

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 868 195**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6869 (2008.01)
G01R 33/09 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/6874 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2016** **PCT/US2016/046888**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017** **WO17030999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2016** **E 16757119 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021** **EP 3334839**

54 Título: **Sistemas y métodos que utilizan sensores magnéticamente sensibles para determinar una característica genética**

30 Prioridad:

14.08.2015 US 201562205336 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MANDELL, JEFFREY G. y
KWOK, LISA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 868 195 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistemas y métodos que utilizan sensores magnéticamente sensibles para determinar una característica genética

5 **Antecedentes**

Los sistemas current next generation sequencing (sistemas actuales de secuenciación de próxima generación - NGS) basados en sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS) son complejos, costosos y voluminosos. Por lo tanto, son deseables nuevos enfoques de detección para los instrumentos de SBS. Los métodos y sistemas generales que utilizan la detección de magnetorresistencia para la secuenciación de ADN de una sola molécula en tiempo real, se describen en US-2009/208957. Un método de secuenciación que utiliza detección de nanoporos magnéticos se describe en US-8.252.910.

15 **Breve descripción**

Se proporciona un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS) según las reivindicaciones. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de cada cadena molde. Al menos algunos de los nucleótidos están unidos a partículas magnéticas correspondientes que tienen sus respectivas propiedades magnéticas. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las respectivas propiedades magnéticas de las partículas magnéticas. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye proporcionar una pluralidad de reactivos a los espacios designados. Los reactivos incluyen nucleótidos y polimerasa, en donde al menos uno de los nucleótidos o la polimerasa tiene partículas magnéticas unidas a los mismos. El método también incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles durante una pluralidad de eventos de SBS, en donde cada evento de SBS incluye hacer crecer una cadena complementaria incorporando uno de los nucleótidos en la cadena complementaria. Los cambios en la resistencia eléctrica se producen cuando las partículas magnéticas se colocan dentro de los espacios designados correspondientes durante la pluralidad de eventos de SBS. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a los espacios designados y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias; (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, siendo capturadas las partículas magnéticas por los nucleótidos; (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, siendo causados los cambios por las propiedades magnéticas de las partículas magnéticas; y (d) eliminar las partículas magnéticas de los espacios designados. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a los espacios designados y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias. Los nucleótidos incluyen al menos un primer, segundo y tercer nucleótidos. El primer, segundo y tercer nucleótidos tienen diferentes bases. Cada ciclo de SBS también incluye (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, en donde las partículas magnéticas son capturadas por los primeros nucleótidos y por los segundos nucleótidos, y (c) detectar

cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada ciclo de SBS también incluye (d) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos; (e) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, en donde las partículas magnéticas son capturadas por los terceros nucleótidos; y (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias. El primer y segundo nucleótidos tienen bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen partículas magnéticas unidas a los mismos. Cada ciclo de SBS también incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde las partículas magnéticas capturadas por los primeros nucleótidos causan un cambio diferente en la resistencia eléctrica que las partículas magnéticas capturadas por los segundos nucleótidos. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias. El primer y segundo nucleótidos tienen bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen un primer y segundo single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM), respectivamente, unidos a los mismos. Cada uno de los primeros y segundos SMM tiene diferentes estados magnéticos que son sensibles a diferentes frecuencias de luz. Cada ciclo de SBS también incluye (b) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una primera frecuencia de luz y (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde los cambios son causados por el estado magnético de los primeros SMM. Cada ciclo de SBS incluye (d) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una segunda frecuencia de luz; (e) alterar el estado magnético de los segundos SMM aplicando una tercera frecuencia de luz; y (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde los cambios son causados por el estado magnético de los segundos SMM. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias. El primer y segundo nucleótidos tienen bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM) unidos a los mismos. El primer y el segundo nucleótido tienen un número diferente de SMM unidos a los mismos. Los SMM tienen estados magnéticos que son sensibles a diferentes frecuencias de luz. Cada ciclo de SBS también incluye (b) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una primera frecuencia de luz; (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles; y (d) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una segunda frecuencia de luz. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria añadiendo nucleótidos a lo largo de cada cadena molde usando polimerasa. La polimerasa tiene las correspondientes partículas magnéticas unidas a la misma que presentan sus respectivas propiedades magnéticas, en donde cada evento de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Los cambios detectados son causados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade los nucleótidos. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye (a) administrar un primer nucleótido y polimerasa a los espacios designados. La polimerasa tiene partículas magnéticas unidas a la misma. Cada ciclo de SBS también incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Los cambios en la resistencia eléctrica son causados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade el primer nucleótido a la cadena complementaria. Cada ciclo de SBS incluye (c) administrar un segundo nucleótido y polimerasa a los espacios designados. La polimerasa tiene partículas magnéticas unidas a la misma. Cada ciclo de SBS también incluye (d) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Los cambios en la resistencia eléctrica son causados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la correspondiente polimerasa añade el segundo nucleótido a la cadena complementaria. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, se proporciona un método de SBS. El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y un segundo nucleótido y polimerasa a los espacios designados. El primer y el segundo nucleótido tienen diferentes bases. La polimerasa tiene partículas magnéticas unidas a la misma. Cada evento de SBS también incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Los cambios en la resistencia eléctrica son causados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade el primer nucleótido o el segundo nucleótido a la cadena complementaria. El primer y el segundo nucleótidos tienen diferentes tasas de incorporación. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

Se proporciona un sistema de SBS según las reivindicaciones. El sistema incluye un aparato de detección que tiene una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye al menos dos capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa las dos capas ferromagnéticas. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles forma al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR). Los sensores magnéticamente sensibles se colocan junto a los espacios designados correspondientes dentro de una cámara y se configuran para detectar partículas magnéticas de los espacios designados correspondientes. El sistema también incluye un circuito de lectura que está acoplado comunicativamente a los sensores magnéticamente sensibles. El circuito de lectura está configurado para transmitir señales que corresponden a las resistencias eléctricas de los sensores magnéticamente sensibles. El aparato de detección también incluye un sistema de control de fluidos que está configurado para hacer fluir reactivos a través de la cámara para realizar un protocolo de SBS. Los reactivos incluyen una pluralidad de tipos de nucleótidos, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir las señales después de cada evento de incorporación.

En una realización, un aparato de detección que tiene una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye al menos dos capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa las dos capas ferromagnéticas. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles forma al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR). Los sensores magnéticamente sensibles se colocan junto a los espacios designados correspondientes dentro de una cámara y se configuran para detectar partículas magnéticas de los espacios designados correspondientes. El aparato de detección puede incluir un circuito de lectura que está acoplado comunicativamente a los sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, un sistema SBS incluye un cabezal de lectura que incluye un brazo y un sensor magnéticamente sensible unido al brazo. El sensor magnéticamente sensible incluye al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR). El sensor magnéticamente sensible está configurado para detectar partículas magnéticas. El sistema también incluye un sustrato de muestra que tiene una superficie del sustrato. La superficie del sustrato está configurada para tener una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados a lo largo de la superficie del sustrato, en donde al menos uno del cabezal de lectura y el sustrato de la muestra está configurado para moverse con respecto al otro para colocar el sensor magnéticamente sensible

próximo a los espacios designados en una relación operativa. El sistema también incluye un circuito de lectura que está acoplado comunicativamente al sensor magnéticamente sensible. El circuito de lectura está configurado para transmitir señales que corresponden a una resistencia eléctrica del sensor magnéticamente sensible cuando se coloca en uno de los espacios designados.

