser tão grande quanto o aumento observado com o fio de comutação 28A, devido às bases faltantes.

[0073] Ainda em outro exemplo, o fio de nucleotídeos no fio de comutação 28 apresenta um número mais alto de nucleotídeos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22, e uma porção do fio de comutação 28 forma uma estrutura de haste e alça quando associada ao espaço 22. Um exemplo deste fio de comutação 28D é mostrado na Fig. 3D. Alguns dos nucleotídeos no fio de comutação 28D são complementares às bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22; no entanto, após o fio de comutação 28D estar associado ao espaço 22, nucleotídeos não complementares 36' do fio de comutação 28C permanecem não ligados e formam a haste e alça 44. Como um exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser G-G-G-G-G-G-G-G-G e o fio de comutação 28C pode ser C-C-C-C. Neste exemplo, o fio de comutação 28D inclui nove bases adicionais 36' que formam uma haste e alça 44.

Como outro exemplo, as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 podem ser A-G-T-T-T-T-T-G e o fio de comutação 28C pode ser T-C-C. Neste exemplo, o fio de comutação 28C inclui seis bases adicionais 36' quem formam uma haste e alça 44. No exemplo mostrado na Fig. 3D, qualquer sequência adequada pode ser usada para o fio de comutação 28C, desde que ela seja maior do que o número total de bases 24 expostas no espaço 22 e inclua pelo menos alguma base de nucleotídeo que é complementar às bases 24 expostas no espaço 22. As bases de nucleotídeos em qualquer uma das extremidades da haste e alça 44 podem ser completamente complementares às bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22, podem incluir uma ou mais bases não complementares, podem apresentar bases faltantes ou podem incluir combinações de bases complementares, não complementares e faltantes. Como mostrado na Fig. 3D, quando o fio de comutação 28D do nucleotídeo marcado 30D se associa ao espaço 22, i) algumas das bases de nucleotídeos 36 no fio de comutação 28D hibridizam temporariamente e pelo menos parcialmente às respectivas bases complementares 24 e ii) algumas das bases de nucleotídeos não complementares 36'' no fio de comutação 28D permanecem não ligadas e formam a haste e alça 44. Quando incorporadas, o fio de comutação 28D fecha um trocador do dsNA modificado 16', o qual modifica significativamente (por exemplo, aumenta) a condutividade do dsNA modificado 16', modula o canal 16 e resulta em uma mudança detectável. Alguma da corrente eletrônica será realizada em qualquer uma das cadeias 18, 20 (por exemplo, quando ambas as cadeias 18, 20

estão ligadas aos eletrodos 12, 14), assim, a adição de uma haste e alça 44 é comparável à adição de um resistor maior em paralelo.

[0074] Qualquer exemplo dos nucleotídeos marcados 30 (por exemplo, 30A, 30B, 30C, 30D) aqui descrito pode ser usado em uma solução de reagente de um exemplo do kit e/ou em um sistema sensorial 40, 40', exemplos os quais são mostrados na Figs. 4 e 5. Cada um dos sistemas 40, 40' também incluem um exemplo do sensor 10 aqui descrito.

[0075] O exemplo do sistema sensorial 40 mostrado na Fig. 4 inclui uma célula de fluxo 41 e um sensor eletrônico 10 integrado na célula de fluxo 41. O sensor eletrônico 10 inclui dois eletrodos 12, 14; um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16 que faz a ponte entre o espaço dos dois eletrodos 12, 14, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16 incluindo duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente ligadas (por meio de ligação de hidrogênio), um espaço 22 em uma primeira 18 das cadeias de polinucleotídeos em que nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos 24 de uma segunda 20 das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço 22. A célula de fluxo 41 é um frasco que contém o sensor 10. Deve ser entendido que outros frascos, tais como um poço, tubo, canal, cuvete, placa de Petri, garrafa ou similares podem alternativamente conter o sensor 10. Processos cíclicos, tais como as reações de sequenciamento de ácido nucleico, são particularmente bem adequados para células de fluxo 41.

[0076] Exemplos de células de fluxo 41 incluem um

substrato/suporte 13 e uma tampa ligada diretamente ou indiretamente à mesma ou integralmente formada na mesma. A célula de fluxo 41 pode incluir uma entrada de fluido 45 e uma saída de fluido 47 que permite a distribuição de volumes de reagentes a um sensor 10 ou uma matriz de sensores 10 contidas dentro da célula de fluxo 41.

[0077] O sistema sensorial 40 pode também incluir um sistema de distribuição de reagentes 49 para introduzir seletivamente um reagente em uma entrada (por exemplo, entrada de fluido 45) da célula de fluxo 41, sobre o sensor 10 e, então, para a saída de fluido 47. O sistema de distribuição de reagente 49 pode incluir tubos ou outros fluídicos que podem se ligar permanentemente ou de forma removível à entrada de fluido 45. O sistema de distribuição de reagente 49 pode incluir um recipiente de amostra 51. O reagente (incluindo o nucleotídeo marcado 30 para ser introduzido no sensor eletrônico 10) pode ser armazenado no recipiente da amostra ou preparado e introduzido no recipiente da amostra pouco antes do uso. O sistema de distribuição de reagente 49 pode também incluir uma bomba ou outro equipamento adequado para recuperar o reagente a partir do recipiente da amostra 51 e distribuir o mesmo para a entrada do fluido 45. Em outros exemplos, o recipiente da amostra 51 é posicionado de modo que o reagente possa fluir por gravidade para a entrada do fluido 45, sobre o sensor 10 e para fora da saída do fluido 47.

[0078] O sensor 10 na célula de fluxo 41 pode também estar operacionalmente conectado a um detector 15 para detectar as mudanças de condutividades do sensor 10

quando o sistema sensorial 40 é usado.

[0079] Outro exemplo do sistema 40' é mostrado na Fig. 5 e inclui um sensor eletrônico 10, o qual inclui dois eletrodos 12, 14; um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16 que faz a ponte entre o espaço dos dois eletrodos 12, 14, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16 incluindo duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente ligadas (por meio de ligação de hidrogênio), um espaço 22 em uma primeira 18 das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos 24 de uma segunda 20 das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço 22; e reagentes separados que devem ser introduzidos ao sensor eletrônico 10, os reagentes incluindo nucleotídeos marcados 30, pelo menos um dos nucleotídeos marcados 30 incluindo um nucleotídeo 32, uma molécula ligante 34 ligada ao grupo fosfato do nucleotídeo, um fio de comutação 28 ligada à molécula ligante 34, o fio de comutação 28 incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases 36 complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. No exemplo mostrado na Fig. 5, a cadeia de polinucleotídeo 18 é ACCGGGGTA-espaco-ATCCG e a cadeia de polinucleotídeo 20 é TGGGCCCCATCCCCCTAGGC (SEQ. ID No. 1). Na cadeia de polinucleotídeo 20, as bases de nucleotídeos "CCCCCC" estão expostas no espaço 22 (pelo menos até que um fio de comutação 28 esteja associado à mesma).

[0080] Embora não mostrado, deve ser entendido que

o sensor 10 pode estar posicionado dentro ou parte de um frasco, tal como uma célula de fluxo 41 (Fig. 4), um tubo, canal, cuvette, placa de Petri, garrafa ou similares. Outro exemplo de um frasco adequado é uma célula de fluxo.