5 En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un cabezal de lectura que tiene un brazo y un sensor magnéticamente sensible unido al brazo. El sensor magnéticamente sensible incluye al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR). El sensor magnéticamente sensible está configurado para detectar partículas magnéticas. El método incluye proporcionar un sustrato de muestra que tiene una pluralidad de cadenas molde ubicadas en espacios designados a lo largo de una superficie del sustrato. El método también incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias incorporando nucleótidos a lo largo de cada una de las cadenas molde. Al menos algunos de los nucleótidos están marcados con las correspondientes partículas magnéticas que presentan respectivas propiedades magnéticas. Para cada uno de los ciclos de SBS, el método incluye colocar el sensor magnéticamente sensible adyacente a los espacios designados a lo largo de la superficie del sustrato y detectar una resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

20 En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que tiene una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye polimerasa inmovilizada en las áreas designadas. La polimerasa está configurada para capturar una cadena molde correspondiente. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de una cadena molde correspondiente. Los nucleótidos están unidos a partículas magnéticas correspondientes que tienen sus respectivas propiedades magnéticas. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las respectivas propiedades magnéticas de las partículas magnéticas a medida que los nucleótidos se añaden a la cadena complementaria. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

35 En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que tiene una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye polimerasa inmovilizada en las áreas designadas. La polimerasa está configurada para unirse a cadenas molde correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar nucleótidos en las áreas designadas y permitir que los nucleótidos se añadan en las cadenas complementarias. Cada evento de SBS también incluye (b) administrar partículas magnéticas en las áreas designadas. Las partículas magnéticas son capturadas por los nucleótidos. Las partículas magnéticas proporcionan un campo magnético externo correspondiente. Cada evento de SBS también incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles y (d) eliminar las partículas magnéticas de las áreas designadas. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

45 En una realización, se proporciona un método de SBS que incluye proporcionar un aparato de detección que tiene una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles está ubicado cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética del mismo. El aparato de detección también incluye polimerasa inmovilizada en las áreas designadas. La polimerasa está configurada para unirse a cadenas molde correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar nucleótidos en las áreas designadas y permitir que los nucleótidos se añadan en las cadenas complementarias. Los nucleótidos incluyen al menos un primer, segundo y tercer nucleótidos. El primer, segundo y tercer nucleótidos tienen diferentes bases. Cada evento de SBS también incluye (b) administrar partículas magnéticas a las áreas designadas, siendo capturadas las partículas magnéticas por los primeros nucleótidos y por los segundos nucleótidos. Cada evento de SBS también incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles; (d) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos; (e) administrar partículas magnéticas a las áreas designadas, siendo las partículas magnéticas de los terceros nucleótidos; y (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

65 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas

- molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método también incluye llevar a cabo una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de cada cadena molde, estando al menos algunos de los nucleótidos unidos a las correspondientes partículas magnéticas que tienen sus respectivas propiedades magnéticas, donde cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las respectivas propiedades magnéticas de las partículas magnéticas. El método también incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.
- 5
- 10 En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en el flujo de corriente a través de las capas conductoras de los sensores GMR.
- 15 En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en una corriente de electrones de túnel a través de capas aislantes de los sensores de TMR.
- 20 Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye una primera y una segunda capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa la primera y la segunda capa ferromagnética.
- 25 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.
- 30 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.
- 35 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar las magnitudes de los cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles.
- 40 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un número diferente de partículas magnéticas unidas a los mismos que otros tipos de nucleótidos.
- 45 En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).
- 50 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un tipo diferente de partícula magnética unida a los mismos que otros tipos de nucleótidos.
- 55 En una realización, las partículas magnéticas tienen diferentes intensidades de campo magnético.
- 60 En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.
- 65 En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.
- En una realización, la realización de una pluralidad de ciclos de SBS incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye administrar múltiples tipos de nucleótidos, administrándose cada tipo de nucleótido en un momento distinto.
- En una realización, la realización de una pluralidad de ciclos de SBS incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye administrar múltiples tipos de manera simultánea.
- En una realización, realizar una pluralidad de ciclos de SBS incluye realizar una pluralidad de ciclos de SBS, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye administrar las partículas magnéticas a los nucleótidos correspondientes después de que los nucleótidos correspondientes se hayan añadido a la cadena complementaria.
- En una realización, las partículas magnéticas tienen un enlace reversible.

En una realización, el enlace reversible incluye biotina, destiobiotina, avidina, neutravidina, estreptavidina, aldehído, hidrazida, un oligonucleótido complementario o análogo de ácido nucleico.

5 En una realización, las partículas magnéticas tienen un enlace no reversible.

En una realización, las partículas magnéticas tienen enlaces fotoescindibles.

En una realización, las partículas magnéticas tienen enlaces fotorreversibles.

10 En una realización, las partículas magnéticas tienen enlaces fotoactivables.

En una realización, las partículas magnéticas tienen un enlace escindible.

15 En una realización, las partículas magnéticas están configuradas para unirse temporalmente al nucleótido correspondiente.

En una realización, una o más de las partículas magnéticas están unidas al gamma fosfato del nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el nucleótido a la cadena complementaria.

20 En una realización, cada espacio designado incluye un grupo de cadenas molde que están inmovilizadas en una superficie de sustrato del aparato de detección.

En una realización, cada espacio designado incluye una única cadena molde que está inmovilizada en una superficie de sustrato del aparato de detección.

25 En una realización, los nucleótidos tienen marcadores de biotina.

En una realización, las partículas magnéticas son nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, formando los nucleótidos y las partículas magnéticas un complejo de biotin/streptavidin magnetic nanoparticle (nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina - BSMN).

30 En una realización, el aparato de detección incluye una celda de flujo que define una cámara que tiene los espacios designados, administrándose los nucleótidos y las partículas magnéticas a los espacios designados haciendo fluir los nucleótidos y las partículas magnéticas a través de la cámara de la celda de flujo.

35 En una realización, el aparato de detección define una cámara que incluye los espacios designados, teniendo el aparato de detección electrodos que se colocan a lo largo de la cámara, donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye ejecutar operaciones de gotitas usando los electrodos.

40 En una realización, la pluralidad de eventos de SBS se llevan a cabo mediante reacciones de un solo recipiente.

45 En una realización, las partículas magnéticas cambian permanentemente las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticamente sensibles de modo que las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticos sensibles se mantienen después de que se eliminan las partículas magnéticas, donde el método incluye cambiar la magnetización de al menos algunos de los sensores magnéticamente sensibles después de leer los sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, la lectura de los sensores magnéticamente sensibles se produce después de que se hayan eliminado las partículas magnéticas.

50 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye proporcionar una pluralidad de reactivos a los espacios designados, incluidos los reactivos nucleótidos y polimerasa, donde al menos uno de los nucleótidos o la polimerasa tiene partículas magnéticas unidas al mismo. El método incluye detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles durante una pluralidad de eventos de SBS, donde cada evento de SBS incluye hacer crecer una cadena complementaria incorporando uno de los nucleótidos en la cadena complementaria, produciéndose los cambios en la resistencia eléctrica cuando las partículas se colocan dentro de los correspondientes espacios designados durante la pluralidad de eventos de SBS. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

60 En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen un sensor magnetorresistivo.

65

En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en el flujo de corriente a través de las capas conductoras de los sensores GMR.

5 En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en una corriente de electrones de túnel a través de capas aislantes de los sensores de TMR.

10 En una realización, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye una primera y una segunda capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa la primera y la segunda capa ferromagnética.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

15 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

20 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un número diferente de partículas magnéticas unidas a los mismos que otros tipos de nucleótidos.

En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

25 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un tipo diferente de partícula magnética unida a los mismos que otros tipos de nucleótidos.

En una realización, las partículas magnéticas tienen diferentes intensidades de campo magnético.

30 En una realización, las propiedades magnéticas incluyen al menos una de un campo magnético, una dirección magnética o un momento magnético.

En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.

35 En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.

40 En una realización, cada espacio designado incluye un grupo de cadenas molde que están inmovilizadas en una superficie de sustrato del aparato de detección.

En una realización, cada espacio designado incluye una única cadena molde que está inmovilizada en una superficie de sustrato del aparato de detección.

45 En una realización, cada espacio designado incluye una única molécula de polimerasa inmovilizada en una superficie de sustrato del aparato de detección.

50 En una realización, el aparato de detección incluye una celda de flujo que define una cámara que tiene los espacios designados, administrándose los reactivos a los espacios designados haciendo fluir simultáneamente los reactivos a través de la cámara de la celda de flujo.

En una realización, el aparato de detección define una cámara que incluye los espacios designados, teniendo el aparato de detección electrodos que se colocan a lo largo de la cámara, en donde administrar los reactivos incluye ejecutar operaciones de gotitas usando los electrodos.

55 En una realización, cada nucleótido tiene una o más de las partículas magnéticas unidas al gamma fosfato del nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el nucleótido a la cadena complementaria.

60 En una realización, las partículas magnéticas se unen a la polimerasa, siendo causados los cambios detectados por la presencia de las partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade los nucleótidos.

65 En una realización, cada tipo de nucleótido tiene una tasa de incorporación respectiva que difiere de la tasa de incorporación de otros tipos de nucleótidos.