[0081] Enquanto um sensor 10 é mostrado na Fig. 5, deve ser entendido que o sistema sensorial 40' pode incluir uma matriz de sensores 10 posicionada em um substrato. Além disso, o(s) sensor(es) 10 do sistema sensorial 40' pode(m), cada, estar eletricamente conectado a um respectivo detector 15 para detectar uma resposta do sensor elétrico 10 quando o fio de comutação 28 está associado ao espaço 22.

[0082] Alguns exemplos do sistema sensorial 40' ainda incluem uma polimerase 38 ancorada ao dsNA modificado 16' e uma cadeia de polinucleotídeo modelo 48 que deve ser introduzida no sensor 10.

[0083] Tal como mostrado na Fig. 5, o sensor 10 inclui a polimerase 38. Qualquer DNA polimerase pode ser usada de modo a catalisar a adição de um nucleotídeo em um momento na fita nascente. A DNA polimerase pode ser de qualquer uma das seguintes famílias: A, B, C, D, X, Y e RT. Exemplos específicos da família A incluem DNA polimerase T7, Pol I, Pol γ , Pol θ ou Pol ν ; ou da família B incluem Pol II, Pol B, Pol ζ , Pol α , Pol δ e Pol ϵ ; ou da família C incluem Pol III ou da família D incluem Pol D (heterodímero DP1/DP2) ou da família X incluem Pol β , Pol σ , Pol λ , Pol μ e terminal de transferência de desoxinucleotidotil; ou da família Y incluem Pol ι , Pol κ , Pol η , Pol IV e Pol V; ou da família RT incluem Telomerase.

[0084] Tal como mostrado na Fig. 5, a polimerase 38 está imobilizada ao dsNA modificado 16' com um tirante 46. Em outro exemplo, a polimerase 38 está imobilizada ao um substrato com o tirante 46. O tirante 46 é usado como um âncora para a polimerase 38 e pode ser desejável que o tirante 46 seja não condutor. Um tirante não condutor pode ser particularmente desejável quando a polimerase 38 está ligada ao dsNA modificado 16'. Exemplos de um tirante adequado 46 inclui polietilenoglicol (PEG) com um ligante clivável em algum ponto ao longo da cadeia PEG ou pode incluir a química níquel NTA/His tag, a química estreptavidina/biotina (por exemplo, estreptavidina ligada ao dsNA modificado 16' e biotina ligada à polimerase 38), hibridização DNA - DNA, hibridização DNA - PNA, carboxil silano 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ou qualquer outro ligante que pode se ligar a polimerase ao dsNA modificado 16' ou à superfície do substrato. Em alguns exemplos, o tirante 46 mantém a polimerase 38 pelo menos 10 nm longe do dsNA modificado 16'. Isto pode ser desejável, por exemplo, de modo que mudanças conformacionais da polimerase 38, mudanças da polimerase 38 e/ou mudanças do alvo/cadeia de polinucleotídeo modelo 48 mantido pela polimerase 38 não interfira com a operação de sensibilização do dsNA modificado 16'.

[0085] Em um exemplo, o dsNA modificado 16' pode estar inicialmente ligado à polimerase 38 pelo tirante 46, o qual inclui um ligante clivável. Esta combinação pode ser introduzida aos eletrodos 12, 14 para se ligar às extremidades opostas do dsNA modificado 16' aos eletrodos

12, 14 e para se ligar a polimerase 38 à superfície de um substrato por meio, por exemplo, da química níquel NTA/His tag. Neste exemplo, o ligante clivável pode ser clivado para separar a polimerase 38 do dsNA modificado 16'. Neste exemplo, a polimerase 38 está em proximidade do dsNA modificado 16', porém, não está na verdade em contato com o mesmo. Deve ser entendido que o tirante 46 pode ser clivado quando a química é fornecida para manter a polimerase 38, por exemplo, na superfície do substrato e dentro de uma proximidade do sensor 10.

[0086] Tal como aqui mencionado, exemplos do sistema 40, 40' podem também incluir a cadeia de polinucleotídeo modelo 48 que deve ser introduzida ao sensor 10.

[0087] A cadeia de polinucleotídeo modelo 48 pode ser qualquer amostra que deve ser sequenciada e pode ser composta de DNA, RNA ou análogos das mesmas (por exemplo, ácido nucleicos de peptídeos). A fonte da cadeia de polinucleotídeo modelo (ou alvo) 48 pode ser DNA genômico, RNA mensageiro ou outros ácidos nucleicos de fontes nativas. Em alguns casos, a cadeia de polinucleotídeo modelo 48 que é derivada de tais fontes pode ser aqui amplificada antes do uso em um método ou sistema 40, 40'. Qualquer uma de uma variedade de técnicas de amplificação conhecidas pode ser usada incluindo, porém não se limitando a, reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação de círculo rolante (RCA), amplificação de deslocamento múltiplo (MDA) ou amplificação de iniciador aleatório (RPA). Deve ser entendido que a amplificação de uma cadeia

de polinucleotídeo modelo 48 antes do uso no método ou sistema 40, 40' aqui indicado é opcional. Como tal, uma cadeia de polinucleotídeo modelo 48 não será amplificada antes de ser usada em alguns exemplos. A cadeia de polinucleotídeos modelo/alvo 48 pode ser opcionalmente derivada de bibliotecas sintéticas. Os ácidos nucleicos sintéticos podem apresentar composições nativas de DNA ou RNA ou podem ser análogas a estas

[0088] Amostras biológicas a partir das quais a cadeia de polinucleotídeo modelo 48 pode ser derivada incluem, por exemplo, aquelas a partir de um mamífero, tal como um roedor, camundongo, rato, coelho, cobaia, ungulado, cavalo, ovelha, porco, cabra, vaca, gato, cão, primata, humano ou primata não humano; uma planta tal como *Arabidopsis thaliana*, milho, sorgo, aveia, trigo, arroz, canola ou soja; uma alga tal como *Chlamydomonas reinhardtii*; um nematódeo tal como *Caenorhabditis elegans*; um inseto tal como *Drosophila melanogaster*, mosquito, mosca de fruta, abelha ou aranha; um peixe tal como *zebrafish*; um réptil; um anfíbio tal como um sapo ou *Xenopus laevis*; um *dictyostelium discoideum*; um fungo tal como *Pneumocystis carinii*, *Takifugu rubripes*, levedura, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*; ou um *Plasmodium falciparum*. As cadeias de polinucleotídeo modelo 48 podem também ser derivadas de procariotas tais como uma bactéria, *Escherichia coli*, *Staphylococci* ou *Mycoplasma pneumoniae*; um arquea; um vírus tal como vírus da hepatite C, vírus ebola ou vírus da imunodeficiência humana; ou um viroide. As cadeias de polinucleotídeo modelo 48 podem ser derivadas

de uma cultura homogênea ou população dos organismos acima ou alternativamente de uma coleção de diversos diferentes organismos, por exemplo, em uma comunidade ou ecossistema.

[0089] Além disso, as cadeias de polinucleotídeo modelo 48 podem não ser derivadas de fontes naturais, porém, podem ser sintetizada utilizando técnicas conhecidas. Por exemplo, sondas de expressão gênica ou sondas de genotipagem podem ser sintetizadas e utilizadas nos exemplos aqui indicados.

[0090] Em alguns exemplos, as cadeias de polinucleotídeo modelo 48 podem ser obtidas como fragmentos de um ou mais ácidos nucleicos maiores. A fragmentação pode ser realizada utilizando qualquer um de uma variedade de técnicas conhecidas na arte incluindo, por exemplo, nebulização, sonicação, clivagem química, clivagem enzimática ou cisalhamento físico. A fragmentação pode também resultar do uso de uma técnica de amplificação particular que produz amplicons pela cópia de apenas uma porção de uma cadeia de ácido nucleico maior. Por exemplo, a amplificação por PCR produz fragmentos que apresentam um tamanho definido pelo comprimento da sequência de nucleotídeo no modelo original que está entre as localizações em que os iniciadores de flanqueamento hibridizam durante a amplificação. O comprimento da cadeia de polinucleotídeo modelo 48 pode ser em termos do número de nucleotídeos ou em termos de um comprimento métrico (por exemplo, nanômetros).

[0091] Uma população de cadeias de polinucleotídeo modelo/alvo 48, ou amplicons das mesmas, pode apresentar um

comprimento de fita médio que é desejado ou adequado para uma aplicação particular dos métodos ou sistema 40, 40' aqui indicados. Por exemplo, o comprimento de fita médio pode ser menor do que cerca de 100.000 nucleotídeos, cerca de 50.000 nucleotídeos, cerca de 10.000 nucleotídeos, cerca de 5.000 nucleotídeos, cerca de 1.000 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos ou cerca de 50 nucleotídeos. Alternativamente ou adicionalmente, o comprimento de fita médio pode ser maior do que cerca de 10 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 1.000 nucleotídeos, cerca de 5.000 nucleotídeos, cerca de 10.000 nucleotídeos, cerca de 50.000 nucleotídeos ou cerca de 100.000 nucleotídeos. O comprimento de fita médio para uma população de cadeia de polinucleotídeos alvo 48 ou amplicons da mesma, pode estar em uma faixa entre um valor máximo e um valor mínimo definido acima.

[0092] Em alguns casos, uma população das cadeias de polinucleotídeo modelo/alvo 48 pode ser produzida sob condições ou, de outra forma, configurada para um comprimento máximo para os seus membros. Por exemplo, o comprimento máximo para os membros pode ser menor do que cerca de 100.000 nucleotídeos, cerca de 50.000 nucleotídeos, cerca de 10.000 nucleotídeos, cerca de 5.000 nucleotídeos, cerca de 1.000 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos ou cerca de 50 nucleotídeos. Alternativamente ou adicionalmente, uma população das cadeias de polinucleotídeo modelo 48 ou amplicons das mesmas, pode ser produzida sob condições ou,

de outra forma, configurada para apresentar um comprimento mínimo para os seus membros. Por exemplo, o comprimento mínimo para os membros pode ser mais do que cerca de 10 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 1.000 nucleotídeos, cerca de 5.000 nucleotídeos, cerca de 10.000 nucleotídeos, cerca de 50.000 nucleotídeos, ou cerca de 100.000 nucleotídeos. O comprimento de fita máximo e mínimo para as cadeias de polinucleotídeo modelo 48 em uma população pode estar em uma faixa que varia entre um valor máximo e um valor mínimo definido acima.

[0093] Tal como mostrado na Fig. 5, a cadeia de polinucleotídeo modelo 48 (por exemplo, uma fita de DNA de única fita) a ser sequenciada está ligada à polimerase 38 após ter sido introduzida na solução junto com os reagentes, tal como os nucleotídeos marcados 30.

[0094] Em alguns exemplos, diversos nucleotídeos diferentes marcados 30 (por exemplo, respectivamente marcados com dA, dC, dG e dT como o nucleotídeo 32) podem ser usados juntos em um sistema 40, 40' incluindo uma matriz de sensores 10. Em um exemplo, quatro diferentes nucleotídeos marcados 30 são usados, cada, incluindo, um nucleotídeo diferente 32 e um fio de comutação diferente específico para o nucleotídeo 28. Como um exemplo, os nucleotídeos marcados 30 incluem um primeiro nucleotídeo marcado, o qual inclui desoxiadenosina polifosfato como o nucleotídeo e um primeiro fio de comutação específico para o nucleotídeo; um segundo nucleotídeo marcado, o qual inclui desoxiguanosina polifosfato como o nucleotídeo e um

segundo fio de comutação específico para o nucleotídeo apresentando uma sequência diferente daquela do primeiro fio de comutação; um terceiro nucleotídeo marcado, o qual inclui desoxicistidina polifosfato como o nucleotídeo e um terceiro fio de comutação específico para o nucleotídeo apresentando uma sequência diferente de cada uma do primeiro e segundo fios de comutação; e um quarto nucleotídeo marcado, o qual inclui desoxitimidina polifosfato como o nucleotídeo e um quarto fio de comutação específico para o nucleotídeo apresentando uma sequência diferente de cada uma do primeiro, segundo e terceiro fios de comutação. Como tal, neste exemplo, o primeiro, o segundo, o terceiro e o quarto fios de comutação específicos para os nucleotídeos são diferentes um do outro. Os diferentes fios de comutação irão gerar mudanças de condutividade (quando associadas a um espaço complementar 22), o qual pode ser usado para identificar o nucleotídeo específico ligado ao mesmo.

[0095] Agora, com referência a Fig. 6, um exemplo de um método é mostrado. O método 100 inclui a introdução de uma cadeia de polinucleotídeo modelo 48 para um sensor eletrônico 10 apresentando uma polimerase 38 ligada a i) um canal condutor eletricamente modulável 16 que faz a ponte entre um espaço e está eletricamente conectada aos dois eletrodos 12, 14, ou ii) um substrato 13 que suporta os dois eletrodos 12, 14, o canal condutor eletricamente modulável 16 incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado 16', o qual inclui: duas cadeias de polinucleotídeos 18, 20 parcialmente

ligadas entre si; um espaço 22 em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos 18 em que nucleotídeos são faltantes; e uma pluralidade de bases de nucleotídeos 24 de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos 20 expostas no espaço 22 na primeira das cadeias de polinucleotídeos 18 (número de referência 102); introdução dos reagentes incluindo nucleotídeos marcados 30 ao sensor eletrônico 10, em que um nucleotídeo 32 de um dos nucleotídeos marcados se associa ao polimerase 38 e um fio de comutação específico para o nucleotídeo 28 de um dos nucleotídeos marcados 30 se associa a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22 (número de referência 104); e em resposta à associação no espaço 22, a detecção de uma resposta do sensor eletrônico 10. A Fig. 5 também será referenciada através da discussão do método 100.