- En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a los espacios designados y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias. Cada ciclo de SBS incluye (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, siendo capturadas las partículas magnéticas por los nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, siendo causados los cambios por las propiedades magnéticas de las partículas magnéticas. Cada ciclo de SBS incluye (d) eliminar las partículas magnéticas de los espacios designados. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.
- En una realización, (a) - (d) se repiten para múltiples tipos de nucleótidos, administrándose cada tipo de nucleótido por separado a los espacios designados.
- En una realización, la administración de los nucleótidos incluye la administración simultánea de múltiples tipos de nucleótidos y la administración de las partículas magnéticas incluye la administración simultánea de múltiples tipos de las partículas magnéticas, teniendo cada tipo de partículas magnéticas una intensidad de campo magnético correspondiente que es diferente de las intensidades del campo magnético de otros tipos de partículas magnéticas.
- En una realización, cada espacio designado incluye un grupo de cadenas molde que están inmovilizadas en una superficie de sustrato del aparato de detección.
- En una realización, cada espacio designado incluye una única cadena molde que está inmovilizada en una superficie de sustrato del aparato de detección.
- En una realización, los nucleótidos tienen marcadores de biotina.
- En una realización, las partículas magnéticas son nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, formando los nucleótidos y las partículas magnéticas un complejo de biotin/streptavidin magnetic nanoparticle (nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina - BSMN), comprendiendo además el método eliminar el complejo BSMN.
- En una realización, las partículas magnéticas son nanopartículas magnéticas funcionalizadas.
- En una realización, las partículas magnéticas son nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina.
- En una realización, los espacios designados están ubicados dentro de una cámara de una celda de flujo y en donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye hacer fluir los nucleótidos y las partículas magnéticas, respectivamente, a través de la cámara.
- En una realización, el aparato de detección define una cámara que incluye los espacios designados, teniendo el aparato de detección electrodos que se colocan a lo largo de la cámara, en donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye ejecutar operaciones de gotitas usando los electrodos.
- En una realización, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS comprende además detectar un nivel de fondo de resistencia eléctrica después de (d).
- En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de (c).
- En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen un sensor magnetorresistivo.
- En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante -GMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en el flujo de corriente a través de las capas conductoras de los sensores GMR.
- En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en una corriente de electrones de túnel a través de capas aislantes de los sensores de TMR.
- En una realización, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye una primera y una segunda capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa la primera y la segunda capa ferromagnética.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS.

En una realización, las propiedades magnéticas incluyen al menos una de un campo magnético, una dirección magnética o un momento magnético.

En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.

En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.

En una realización, las partículas magnéticas cambian permanentemente las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticamente sensibles de modo que las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticos sensibles se mantienen después de que se eliminan las partículas magnéticas, en donde los ciclos de SBS incluyen cambiar la magnetización de al menos algunos de los sensores magnéticamente sensibles después de leer los sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, la lectura de los sensores magnéticamente sensibles se produce después de que se hayan eliminado las partículas magnéticas.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a los espacios designados y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias, incluyendo los nucleótidos al menos un primero, segundo y tercer nucleótidos, teniendo el primero, segundo y tercer nucleótidos diferentes bases. Cada ciclo de SBS incluye (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, siendo capturadas las partículas magnéticas por los primeros nucleótidos y por los segundos nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada ciclo de SBS incluye (d) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (e) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, siendo capturadas las partículas magnéticas por los terceros nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, el primer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (c) pero no se detectaba en (f); el segundo nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (c) y se detectaba en (f); y el tercer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (c) pero se detectaba en (f).

En una realización, (a) incluye administrar cuartos nucleótidos y en donde el cuarto nucleótido extiende la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (c) y no se detectó en (f).

En una realización, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS comprende además: (g) eliminar las partículas magnéticas del segundo y tercer nucleótidos.

En una realización, (d) y (e) tienen lugar al mismo tiempo.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS.

- 5 En una realización, las propiedades magnéticas incluyen al menos una de un campo magnético, una dirección magnética o un momento magnético.

En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.

- 10 En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.

- 15 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de (c).

- 20 En una realización, las partículas magnéticas cambian permanentemente las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticamente sensibles de modo que las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticos sensibles se mantienen después de que se eliminan las partículas magnéticas después de (f), en donde los ciclos de SBS incluyen cambiar la magnetización de al menos algunos de los sensores magnéticamente sensibles después de leer los sensores magnéticamente sensibles.

- 25 En una realización, la lectura de los sensores magnéticamente sensibles se produce después de que se hayan eliminado las partículas magnéticas.

- 30 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen partículas magnéticas unidas a los mismos. Cada ciclo de SBS incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, donde las partículas magnéticas capturadas por los primeros nucleótidos causan un cambio diferente en la resistencia eléctrica que las partículas magnéticas capturadas por los segundos nucleótidos. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

- 40 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

- 45 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS.

- 50 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

- 55 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

- 60 En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples ciclos de SBS.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada ciclo de SBS, los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

65

En una realización, el primer y segundo nucleótidos capturan un número diferente de partículas magnéticas, configurado el número diferente de partículas magnéticas para causar cambios de diferente magnitud en la resistencia eléctrica.

5 En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

En una realización, los primeros nucleótidos capturan un primer tipo de partículas magnéticas y los segundos nucleótidos capturan un segundo tipo de partículas magnéticas, configurados el primer y segundo tipo de partículas magnéticas para causar diferentes magnitudes de cambios en la resistencia eléctrica.

10 En una realización, el primer y segundo tipos de partículas magnéticas tienen diferentes materiales paramagnéticos.

En una realización, la administración del primer y segundo nucleótidos en (a) incluye la administración del primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias y, posteriormente, la administración de las partículas magnéticas a los espacios designados, por lo que las partículas magnéticas se unen al primero y al segundo nucleótidos.

15 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada evento de SBS.

20 En una realización, cada uno del primer y segundo nucleótidos tiene una o más de las partículas magnéticas unidas al gamma fosfato del nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el primer nucleótido o el segundo nucleótido a la cadena complementaria.

25 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos diferentes bases, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen un primer y segundo single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM), respectivamente, unidos al mismo, teniendo cada uno de los primeros y segundos SMM diferentes estados magnéticos que son sensibles a diferentes frecuencias de luz. Cada ciclo de SBS incluye (b) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una primera frecuencia de luz. Cada ciclo de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde los cambios son causados por el estado magnético de los primeros SMM. Cada ciclo de SBS incluye (d) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una segunda frecuencia de luz. Cada ciclo de SBS incluye (e) alterar el estado magnético de los segundos SMM aplicando una tercera frecuencia de luz. Cada ciclo de SBS incluye (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde los cambios son causados por el estado magnético de los segundos SMM. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

45 En una realización, cada uno de los ciclos de SBS comprende además alterar el estado magnético de los segundos SMM aplicando una cuarta frecuencia de luz.

En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

50 En una realización, al menos uno de (b)-(d) o (e)-(f) se repite varias veces durante al menos algunos de los ciclos de SBS.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

55 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

60 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

65

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

5 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples ciclos de SBS.

10 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada ciclo de SBS, los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada evento de SBS.

15 En una realización, cada uno del primer y segundo nucleótidos tiene una o más de las partículas magnéticas unidas al gamma fosfato del nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el primer nucleótido o el segundo nucleótido a la cadena complementaria.

20 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, donde el primer y segundo nucleótidos tienen single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM) unidos a los mismos, teniendo el primer y segundo nucleótidos un número diferente de SMM unidos a los mismos, teniendo los SMM estados magnéticos que responden a diferentes frecuencias de luz. Cada ciclo de SBS incluye (b) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una primera frecuencia de luz. Cada ciclo de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada ciclo de SBS incluye (d) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una segunda frecuencia de luz. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

35 En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

En una realización, (b)-(d) se repite varias veces durante al menos algunos de los ciclos de SBS.

40 En una realización, al menos el primer y el segundo nucleótidos incluyen el primer, segundo y tercer nucleótidos que tienen cada uno SMM unidos a los mismos, teniendo el primer, segundo y tercer nucleótidos un número diferente de SMM unidos a los mismos.

45 En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

50 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

60 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

65 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar las magnitudes de los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples ciclos de SBS.

5 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada ciclo de SBS, las magnitudes de los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

10 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes al final de cada ciclo.

En una realización, cada uno del primer y segundo nucleótidos tiene una o más de las partículas magnéticas unidas al gamma fosfato del nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el primer nucleótido o el segundo nucleótido a la cadena complementaria.

15 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye realizar una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria añadiendo nucleótidos a lo largo de cada cadena molde usando polimerasa, teniendo la polimerasa las correspondientes partículas magnéticas unidas a la misma que presentan sus respectivas propiedades magnéticas, en donde cada evento de SBS incluye detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, estando causados los cambios detectados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade los nucleótidos. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

20 En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM), comprendiendo además el método alterar el estado magnético de los SMM utilizando una o más frecuencias de luz.

25 En una realización, la realización de la pluralidad de eventos de SBS incluye: (a) administrar un primer tipo de nucleótidos a los espacios designados y detectar cambios en la resistencia eléctrica asociada con el primer tipo de nucleótidos y (b) administrar un segundo tipo de nucleótidos a los espacios designados y detectar cambios en la resistencia eléctrica asociada con el segundo tipo de nucleótidos.

30 En una realización, la realización de la pluralidad de eventos de SBS incluye la administración simultánea de múltiples tipos de nucleótidos a los espacios designados y la detección de cambios en la resistencia eléctrica, en donde cada tipo de nucleótido tiene una respectiva tasa de incorporación que difiere de la tasa de incorporación de otros tipos de nucleótidos, en donde las secuencias de las cadenas complementarias se basan en la duración de los cambios detectados.