[0096] Tal como mostrado na Fig. 5, a cadeia de polinucleotídeo modelo 48 introduzida no sensor 10 pode ser mantida no lugar pela polimerase 38, a qual está ligada ao sensor 10 ou a uma superfície do substrato que suporta o sensor 10. A cadeia de polinucleotídeo modelo 48 mostrada na Fig. 5 é um fio de DNA modelo. A cadeia de polinucleotídeo modelo 48 pode ser introduzida em uma solução biologicamente estável, junto com os reagentes, tal como os nucleotídeos marcados 30. A solução biologicamente estável pode ser qualquer tampão adequado para as reações de incorporação de base de polimerase, tal como reação em cadeia de polimerase (PCR) ou amplificação linear. Como um exemplo, a solução biologicamente estável pode incluir um tampão apresentando um pH próximo de 7, uma concentração de

sal acima de muitos milimolares e íons Mg^{2+} em concentração milimolar.

[0097] Também tal como mostrado na Fig. 5, o nucleotídeo marcado 30 pode incluir uma base que é complementar a um ácido nucleico alvo da cadeia de polinucleotídeo modelo 48. O nucleotídeo marcado 30 será mantido no lugar, em parte, pela polimerase 38 que também está ligada à cadeia de polinucleotídeo modelo 48.

[0098] A interação entre o nucleotídeo marcado 30 e a polimerase 38 e o comprimento da molécula ligante 34 permite que o fio de comutação 28 se associe com o espaço 22 do sensor 10. Em um exemplo, a associação do fio de comutação 28 com o espaço 22 envolve a hibridização de pelo menos uma porção do fio de comutação 28 com as bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. A hibridização que ocorre irá depender, em parte, do fio de comutação 28 (por exemplo, 28A, 28B, 28C, 28D) que é usado. A temperatura e/ou concentração de íon da solução pode ser ajustada a fim de iniciar ou promover a hibridização ou anelamento completo ou parcial do fio de comutação 28 para pelo menos alguma das bases de nucleotídeos 24 expostas no espaço 22. Como um exemplo, o fio de comutação 28 pode ser desenhado para hibridizar parcialmente ou completamente no espaço 22 em temperatura ambiente (por exemplo, de cerca de 18°C a cerca de 22°C) e em uma solução que apresenta uma concentração de sal de 50 mM.

[0099] A polimerase 38 irá manter o fio de comutação 28 em proximidade do espaço 22, assim, permitindo que diversos eventos de hibridização e de-hibridização

ocorram. Por outro lado, uma fita aleatória à deriva irá provavelmente se hibridizar uma vez e, então, afastar-se. O fio de comutação 28 pode ser mantido em proximidade do espaço 22 até que seja dissociado, por exemplo, utilizando fusão ou outra técnica adequada. Em alguns casos, a associação do fio de comutação no espaço 22 pode ser de dezenas de milissegundos ou mais longas. Esta interação relativamente longa coloca o trocador "LIGADO" (por exemplo, modula o canal 16 pelo aumento da condutância do estado mais baixo) e a mudança na condutividade pode ser detectada. Esta interação relativamente longa é diferente dos outros nucleotídeos marcados 30 presentes na solução (isto é, a fita aleatória à deriva), que podem difundir-se e brevemente tocar, mas não sofrer vários eventos pelo menos parciais de hibridização e des-hibridização no sensor 10. A breve interação destes outros nucleotídeos marcados 30 pode causar uma mudança de condutividade curta e/ou esporádica e, então, é distinguível da mudança de condutividade que resulta do fio de comutação 28 sendo mantido em proximidade do espaço 22.

[00100] Quando o fio de comutação 28 hibridiza e de-hibridiza pelo menos parcialmente diversas vezes as bases de nucleotídeos 24 expostas, a resposta do sensor 10 pode ser indicativa da base do nucleotídeo marcado 30 porque o fio de comutação 28 é específico para o nucleotídeo (isto é, um fio de comutação 28 específico é selecionado para uma base específica). Como tal, o método 100 pode também envolver a associação da resposta do sensor 10 com o fio de comutação específico para o nucleotídeo associado 28 (isto

é, o nucleotídeo marcado 30 que apresenta a polimerase 38 e o espaço 22 associados ao mesmo), e com base no fio de comutação específico para o nucleotídeo 28, a identificação do nucleotídeo (por exemplo, a base) do nucleotídeo marcado 30 associado (isto é, o nucleotídeo marcado 30 que apresenta a polimerase 38 e o espaço 22 associados ao mesmo).

[00101] A base do nucleotídeo marcado associado 30 será incorporada em uma fita nascente 50 que é hibridizada à cadeia de polinucleotídeo modelo 48. Isto irá, por sua vez, quebrar a ligação entre os grupos fosfato do nucleotídeo marcado 30 e a base de nucleotídeo recentemente incorporada. Esta cliva o restante do nucleotídeo marcado 30 da base de nucleotídeo recentemente incorporada.

[00102] Uma vez que o fio de comutação 28 pode preferir ser pelo menos parcialmente hibridizado e ficar conectado na configuração de dupla hélice do dsNA modificado 16', o método 100 pode ainda envolver o aquecimento para dissociar o fio de comutação específico para o nucleotídeo 28 do espaço 22. A temperatura de fusão do fio de comutação 28 pode ser ajustada quando a síntese do nucleotídeo marcado 30 para tornar o tempo "LIGADO" mais curto ou mais longo, dependendo, em parte, em quanto tempo a polimerase 38 mantém o nucleotídeo 32 do nucleotídeo marcado 30. Em um exemplo, a temperatura de fusão pode ser ajustada para corresponder à temperatura na qual o sistema sensorial 40, 40' é operado quando a ligação entre o(s) grupo(s) fosfato(s) do nucleotídeo marcado 30 e a base de nucleotídeo recentemente incorporada. Isto causaria a

dissociação do fio de comutação 28 dentro do mesmo intervalo de tempo que de quando o nucleotídeo marcado 30 é clivado. Em outro exemplo, pode ser desejável que o tempo "DESLIGADO" do fio de comutação 28 seja muito mais curto do que o tempo que o nucleotídeo marcado 30 é mantido pela polimerase 28 durante a incorporação na fita nascente 50. Isto pode minimizar os eventos de fundo dos fios de comutação 28 que não estão associados à polimerase 28.

[00103] Como um resultado da clivagem e dissociação, o nucleotídeo marcado 30 remanescente está livre para se dissociar do nucleotídeo base e se difundir do sensor 10. A clivagem e dissociação modula novamente o canal 16, pelo retorno da condutividade do sensor 10 para o estado inicial (por exemplo, menor) de condutividade que ele estava antes da associação do nucleotídeo marcado 30 com a polimerase 38 e com o espaço 22. O aparecimento e desaparecimento do sinal como a mudança da condutividade do sensor 10 (por exemplo, aumenta e retorna ao estado inferior), respectivamente, pode estar correlacionada com a incorporação de uma base de nucleotídeo da fita nascente 50 da fita de nucleotídeo modelo 48 e a subsequente dissociação do nucleotídeo marcado 30.

[00104] No exemplo de método 100, a associação do um dos nucleotídeos marcados 30 (com a polimerase 32 e o espaço 22), a detecção, a associação da resposta e a identificação conjunta podem ser usadas para a detecção de uma única molécula de um evento de incorporação de polimerase (isto é, cujo nucleotídeo tenha sido incorporado em uma fita nascente 50).