35 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las duraciones de los cambios detectados son aproximadamente iguales a uno de varios valores, siendo el número de valores igual al número de tipos de nucleótidos.

40 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las duraciones de los cambios detectados están dentro de un número de posibles valores del intervalo, siendo el número de posibles valores del intervalo igual al número de tipos de nucleótidos.

45 En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar las duraciones de los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples eventos de SBS.

50 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada evento de SBS, las duraciones de los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

55 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

60 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

En una realización, llevar a cabo la pluralidad de eventos de SBS incluye proporcionar simultáneamente una pluralidad de reactivos a los espacios designados, incluyendo los reactivos nucleótidos y la polimerasa, en donde los eventos de SBS se llevan a cabo mediante reacciones de un solo recipiente.

5 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye (a) administrar un primer nucleótido y polimerasa a los espacios designados, teniendo la polimerasa partículas magnéticas unidas a las mismas. Cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, estando causados los cambios en la resistencia eléctrica por la presencia de las partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade el primer nucleótido a la cadena complementaria. Cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye (c) administrar un segundo nucleótido y polimerasa a los espacios designados, teniendo la polimerasa partículas magnéticas unidas a las mismas. Cada uno de los ciclos de SBS incluye (d) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, estando causados los cambios en la resistencia eléctrica por la presencia de las partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa correspondiente añade el segundo nucleótido a la cadena complementaria. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM), comprendiendo además el método alterar el estado magnético de los SMM utilizando una o más frecuencias de luz.

En una realización, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye además (e) administrar un tercer nucleótido a los espacios designados y polimerasa, teniendo la polimerasa partículas magnéticas unidas a la misma; y (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, estando causados los cambios en la resistencia eléctrica por la presencia de las partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade el tercer nucleótido a la cadena complementaria.

En una realización, cada uno de la pluralidad de ciclos de SBS incluye además la administración de un cuarto nucleótido a los espacios designados y la polimerasa.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes al final de cada ciclo.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos y polimerasa a los espacios designados, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, teniendo la polimerasa partículas magnéticas unidas a la misma. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, estando causados los cambios en la resistencia eléctrica por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade el primer nucleótido o el segundo nucleótido a la cadena complementaria, donde el primer y segundo nucleótidos tienen diferentes tasas de incorporación. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

En una realización, la administración de al menos un primer y segundo nucleótidos incluye la administración de un primer, segundo y tercer nucleótidos que tienen cada uno una base diferente y una tasa de incorporación diferente.

En una realización, la administración de al menos un primer y segundo nucleótidos incluye la administración de un primer, segundo, tercer y cuarto nucleótidos que tienen cada uno una base diferente y una tasa de incorporación diferente.

- 5 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

- 10 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles.

- 15 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes al final de cada ciclo.

- En una realización, llevar a cabo la pluralidad de eventos de SBS incluye proporcionar simultáneamente una pluralidad de reactivos a los espacios designados, incluyendo los reactivos el primer y segundo nucleótidos y la polimerasa, en donde los eventos de SBS se llevan a cabo mediante reacciones de un solo recipiente.

- 20 En una realización, se describe un sistema de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El sistema incluye un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye al menos dos capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa las dos capas ferromagnéticas, formándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles en al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), estando colocados los sensores magnéticamente sensibles adyacentes a los espacios designados correspondientes dentro de una cámara y configurados para detectar partículas magnéticas de los correspondientes espacios designados. El sistema incluye un circuito de lectura acoplado comunicativamente a los sensores magnéticamente sensibles, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir señales que se corresponden con las resistencias eléctricas de los sensores magnéticamente sensibles. El sistema incluye un sistema de control de fluidos configurado para hacer fluir reactivos a través de la cámara para realizar un protocolo de SBS, incluyendo los reactivos una pluralidad de tipos de nucleótidos, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir las señales después de cada evento de incorporación.

- 35 En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores GMR configurados para cambiar entre el primer y el segundo estado, en donde las dos capas ferromagnéticas están acopladas antiferromagnéticamente en el primer estado, de modo que la capa no magnética tiene una primera resistencia eléctrica, y en donde un campo magnético externo impide el acoplamiento antiferromagnético en el segundo estado, de modo que la capa no magnética tiene una segunda resistencia eléctrica.

- 40 En una realización, los sensores de respuesta magnética incluyen sensores TMR configurados para cambiar entre el primer y el segundo estado, en donde las dos capas ferromagnéticas tienen direcciones opuestas de magnetización en el primer estado, de modo que la capa no magnética tiene una primera resistencia eléctrica, y en donde las dos capas ferromagnéticas tienen la misma dirección de magnetización en el segundo estado, de modo que la capa no magnética tiene una primera resistencia eléctrica.

- 45 En una realización, el sistema de control de fluidos está configurado para (a) hacer fluir nucleótidos a los espacios designados para añadir los nucleótidos a las cadenas complementarias; y (b) hacer fluir partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los nucleótidos, presentando las partículas magnéticas una propiedad magnética detectable correspondiente; y (d) eliminar las partículas magnéticas de los espacios designados; y donde el circuito de lectura está configurado para detectar la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles después de (b).

- 50 En una realización, el sistema de control de fluidos está configurado para: (a) administrar nucleótidos a los espacios designados para añadir los nucleótidos a las cadenas complementarias, incluyendo los nucleótidos al menos primero, segundo y tercer nucleótidos, teniendo el primero, segundo y tercer nucleótidos bases diferentes; (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los primeros nucleótidos y por los segundos nucleótidos; (c) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos; (d) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los terceros nucleótidos; en donde el circuito de lectura está configurado para detectar la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles después de (b) y después de (d).

- 55 En una realización, el sistema de control fluido está configurado para administrar al menos el primer y segundo nucleótidos a los espacios designados para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen partículas magnéticas unidas a los mismos, en donde el circuito de lectura está configurado para detectar cambios en la resistencia eléctrica en los

sensores magnéticamente sensibles, causando las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos un cambio diferente en la resistencia eléctrica que las partículas magnéticas de los segundos nucleótidos.

En una realización, se describe un sistema de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El sistema incluye un cabezal de lectura que incluye un brazo y un sensor magnéticamente sensible unido al brazo, incluyendo el sensor magnéticamente sensible al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), estando configurado el sensor magnéticamente sensible para detectar partículas magnéticas. El sistema incluye un sustrato de muestra que tiene una superficie de sustrato, estando la superficie del sustrato configurada para tener una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados a lo largo de la superficie del sustrato, en donde al menos uno del cabezal de lectura y el sustrato de la muestra está configurado para moverse con respecto al otro para colocar el sensor magnéticamente sensible cerca de los espacios designados en una relación operativa. El sistema incluye un circuito de lectura acoplado comunicativamente al sensor de respuesta magnética, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir señales que corresponden a una resistencia eléctrica del sensor de respuesta magnética cuando se coloca en uno de los espacios designados.

En una realización, el sustrato de muestra puede girar alrededor de un eje.

En una realización, el sustrato de muestra tiene forma de disco.

En una realización, el cabezal de lectura incluye una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles unidos al brazo, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir señales desde al menos una pluralidad de sensores magnéticos para al menos parte de la relación operativa.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un cabezal de lectura que incluye un brazo y un sensor magnéticamente sensible unido al brazo, incluyendo el sensor magnéticamente sensible al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), estando configurado el sensor magnéticamente sensible para detectar partículas magnéticas. El método incluye proporcionar un sustrato de muestra que tiene una pluralidad de cadenas molde ubicadas en espacios designados a lo largo de una superficie del sustrato. El método incluye llevar a cabo una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias incorporando nucleótidos a lo largo de cada una de las cadenas molde, estando al menos algunos de los nucleótidos marcados con las correspondientes partículas magnéticas que presentan sus respectivas propiedades magnéticas; en donde, para cada uno de los ciclos de SBS, el método incluye colocar el sensor de respuesta magnética adyacente a los espacios designados a lo largo de la superficie del sustrato y detectar una resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, el sustrato de muestra puede girar alrededor de un eje y en donde colocar el sensor magnéticamente sensible incluye girar el sustrato de muestra alrededor del eje.

En una realización, el sustrato de muestra tiene forma de disco.

En una realización, el cabezal de lectura incluye una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles unidos al brazo.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para capturar una correspondiente cadena molde. El método incluye llevar a cabo una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de una correspondiente cadena molde, estando los nucleótidos unidos a las correspondientes partículas magnéticas que tienen sus respectivas propiedades magnéticas, donde cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las respectivas propiedades magnéticas de las partículas magnéticas a medida que los nucleótidos se añaden a la cadena complementaria. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen un sensor magnetorresistivo.

En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en el flujo de corriente a través de las capas conductoras de los sensores GMR.

En una realización, los sensores magnéticamente sensibles incluyen sensores de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), siendo causados los cambios en la resistencia eléctrica por cambios en una corriente de electrones de túnel a través de capas aislantes de los sensores de TMR.

5 En una realización, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye una primera y una segunda capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa la primera y la segunda capa ferromagnética.

10 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

15 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

20 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si se produjeron cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar las magnitudes de los cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles.

25 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un número diferente de partículas magnéticas unidas a los mismos que otros tipos de nucleótidos.

En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

30 En una realización, los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, teniendo cada tipo de nucleótido un tipo diferente de partícula magnética unida a los mismos que otros tipos de nucleótidos.

En una realización, las partículas magnéticas tienen diferentes intensidades de campo magnético.

35 En una realización, las propiedades magnéticas incluyen al menos una de un campo magnético, una dirección magnética o un momento magnético.

En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.

40 En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.

45 En una realización, cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye administrar múltiples tipos de nucleótidos, administrándose cada tipo de nucleótido en un momento distinto.

En una realización, cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye administrar múltiples tipos de nucleótidos simultáneamente.

50 En una realización, cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye administrar las partículas magnéticas a los nucleótidos correspondientes después de que los nucleótidos correspondientes se hayan añadido a la cadena complementaria.

En una realización, las partículas magnéticas tienen un enlace reversible.

55 En una realización, cada área designada incluye una única cadena molde que es capturada por la polimerasa.

60 En una realización, el aparato de detección incluye una celda de flujo que define una cámara que tiene las áreas designadas, administrándose los nucleótidos y las partículas magnéticas a las áreas designadas haciendo fluir los nucleótidos y las partículas magnéticas a través de la cámara de la celda de flujo.

En una realización, el aparato de detección define una cámara que incluye las áreas designadas, teniendo el aparato de detección electrodos que se colocan a lo largo de la cámara, en donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye ejecutar operaciones de gotitas usando los electrodos.

65

- En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para unirse a las correspondientes cadenas molde. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar nucleótidos en las áreas designadas y permitir que los nucleótidos se añadan en las cadenas complementarias. Cada evento de SBS incluye (b) la administración de partículas magnéticas a las áreas designadas, estando capturadas las partículas magnéticas por los nucleótidos, proporcionando las partículas magnéticas un correspondiente campo magnético externo. Cada evento de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada evento de SBS incluye (d) eliminar las partículas magnéticas de las áreas designadas. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.
- En una realización, (a)-(d) se repiten para múltiples tipos de nucleótidos, administrándose cada tipo de nucleótido por separado a las áreas designadas.
- En una realización, la administración de los nucleótidos incluye la administración simultánea de múltiples tipos de nucleótidos y la administración de las partículas magnéticas incluye la administración simultánea de múltiples tipos de partículas magnéticas, teniendo cada tipo de partículas magnéticas una propiedad de campo magnético correspondiente que es diferente de las propiedades del campo magnético de otros tipos de partículas magnéticas.
- En una realización, cada área designada incluye una única cadena molde que está inmovilizada en una superficie de sustrato del aparato de detección.
- En una realización, las áreas designadas están ubicadas dentro de una cámara de una celda de flujo y en donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye hacer fluir los nucleótidos y las partículas magnéticas, respectivamente, a través de la cámara.
- En una realización, el aparato de detección define una cámara que incluye las áreas designadas, teniendo el aparato de detección electrodos que se colocan a lo largo de la cámara, en donde administrar los nucleótidos y administrar las partículas magnéticas incluye ejecutar operaciones de gotitas usando los electrodos.
- En una realización, cada uno de la pluralidad de eventos de SBS comprende además detectar un nivel de fondo de resistencia eléctrica después de (d).
- En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada uno de los eventos de SBS.
- En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para unirse a las correspondientes cadenas molde. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a las cadenas designadas y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias, incluyendo los nucleótidos al menos un primero, segundo y tercer nucleótidos, teniendo el primero, segundo y tercer nucleótidos diferentes bases. Cada evento de SBS incluye (b) administrar partículas magnéticas a las áreas designadas, siendo capturadas las partículas magnéticas por los primeros nucleótidos y por los segundos nucleótidos. Cada evento de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada evento de SBS incluye (d) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos. Cada evento de SBS incluye (e) administrar partículas magnéticas a las áreas designadas, siendo las partículas magnéticas de los terceros nucleótidos. Cada evento de SBS incluye (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.
- En una realización, el primer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (c) pero no se detectaba en (f); el segundo nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (c) y se detectaba en (f); y el tercer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (c) pero se detectaba en (f).
- En una realización, (a) incluye administrar cuartos nucleótidos y en donde el cuarto nucleótido extiende la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (c) y no se detectó en (f).

En una realización, cada uno de la pluralidad de eventos de SBS comprende además: (g) eliminar las partículas magnéticas del segundo y tercer nucleótidos.

En una realización, (d) y (e) tienen lugar al mismo tiempo.

5 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

10 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

15 En una realización, las propiedades magnéticas incluyen al menos una de un campo magnético, una dirección magnética o un momento magnético.

En una realización, las partículas magnéticas incluyen materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo o antiferromagnetismo.

20 En una realización, los cambios detectados en la resistencia eléctrica en los sensores que responden magnéticamente son causados por los espines intrínsecos de los electrones en el material de las partículas magnéticas.

25 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada evento de SBS.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para unirse a las correspondientes cadenas molde. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a las áreas designadas para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, en donde el primer y segundo nucleótidos tienen partículas magnéticas unidas a los mismos. Cada evento de SBS incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, donde las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos causan un cambio diferente en la resistencia eléctrica que las partículas magnéticas de los segundos nucleótidos. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples eventos de SBS.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada evento de SBS, los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, el primer y segundo nucleótidos capturan un número diferente de partículas magnéticas, configurado el número diferente de partículas magnéticas para causar cambios de diferente magnitud en la resistencia eléctrica.

5 En una realización, las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

En una realización, los primeros nucleótidos capturan un primer tipo de partículas magnéticas y los segundos nucleótidos capturan un segundo tipo de partículas magnéticas, configurados el primer y segundo tipo de partículas magnéticas para causar diferentes magnitudes de cambios en la resistencia eléctrica.

10 En una realización, el primer y segundo tipos de partículas magnéticas tienen diferentes materiales paramagnéticos.

En una realización, la administración del primer y segundo nucleótidos en (a) incluye la administración del primer y segundo nucleótidos a las áreas designadas para extender las cadenas complementarias y, posteriormente, la administración de las partículas magnéticas a las áreas designadas, por lo que las partículas magnéticas se unen al primer y segundo nucleótidos.

15 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada evento de SBS.

20 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para unirse a las correspondientes cadenas molde. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a las áreas designadas para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos diferentes bases, donde el primer y segundo nucleótidos tienen un primer y segundo single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM), respectivamente, unidos al mismo, teniendo cada uno de los primeros y segundos SMM diferentes estados magnéticos que son sensibles a diferentes frecuencias de luz. Cada evento de SBS incluye (b) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una primera frecuencia de luz. Cada evento de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, donde los cambios son causados por el estado magnético de los primeros SMM. Cada evento de SBS incluye (d) alterar el estado magnético de los primeros SMM aplicando una segunda frecuencia de luz. Cada evento de SBS incluye (e) alterar el estado magnético de los segundos SMM aplicando una tercera frecuencia de luz. Cada evento de SBS incluye (f) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles, en donde los cambios son causados por el estado magnético de los segundos SMM. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, cada uno de los eventos de SBS comprende además alterar el estado magnético de los segundos SMM aplicando una cuarta frecuencia de luz.

45 En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

En una realización, al menos uno de (b)-(d) o (e)-(f) se repite varias veces durante al menos algunos de los eventos de SBS.

50 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

55 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

60 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

65 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

5 En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples eventos de SBS.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada evento de SBS, los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

10 En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes después de cada evento de SBS.

15 En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de una respectiva área designada para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo también el aparato de detección polimerasa inmovilizada en las áreas designadas, configurada la polimerasa para unirse a las correspondientes cadenas molde. El método incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer cadenas complementarias a lo largo de las cadenas molde. Cada evento de SBS incluye (a) administrar al menos un primer y segundo nucleótidos a las áreas designadas para extender las cadenas complementarias, teniendo el primer y segundo nucleótidos bases diferentes, donde el primer y segundo nucleótidos tienen single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM) unidos a los mismos, teniendo el primer y segundo nucleótidos un número diferente de SMM unidos a los mismos, teniendo los SMM estados magnéticos que responden a diferentes frecuencias de luz. Cada evento de SBS incluye (b) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una primera frecuencia de luz. Cada evento de SBS incluye (c) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Cada evento de SBS incluye (d) alterar el estado magnético de los SMM aplicando una segunda frecuencia de luz. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

30 En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

En una realización, (b)-(d) se repite varias veces durante al menos algunos de los eventos de SBS.