[00105] Deve ser apreciado que todas as combinações dos conceitos anteriores e conceitos adicionais discutidos em maiores detalhes abaixo (desde que tais conceitos não sejam mutuamente inconsistentes) sejam contemplados como sendo parte da matéria objeto inventiva aqui descrita. Em particular, todas as combinações da matéria objeto reivindicada que aparecem no final desta divulgação são contempladas como parte da matéria objeto inventiva aqui descrita. Também deve ser apreciado que a terminologia explicitamente empregada aqui, que também pode aparecer em qualquer divulgação incorporada por referência, deve receber um significado mais consistente com os conceitos particulares aqui descritos.

[00106] Referência ao longo do relatório descritivo a "um exemplo", "outro exemplo", "o exemplo" e assim por diante, significa que um elemento particular (por exemplo, aspecto, estrutura e/ou característica) descrito em conexão com o exemplo está incluído em pelo menos um exemplo aqui descrito e pode ou não estar presente em outros exemplos. Em adição, deve ser entendido que os elementos descritos para qualquer exemplo podem ser combinados de qualquer maneira adequada nos diversos exemplos a menos que o contexto claramente indique o contrário.

[00107] Os termos "substancialmente" e "cerca de" usados ao longo desta divulgação, incluindo nas reivindicações, são utilizados para descrever e quantificar pequenas flutuações, tal como devido a variações no processamento. Por exemplo, eles podem ser de menos do que ou igual a $\pm 5\%$, tal como menos do que ou igual a $\pm 2\%$, tal

como menos do que ou igual a $\pm 1\%$, tal como menos do que ou igual a $\pm 0,5\%$, tal como menos do que ou igual a $\pm 0,2\%$, tal como menos do que ou igual a $\pm 0,1\%$, tal como menos do que ou igual a $\pm 0,05\%$.

[00108] Além disso, deve ser entendido que as faixas aqui fornecidas incluem a faixa indicada e qualquer valor ou subfaixa dentro da faixa indicada, como se elas fossem explicitamente recitadas. Por exemplo, uma faixa representada por cerca de 10 nm a cerca de 50 nm, deve ser interpretada por incluir não apenas os limites explicitamente recitados de cerca de 10 nm a cerca de 50 nm, porém também devem incluir os valores individuais, tal como cerca de 15 nm, 22,5 nm, 45 nm etc., e subfaixas, tal como de cerca de 20 nm a cerca de 48 nm, etc.

[00109] Enquanto diversos exemplos foram descritos em detalhes, deve ser entendido que os exemplos descritos podem ser modificados. Sendo assim, a descrição acima deve ser considerada não limitativa.

REIVINDICAÇÕES

1. Sensor **caracterizado pelo** fato de compreender: dois eletrodos que apresentam um espaço entre os mesmos; e

um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos, o canal condutor eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo:

duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si;

um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos estão faltando; e

uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

2. Sensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de o espaço apresentar um comprimento que varia de cerca de 10 nm a cerca de 50 nm.

3. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender uma polimerase ligada ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado.

4. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de:

i) os ligantes ligarem, respectivamente, cada extremidade da primeira das cadeias de polinucleotídeos ao

respectivo um dos dois eletrodos; ou

ii) os ligantes ligarem, respectivamente, cada extremidade da segunda das cadeias de polinucleotídeos ao respectivo um dos dois eletrodos; ou

iii) ambos i e ii.

5. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de pelo menos uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço ser uma base guanina.

6. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de cada uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço ser uma base guanina.

7. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender um detector para detectar uma resposta a partir do polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado quando um fio de comutação, incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço, associa-se a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos no espaço.

8. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender:

um substrato que suporta os dois eletrodos; e
uma polimerase ligada ao substrato.

9. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo** fato de ainda

compreender um sistema fluídico para introduzir um reagente no polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado.

10. Sensor, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo** fato de o reagente incluir nucleotídeos marcados, pelo menos um dos nucleotídeos marcados incluindo:

um nucleotídeo;

uma molécula ligante ligada a um grupo fosfato do nucleotídeo; e

um fio de comutação ligado à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

11. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender uma pluralidade de outros canais condutores eletricamente moduláveis ligados aos dois eletrodos, cada um dos outros canais condutores eletricamente moduláveis incluindo um respectivo polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos.

12. Sensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo** fato de o canal condutor eletricamente modulável exibir:

uma primeira condutância quando a pluralidade de bases de nucleotídeos são expostas no espaço; e

uma segunda condutância que é diferente da primeira

condutância quando pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos no espaço estão associadas às bases de nucleotídeos complementares.

13. Nucleotídeo marcado **caracterizado pelo** fato de compreender:

um nucleotídeo;

uma molécula ligante ligada a um grupo fosfato do nucleotídeo; e

um fio de comutação ligado à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço do sensor conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

14. Kit **caracterizado pelo** fato de compreender:

um componente eletrônico, incluindo:

um suporte; e

dois eletrodos operativamente dispostos no suporte e separados por um espaço; e

uma solução polimérica, incluindo:

um carreador líquido; e

um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado no carreador líquido, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo:

duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si e apresentando extremidades opostas;

um ligante ligado a cada uma das extremidades opostas, cada ligante para ligar-se ao respectivo um dos dois eletrodos;

um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos estão faltando; e

uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos;

o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado para formar um canal condutor eletricamente modulável no espaço entre os dois eletrodos quando cada ligante se liga ao respectivo um dos dois eletrodos.

15. Kit, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender uma solução de reagente incluindo nucleotídeos marcados, pelo menos um dos nucleotídeos marcados incluindo:

um nucleotídeo;

uma molécula ligante ligada a um grupo fosfato do nucleotídeo; e

um fio de comutação ligada à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

16. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de as bases no fio de comutação serem completamente complementares à pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

17. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de o fio de comutação ainda incluir pelo menos um nucleotídeo apresentando uma base incompatível que é não complementar a correspondente uma da

da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

18. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresentar pelo menos um nucleotídeo a menos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

19. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresentar um número mais alto de nucleotídeos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço e em que uma porção do fio de comutação forma uma haste e alça quando associada ao espaço.

20. Kit, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado pelo** fato de:

o fio de nucleotídeos no fio de comutação apresentar um número mais alto de nucleotídeos do que a pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço;

uma porção do fio de comutação formar uma haste e alça quando associada ao espaço; e

uma outra porção do fio de comutação ser completamente complementar à pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço ou incluir pelo menos um nucleotídeo apresentando uma base incompatível que é não complementar a correspondente uma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

21. Sistema sensorial **caracterizado pelo** fato de compreender:

uma célula de fluxo; e

um sensor eletrônico integrado na célula de fluxo, o

sensor eletrônico incluindo:

dois eletrodos que apresentam um espaço entre os mesmos;

um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos, o canal condutor eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos, o polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado incluindo:

duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si;

um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos estão faltando; e

uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

22. Sistema sensorial, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender um sistema de distribuição de reagentes para introduzir seletivamente um reagente a uma entrada da célula de fluxo.