35 En una realización, al menos el primer y el segundo nucleótidos incluyen el primer, segundo y tercer nucleótidos que tienen cada uno SMM unidos a los mismos, teniendo el primer, segundo y tercer nucleótidos un número diferente de SMM unidos a los mismos.

40 En una realización, los SMM comprenden compuestos organometálicos que presentan un comportamiento superparamagnético.

45 En una realización, la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.

50 En una realización, determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias, en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

55 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados son aproximadamente iguales a una primera magnitud o aproximadamente iguales a una segunda magnitud.

En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles superan un umbral.

60 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar si las magnitudes de los cambios detectados en los sensores magnéticamente sensibles están dentro de un intervalo de valores designado.

En una realización, la determinación de las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar las magnitudes de los cambios detectados en cada sensor magnéticamente sensible a través de múltiples eventos de SBS.

65 En una realización, determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye comparar, para cada evento de SBS, las magnitudes de los cambios detectados asociados con una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles.

En una realización, los nucleótidos incluyen grupos bloqueantes, comprendiendo además el método eliminar los grupos bloqueantes al final de cada evento.

En una realización, se describe un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). El método incluye proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, ubicándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles cerca de un respectivo espacio designado para detectar una propiedad magnética del mismo, incluyendo también el aparato de detección una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los correspondientes espacios designados. El método incluye la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria a lo largo de cada cadena molde. Cada ciclo de SBS incluye (a) administrar nucleótidos a los espacios designados y permitir que los nucleótidos se añadan a las cadenas complementarias, incluyendo los nucleótidos al menos un primer, segundo y tercer nucleótidos, teniendo el primer, segundo y tercer nucleótidos diferentes bases, donde el primer y segundo nucleótidos incluyen partículas magnéticas y los terceros nucleótidos no incluyen partículas magnéticas. Cada ciclo de SBS incluye (b) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las partículas magnéticas del primer y segundo nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (c) eliminar las partículas magnéticas de los primeros nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (d) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, siendo capturadas las partículas magnéticas por los terceros nucleótidos. Cada ciclo de SBS incluye (e) detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las partículas magnéticas del segundo y tercer nucleótidos. El método incluye la determinación de las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica.

En una realización, el primer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (b) pero no se detectaba en (e); el segundo nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si se detectaba un cambio en la resistencia eléctrica en (b) y se detectaba en (e); y el tercer nucleótido extendió la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (b) pero se detectaba en (e).

En una realización, (a) incluye administrar cuartos nucleótidos y en donde el cuarto nucleótido extiende la cadena complementaria en (a) si no se detectó un cambio en la resistencia eléctrica en (b) y no se detectó en (e).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A ilustra una vista superior de un sistema que comprende una matriz de sensores magnéticos para soportar, por ejemplo, un esquema de biosensor magnético SBS;

la Figura 1B ilustra una vista en sección transversal del sistema de la Figura 1A;

la Figura 2A muestra un ejemplo de un dispositivo GMR;

la Figura 2B muestra un ejemplo de un dispositivo TMR;

la Figura 3 muestra un ejemplo de un gráfico de la sensibilidad de un biochip GMR usando una única nanopartícula magnética;

la Figura 4 ilustra una vista en sección transversal de una parte de un aparato de detección mostrado en las Figuras 1A y 1B y muestra más detalles de la matriz de sensores magnéticos;

la Figura 5 muestra una parte del aparato de detección mostrado en las Figuras 1A, 1B y 4 y representa un ejemplo de un esquema de biosensor magnético SBS, en donde se usa un nucleótido biotinilado incorporado para capturar una nanopartícula magnética recubierta de estreptavidina y generar una señal detectable;

la Figura 6A ilustra una fórmula estructural parcial del nucleótido biotinilado de la Figura 5;

la Figura 6B ilustra una fórmula estructural parcial de un nucleótido que tiene una partícula magnética acoplada al gamma fosfato del nucleótido;

la Figura 7 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de determinación de base en un esquema de biosensor magnético SBS usando, por ejemplo, la celda de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4;

la Figura 8 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de "dos marcadores" usando, por ejemplo, la celda de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4;

la Figura 9 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método de la Figura 8;

la Figura 10 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando, por ejemplo, la celda de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4;

5 la Figura 11 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando nucleótidos marcados con SMM;

la Figura 12 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando nucleótidos marcados con SMM con diferentes
10 magnitudes magnéticas para la discriminación de bases; y

la Figura 13 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS usando una ADN polimerasa marcada con SMM y nucleótidos con diferentes tasas de incorporación.

15 La Figura 14A ilustra una vista en planta de la matriz de sensores magnéticos en combinación con un ejemplo de una región semihidrófoba en una celda de flujo o un accionador de gotitas;

la Figura 14B ilustra una vista en sección transversal de la matriz del sensor magnético de la Figura 14A;

20 la Figura 15A ilustra una vista en planta de la matriz de sensores magnéticos en combinación con otro ejemplo de la región semihidrófoba en una celda de flujo o un accionador de gotitas;

la Figura 15B ilustra una vista en sección transversal de la matriz del sensor magnético de la Figura 15A;

25 la Figura 16A ilustra una vista en planta de una parte de un accionador de gotitas que incluye la matriz de sensores magnéticos para soportar, por ejemplo, un esquema de biosensor magnético SBS;

la Figura 16B ilustra una vista en sección transversal del accionador de gotitas de la Figura 16A;

30 la Figura 17 ilustra una vista en planta de un instrumento basado en un disco giratorio en el que se proporciona un sensor magnético móvil para soportar, por ejemplo, un esquema de biosensor magnético SBS;

la Figura 18A ilustra una vista en planta de la matriz de sensores magnéticos en combinación con una realización en la que la polimerasa está inmovilizada en áreas designadas;

35 la Figura 18B ilustra una vista en sección transversal que ilustra una vista en planta y una vista en sección transversal, respectivamente, de la matriz de sensores magnéticos de la Figura 18A; y

40 la Figura 19 ilustra un sensor magnéticamente sensible según una realización.

Descripción detallada

Los métodos descritos en la presente descripción se pueden usar junto con una variedad de técnicas de análisis biológico o químico, incluidas las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. Se pueden usar realizaciones para determinar una característica genética de una muestra basándose en los cambios en la resistencia eléctrica que se producen a medida que crece la una cadena de ácido nucleico. Las técnicas particularmente aplicables son aquellas en donde las muestras biológicas o químicas se localizan en posiciones designadas de manera que sus posiciones relativas no cambien durante el análisis. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden unir en ubicaciones fijas a lo largo de la superficie de un sustrato durante un protocolo designado en el que la matriz se escanea repetidamente. Son particularmente aplicables las realizaciones en las que se obtienen impresiones con diferentes canales, por ejemplo, coincidiendo con diferentes marcadores utilizados para distinguir un tipo de base de nucleótidos de otro. En algunas realizaciones, el proceso para determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede ser un proceso automatizado. Las realizaciones preferidas incluyen sequencing-by-synthesis (técnicas de secuenciación por síntesis - “SBS”).

55 Como se expone en la presente descripción, se pueden usar realizaciones para determinar una característica genética de una muestra. La característica genética se puede determinar analizando los cambios en la resistencia eléctrica que se producen en los sensores magnéticamente sensibles. Por ejemplo, las partículas magnéticas que están asociadas con nucleótidos o polimerasa pueden causar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles a medida que los nucleótidos se añaden a un ácido nucleico. Las señales de los sensores magnéticamente sensibles que se basan en la resistencia eléctrica proporcionan datos que pueden analizarse y utilizarse para determinar una característica genética. Como se usa en la presente descripción, la expresión “característica genética” incluye una secuencia de un ácido nucleico o cualquier característica que se base en la secuencia del ácido nucleico, se determine o no la secuencia precisa. Por ejemplo, las realizaciones pueden hacer crecer una cadena complementaria de ácido nucleico en la que cada nucleótido que se añade a la cadena está asociado con una o más partículas magnéticas. En algunas realizaciones, el nucleótido puede

identificarse en cada evento de incorporación (p. ej., en tiempo real). En otras realizaciones, el nucleótido puede identificarse solo después de múltiples eventos de incorporación o después de que la secuencia de secuenciación haya terminado con un análisis secundario.