23. Sistema sensorial, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado pelo** fato de o reagente estar em um recipiente de amostra e o reagente incluir nucleotídeos marcados, pelo menos um dos nucleotídeos marcados incluindo:

um nucleotídeo;

uma molécula ligante ligada a um grupo fosfato do nucleotídeo; e

um fio de comutação ligado à molécula ligante, o fio de comutação incluindo um fio de nucleotídeos incluindo bases complementares a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço.

24. Sistema sensorial, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender um detector para detectar uma resposta a partir do sensor eletrônico.

25. Sistema sensorial, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender uma polimerase ancorada ao polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado ou um suporte do sensor eletrônico.

26. Método **caracterizado pelo** fato de compreender:

introdução de uma cadeia de polinucleotídeo modelo a um sensor eletrônico apresentando uma polimerase presa a i) um canal condutor eletricamente modulável que faz a ponte entre um espaço entre, e está eletricamente conectada a dois eletrodos ou ii) um substrato que suporta os dois eletrodos, o canal condutor eletricamente modulável incluindo um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, o qual inclui:

duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si;

um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que os nucleotídeos estão faltando; e

uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos;

introdução dos reagentes incluindo nucleotídeos marcados ao sensor eletrônico, em que um nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados associa-se à polimerase e um fio de comutação específico para o nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados associa-se a pelo menos alguma da pluralidade de bases de nucleotídeos expostas no espaço; e

em resposta à associação no espaço, a detecção de uma resposta do sensor eletrônico.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender:

a associação da resposta do sensor eletrônico com o fio de comutação específico para o nucleotídeo associado; e

com base no fio de comutação específico para o nucleotídeo associado, a identificação do nucleotídeo de um dos nucleotídeos marcados.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26 ou 27, **caracterizado pelo** fato de ainda compreender o aquecimento para disassociar o fio de comutação específico para o nucleotídeo do espaço.