- 5 Aún en otras realizaciones más, la característica genética puede determinarse sin identificar individualmente los nucleótidos de manera que se conozca la secuencia. Por ejemplo, los datos proporcionados por las señales después de uno o más eventos de incorporación pueden analizarse para distinguir una secuencia de una o más de otras secuencias. Como ejemplo particular, se pueden comparar los datos que provienen de dos (o más) ácidos nucleicos que incluyen un single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido - SNP). Sin
10 conocer las secuencias de los ácidos nucleicos, las realizaciones pueden analizar los patrones de las señales que se reciben de los sensores magnéticamente sensibles. Por ejemplo, cada nucleótido puede tener una partícula magnética con una propiedad magnética diferente. Los cambios detectados en la resistencia eléctrica de una serie de nucleótidos pueden formar un patrón. Las señales que forman un primer patrón pueden tener un genotipo y las señales que forman un segundo patrón pueden tener un segundo genotipo. Por consiguiente, pueden
15 buscarse ácidos nucleicos que proporcionen el primer patrón, que tengan una característica genética determinada, mientras que pueden buscarse ácidos nucleicos que proporcionen el segundo patrón, que tengan una característica genética diferente. De nuevo, tales determinaciones pueden realizarse sin conocer las secuencias de los ácidos nucleicos.
- 20 Debe entenderse que “determinar una característica genética” no incluye necesariamente identificar, con especificidad, qué característica genética que puede tener la muestra. Por ejemplo, mientras se investiga un cierto genotipo que se basa en un SNP sospechoso, las realizaciones solo pueden identificar que una o más muestras tienen un patrón determinado mientras que otras muestras no tienen ese patrón. En cualquier caso, se ha determinado una característica genética de la muestra. Asimismo, “determinar una característica genética”
25 puede incluir determinar que una muestra no tenga un microorganismo patógeno sospechoso o determinar que una variante genética no tenga un SNP o una short tandem repeat (repetición en tándem corta - STR).

Como otro ejemplo, una muestra de un individuo que se sospecha que tiene una determinada afección puede someterse a una prueba. La afección puede estar causada, por ejemplo, por un trastorno genético, cáncer o un
30 microorganismo patógeno (p. ej., virus del Ébola). La prueba puede incluir la detección de cambios en la resistencia eléctrica a medida que crecen los ácidos nucleicos. De nuevo, sin conocer la secuencia precisa de los ácidos nucleicos, las realizaciones pueden determinar si el individuo tiene la afección analizando las señales para identificar uno o más patrones.

35 Las “técnicas de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis” - “SBS”) implican generalmente la extensión enzimática de una cadena de ácido nucleico en formación mediante la adición iterativa de nucleótidos contra una cadena molde. En los métodos tradicionales de SBS, se puede proporcionar un monómero de un solo nucleótido a un nucleótido diana en presencia de una polimerasa en cada administración. Sin embargo, en los métodos descritos en la presente descripción, se puede proporcionar más de un tipo de monómero nucleotídico a
40 un ácido nucleico diana en presencia de una polimerasa en una administración.

La SBS puede utilizar monómeros de nucleótidos que tienen un resto terminador o aquellos que carecen de restos terminadores. Los métodos que utilizan monómeros de nucleótidos que carecen de terminadores incluyen, por ejemplo, pirosecuenciación y secuenciación utilizando nucleótidos marcados con γ -fosfato, como se expone con más
45 detalle a continuación. En los métodos que utilizan monómeros de nucleótidos que carecen de terminadores, el número de nucleótidos añadidos en cada ciclo es generalmente variable y depende de la secuencia molde y del modo de administración de nucleótidos. Para las técnicas de SBS que utilizan monómeros de nucleótidos que tienen un resto terminador, el terminador puede ser efectivamente irreversible en las condiciones de secuenciación utilizadas como es el caso de la secuenciación tradicional de Sanger que utiliza didesoxinucleótidos, o el terminador
50 puede ser reversible como es el caso de los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (ahora Illumina, Inc.).

Las técnicas de SBS pueden utilizar monómeros de nucleótidos que tienen un resto marcador o aquellos que carecen de un resto marcador. Por consiguiente, los eventos de incorporación pueden detectarse basándose en una
55 característica del marcador, como la fluorescencia del marcador; una característica del monómero nucleotídico, como el peso molecular o la carga; un subproducto de la incorporación del nucleótido, como la liberación de pirofosfato; o similar. En las realizaciones, donde están presentes dos o más nucleótidos diferentes en un reactivo de secuenciación, los diferentes nucleótidos pueden distinguirse entre sí o, como alternativa, los dos o más marcadores diferentes pueden ser indistinguibles según las técnicas de detección que se utilizan. Por ejemplo, los
60 diferentes nucleótidos presentes en un reactivo de secuenciación, pueden tener diferentes marcadores y se pueden distinguir usando ópticas apropiadas como se ilustra mediante los métodos de secuenciación desarrollados por Solexa (ahora Illumina, Inc.).

La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares en la cadena en formación (Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996) “Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release”. Analytical Biochemistry 242(1), 84-9;

Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing". *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate". *Science* 281(5375), 363; Pat. US-6.210.891; Pat. US-6.258.568 y Pat. US-6.274.320). En la pirosecuenciación, el PPI liberado puede detectarse convirtiéndolo inmediatamente en adenosín trifosfato (ATP) por la ATP sulfilasa, y el nivel de ATP generado se detecta mediante fotones producidos por luciferasa. Los ácidos nucleicos que se van a secuenciar se pueden unir a características en una matriz y se pueden obtener imágenes de la matriz para capturar las señales quimioluminiscentes que se producen debido a la incorporación de nucleótidos en las características de la matriz. Se puede obtener una imagen después de que la matriz se trate con un tipo de nucleótido particular (p. ej., A, T, C o G). Las imágenes obtenidas después de la adición de cada tipo de nucleótido diferirán con respecto a las características de la matriz que se detecten. Estas diferencias en la imagen reflejan el contenido de secuencia diferente de las características en la matriz. Sin embargo, las ubicaciones relativas de cada característica permanecerán sin cambios en las imágenes. Las imágenes pueden almacenarse, procesarse y analizarse utilizando los métodos expuestos en la presente descripción. Por ejemplo, las imágenes obtenidas después del tratamiento de la matriz con cada tipo de nucleótido diferente se pueden manejar de la misma manera que se ilustra en la presente descripción para imágenes obtenidas de diferentes canales de detección para métodos de secuenciación basados en terminadores reversibles.

En otro tipo ilustrativo de SBS, la secuenciación del ciclo se logra mediante la adición escalonada de nucleótidos terminadores reversibles que contienen, por ejemplo, un marcador de tinte escindible o fotoblanqueable como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional. N.º WO 04/018497 y la Patente US-7.057.026. Este enfoque está siendo comercializado por Solexa (ahora Illumina Inc.), y también se describe en la publicación de patente internacional. N.º WO 91/06678 y la publicación de patente internacional. N.º WO 07/123.744. La disponibilidad de terminadores marcados con fluorescencia, en los que se puede invertir tanto la terminación como escindir el marcador fluorescente, facilita la secuenciación eficaz de la cyclic reversible termination (terminación cíclica reversible - CRT). Las polimerasas también pueden diseñarse conjuntamente para incorporar y extenderse eficazmente a partir de estos nucleótidos modificados.

Preferentemente, en realizaciones de secuenciación basadas en terminadores reversibles, los marcadores no inhiben sustancialmente la extensión en las condiciones de reacción de SBS. Sin embargo, los marcadores de detección pueden eliminarse, por ejemplo, mediante escisión o degradación. Las imágenes pueden capturarse tras la incorporación de marcadores en características de ácidos nucleicos en matriz. En realizaciones particulares, cada ciclo implica la administración simultánea de cuatro tipos de nucleótidos diferentes a la matriz y cada tipo de nucleótido tiene un marcador espectralmente distinto. A continuación, se pueden obtener cuatro imágenes, cada una de las cuales utiliza un canal de detección que es selectivo para uno de los cuatro marcadores diferentes. Como alternativa, se pueden añadir secuencialmente diferentes tipos de nucleótidos y se puede obtener una imagen de la matriz entre cada etapa de adición. En tales realizaciones, cada imagen mostrará características de ácido nucleico que han incorporado nucleótidos de un tipo particular. Diferentes características estarán presentes o ausentes en las diferentes imágenes debido al diferente contenido de secuencia de cada característica. Sin embargo, la posición relativa de las características permanecerá sin cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de dichos métodos de SBS con terminador reversible pueden almacenarse, procesarse y analizarse como se expone en la presente descripción. Después de la etapa de captura de imágenes, los marcadores se pueden eliminar y los restos terminadores reversibles se pueden eliminar para los ciclos posteriores de adición y detección de nucleótidos. La eliminación de los marcadores después de que se hayan detectado en un ciclo particular y antes de un ciclo posterior, puede proporcionar la ventaja de reducir la señal de fondo y la diafonía entre ciclos. A continuación se exponen ejemplos de marcadores útiles y de métodos de eliminación.