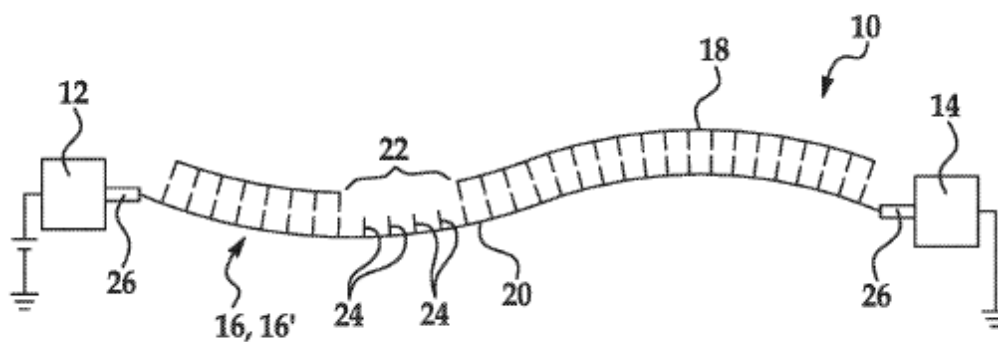


FIG. 1A

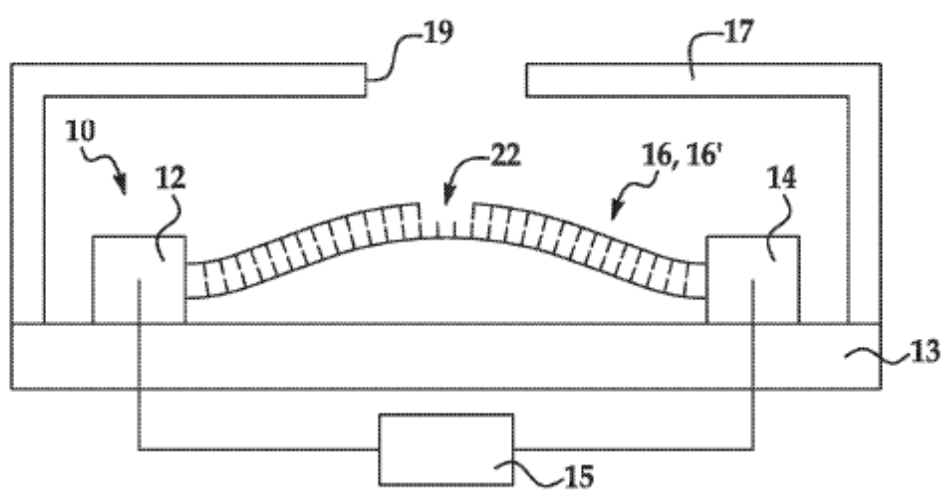


FIG. 1B

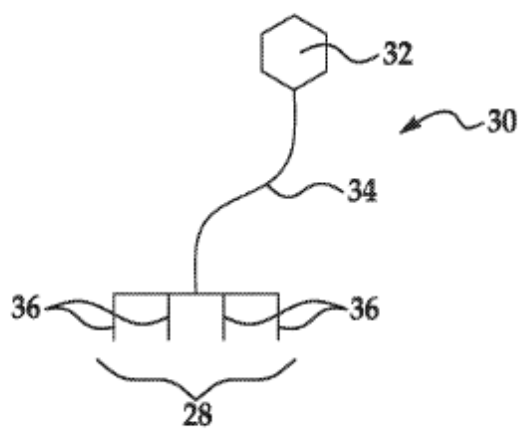


FIG. 2

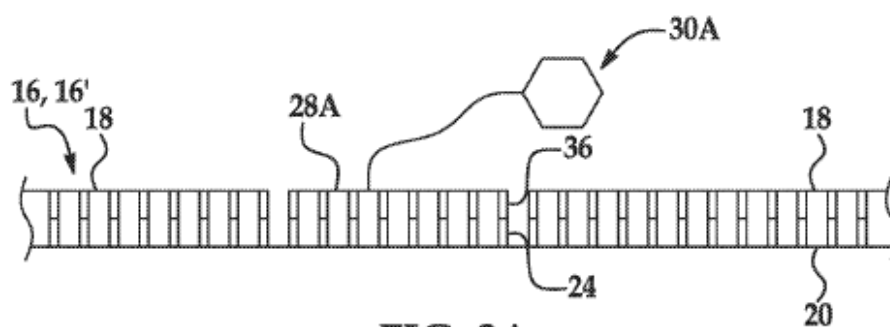


FIG. 3A

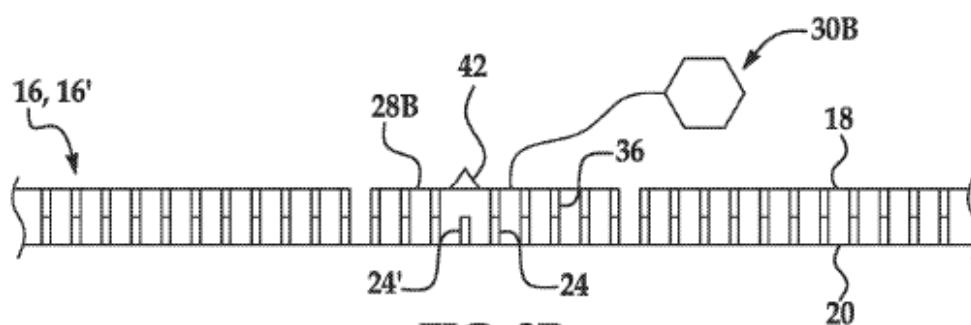


FIG. 3B

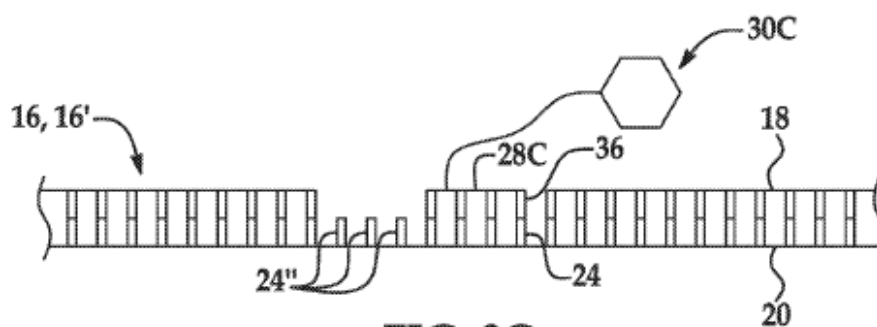


FIG. 3C

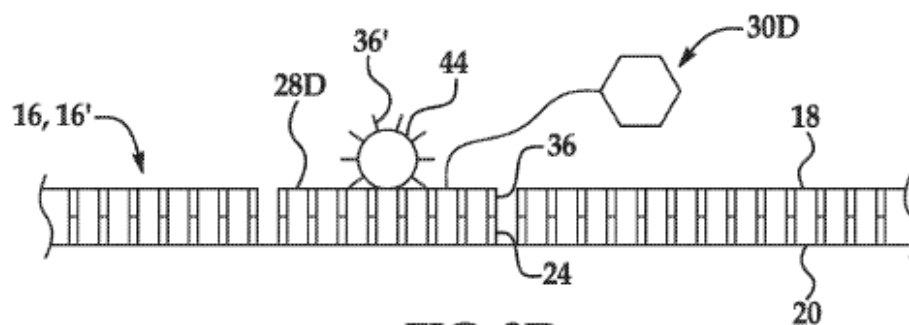


FIG. 3D

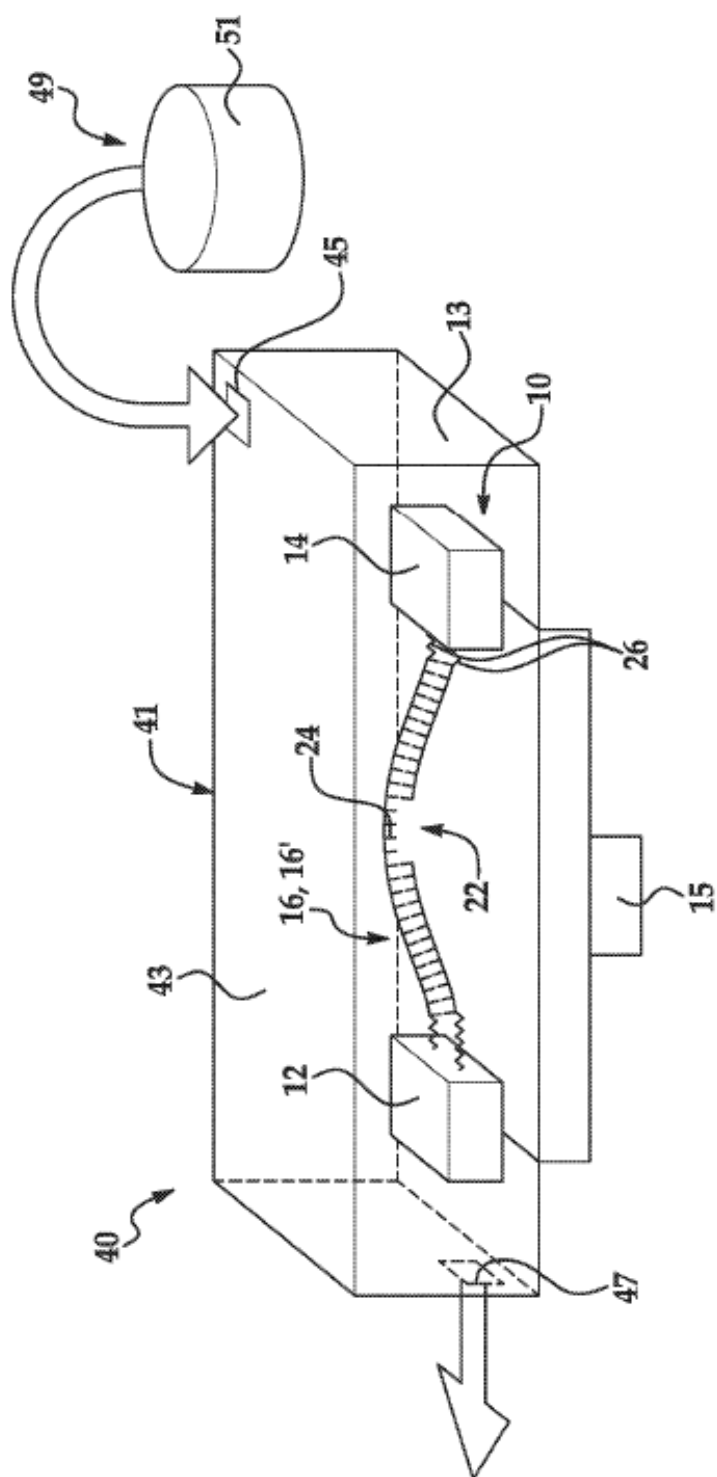


FIG. 4

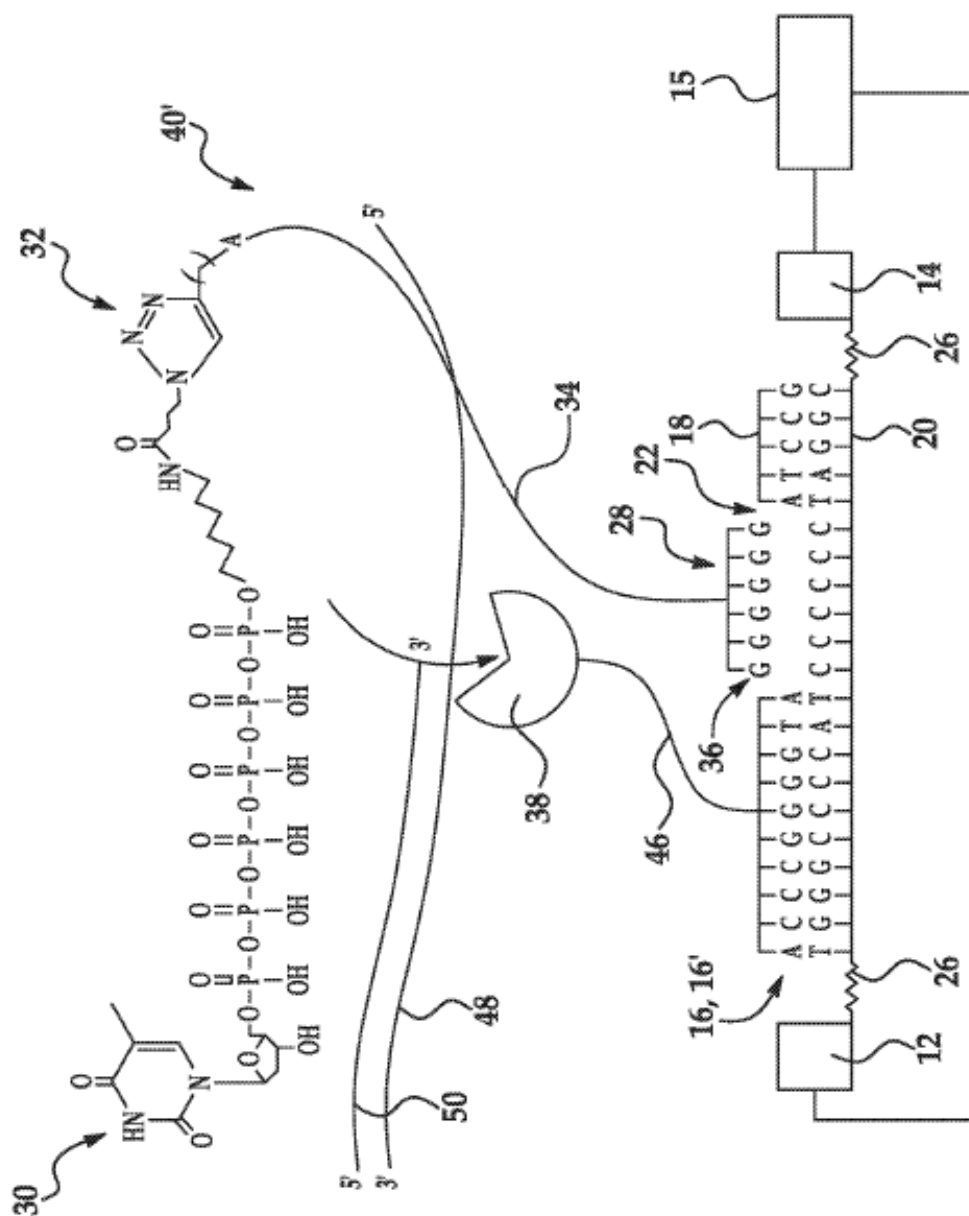


FIG. 5

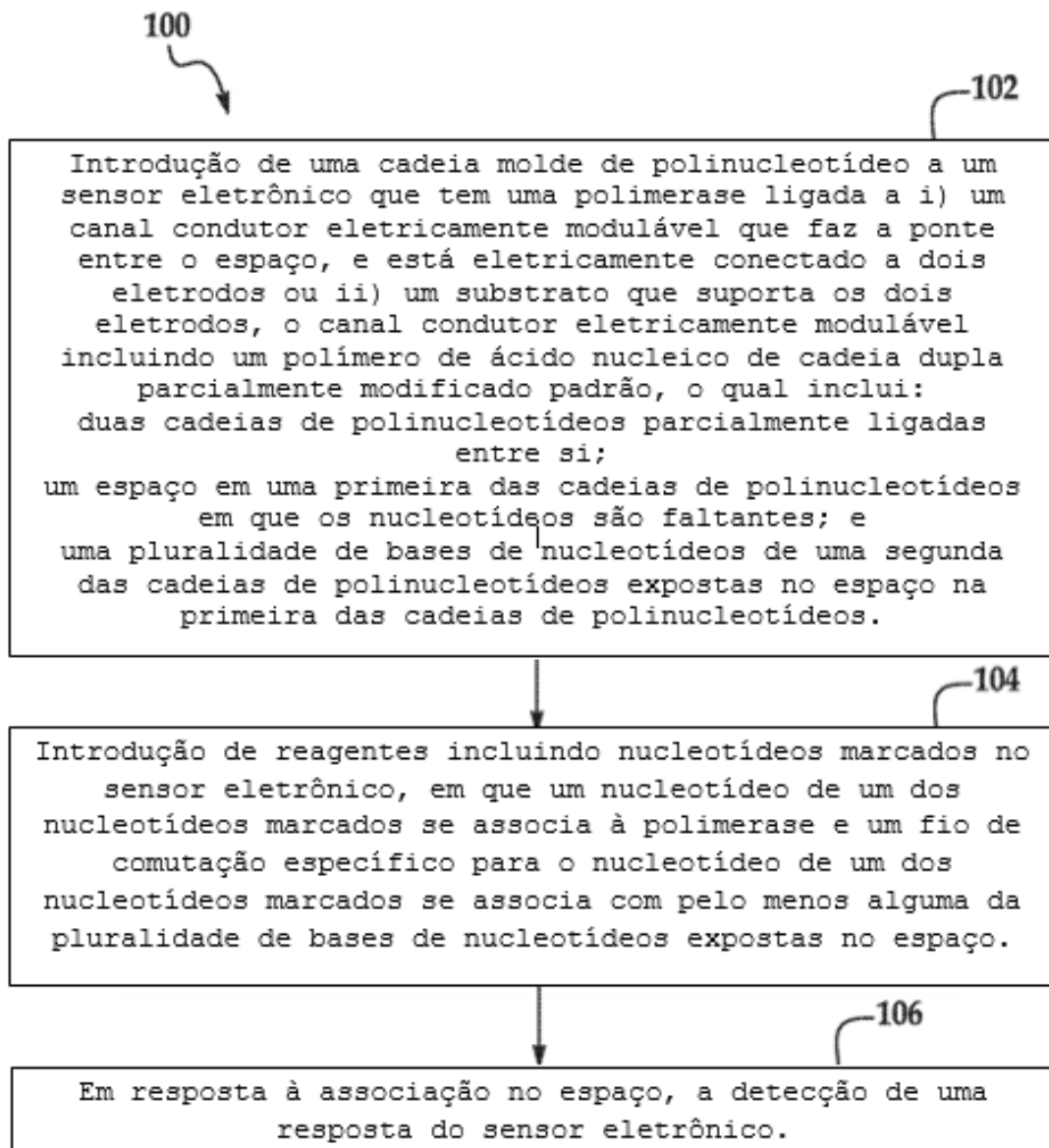


FIG. 6

Resumo**SENSOR E SISTEMA SENSORIAL**

Um sensor inclui dois eletrodos e um canal condutor eletricamente modulável ligado aos dois eletrodos. O canal condutor eletricamente modulável inclui um polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado, eletricamente conectado aos dois eletrodos e fazendo a ponte entre o espaço entre os dois eletrodos. O polímero de ácido nucleico de cadeia dupla parcialmente modificado inclui duas cadeias de polinucleotídeos parcialmente ligadas entre si, um espaço em uma primeira das cadeias de polinucleotídeos em que as bases de nucleotídeos estão faltando e uma pluralidade de bases de nucleotídeos de uma segunda das cadeias de polinucleotídeos expostas no espaço na primeira das cadeias de polinucleotídeos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



8B6AFF9C3394E49A

Campo 2



51BDC7D5AE875C7F

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: IP-1687-PCT_sequence_listing_ST25.txt
- Data de Geração do Código: 25-12-2019
- Hora de Geração do Código: 22:06:36
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8B6AFF9C3394E49A
 - Campo 2: 51BDC7D5AE875C7F