En realizaciones particulares, algunos o todos los monómeros de nucleótidos pueden incluir terminadores reversibles. En tales realizaciones, los terminadores reversibles/compuestos de flúor escindibles pueden incluir flúor unido al resto de ribosa mediante un enlace éster 3' (Metzker, *Genome Res.* 15:1767-1776 [2005]). Otros enfoques han separado la química del terminador de la escisión del marcador de fluorescencia (Ruparel y col., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 102: 5932-7 [2005]). Ruparel y col describieron el desarrollo de terminadores reversibles que usaban un pequeño grupo alilo 3' para bloquear la extensión, pero podían desbloquearse mediante un tratamiento corto con un catalizador de paladio. El fluoróforo se unió a la base mediante un enlazador fotoescindible que podía escindirse mediante una exposición de 30 segundos a luz UV de longitud de onda larga. Puede usarse la reducción con disulfuro o la fotoescisión para escindir los enlazadores, por ejemplo. Otro enfoque para la terminación reversible es el uso de la terminación natural que se produce después de la colocación de un tinte voluminoso en un dNTP. La presencia de un tinte voluminoso cargado en el dNTP puede actuar como un terminador eficaz a través de un impedimento estérico y/o electrostático. La presencia de un evento de incorporación evita otras incorporaciones a menos que se elimine el tinte. La división del tinte elimina el flúor e invierte eficazmente la terminación. También se describen ejemplos de nucleótidos modificados en la Patente US-7.427.673 y la Patente US-7.057.026.

Los sistemas y métodos de SBS ilustrativos adicionales que se pueden utilizar con los métodos y sistemas descritos en la presente descripción se describen en la Patente US-7.541.444, la Patente US-7.566.537, la Patente US-7.057.026, la Patente US-8.460.910, la Patente US-8.623.628, la publicación de Patente Internacional N.º WO 05/065814, la Patente

US-7.985.565, la Publicación de Patente Internacional. N.º WO 06/064199, la Publicación de Patente Internacional. N.º WO 07/010.251, la publicación de Patente US-20120270305 y la publicación de Patente US-20130260372.

Algunas realizaciones pueden utilizar la detección de cuatro nucleótidos diferentes usando menos de cuatro marcadores diferentes. Por ejemplo, la SBS se puede realizar utilizando métodos y sistemas descritos en la publicación de Patente US-20130079232. Como un primer ejemplo, se puede detectar un par de tipos de nucleótidos en la misma longitud de onda, pero distinguir en función de la diferencia de intensidad de un miembro del par en comparación con el otro, o en función de un cambio en un miembro del par (p. ej., mediante modificación química, modificación fotoquímica o modificación física) que hace que la señal aparente aparezca o desaparezca en comparación con la señal detectada para el otro miembro del par. Como un segundo ejemplo, se pueden detectar tres de cuatro tipos de nucleótidos diferentes en condiciones particulares, mientras que un cuarto tipo de nucleótidos carece de un marcador que sea detectable en esas condiciones, o se detecta mínimamente en esas condiciones (p. ej., detección mínima debido a la fluorescencia de fondo, etc.). La incorporación de los primeros tres tipos de nucleótidos en un ácido nucleico se puede determinar basándose en la presencia de sus respectivas señales y la incorporación del cuarto tipo de nucleótidos en el ácido nucleico se puede determinar basándose en la ausencia o detección mínima de cualquier señal. Como un tercer ejemplo, un tipo de nucleótidos puede incluir un(os) marcador(es) que se detecta(n) en dos canales diferentes, mientras que otros tipos de nucleótidos se detectan en no más de uno de los canales. Las tres configuraciones ilustrativas mencionadas anteriormente no se consideran mutuamente excluyentes y pueden usarse en varias combinaciones. Una realización ilustrativa que combina los tres ejemplos es un método de SBS basado en fluorescencia que usa un primer tipo de nucleótido que se detecta en un primer canal (p. ej., dATP que tiene un marcador que se detecta en el primer canal cuando se excita con una primera longitud de onda de excitación), un segundo tipo de nucleótido que se detecta en un segundo canal (p. ej., dCTP que tiene un marcador que se detecta en el segundo canal cuando se excita con una segunda longitud de onda de excitación), un tercer tipo de nucleótido que se detecta tanto en el primer como en el segundo canal (p. ej., dTTP que tiene al menos un marcador que se detecta en ambos canales cuando se excita con la primera y/o segunda longitud de onda de excitación) y un cuarto tipo de nucleótido que carece de un marcador que no se detecta, o se detecta mínimamente, en ninguno de los canales (p. ej., dGTP sin marcador).

Además, como se describe en la publicación de patente US-20130079232, los datos de secuenciación se pueden obtener utilizando un solo canal. En los llamados enfoques de secuenciación de un tinte, el primer tipo de nucleótido se marca pero el marcador se elimina después de que se genere la primera imagen, y el segundo tipo de nucleótido se marca solo después de que se genere una primera imagen. El tercer tipo de nucleótido conserva su marcador tanto en la primera como en la segunda imagen, y el cuarto tipo de nucleótido permanece sin marcar en ambas imágenes.

Algunas realizaciones pueden utilizar secuenciación mediante técnicas de ligamiento. Tales técnicas utilizan ADN ligasa para incorporar oligonucleótidos e identificar la incorporación de tales oligonucleótidos. Los oligonucleótidos tienen normalmente diferentes marcadores que se correlacionan con la identidad de un nucleótido particular en una secuencia con la que hibridan los oligonucleótidos. Al igual que con otros métodos de SBS, se pueden obtener imágenes tras el tratamiento de una matriz de características de ácidos nucleicos con los reactivos de secuenciación marcados. Cada imagen mostrará características de ácido nucleico que han incorporado marcadores de un tipo particular. Diferentes características estarán presentes o ausentes en las diferentes imágenes debido al contenido de secuencia diferente de cada característica, pero la posición relativa de las características permanecerá sin cambios en las imágenes. Las imágenes obtenidas a partir de métodos de secuenciación basados en ligamiento se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente descripción. Los sistemas y métodos de SBS ilustrativos que se pueden utilizar con los métodos y sistemas descritos en la presente descripción se describen en la Patente US-6.969.488, la Patente US-6.172.218 y la Patente US-6.306.597.

Algunas realizaciones pueden utilizar la secuenciación de nanoporos (Deamer, D. W. y Akeson, M. "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing". Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer, D. y D. Branton, "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis". Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002); Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko, "DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope" Nat. Mater. 2:611-615 [2003]). En tales realizaciones, el ácido nucleico diana pasa a través de un nanoporo, aunque algunas realizaciones de nanoporos pueden utilizar métodos que suponen la monitorización en tiempo real de la incorporación de nucleótidos de ADN polimerasa. El nanoporo puede ser un poro sintético o una proteína de membrana biológica, como la α -hemolisina. En una realización ilustrativa, cuando el ácido nucleico diana pasa a través del nanoporo, cada base puede identificarse midiendo las fluctuaciones en la conductancia eléctrica del poro. (Patente US-7.001.792; Soni, G. V. y Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores". Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis". Nanomed. 2,459-481 (2007); Cockroft, S. L., Chu, J., Amorin, M. y Ghadiri, M. R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution". J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 [2008]). Los datos obtenidos de la secuenciación de nanoporos se pueden almacenar, procesar y analizar como se expone en la presente descripción. En particular, los datos se pueden tratar como una imagen según el tratamiento ilustrativo de imágenes ópticas y otras imágenes que se expone en la presente descripción.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que suponen la monitorización en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Las incorporaciones de nucleótidos se pueden detectar a través de interacciones de fluorescence resonance energy transfer (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia - FRET) entre una polimerasa que lleva fluoróforo y nucleótidos marcados con γ -fosfato como se describe, por ejemplo, en la Patente US-7.329.492 y la Patente US-7.211.414 o las incorporaciones se pueden detectar con guías de onda de modo cero tal como se describe, por ejemplo, en la Patente US-7.315.019 y el uso de análogos de nucleótidos fluorescentes y polimerasas diseñadas genéticamente tal como se describe, por ejemplo, en la Patente US-7.405.281 y la Patente de US-8.343.746. La iluminación se puede restringir a un volumen a escala de zeptolitros alrededor de una polimerasa anclada a la superficie, de modo que se pueda observar la incorporación de nucleótidos marcados con fluorescencia con un fondo bajo (Levene, M. J. y col. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations". *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist, P. M. y col. "Parallel confocal detection of single molecules in real time". *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korch, J. y col. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 105, 1176-1181 [2008]). Las imágenes obtenidas de dichos métodos se pueden almacenar, procesar y analizar tal como se expone en la presente descripción.

En realizaciones particulares, la polimerasa está inmovilizada o anclada a un área designada a lo largo de una superficie que está próxima a un sensor magnéticamente sensible. Tales realizaciones pueden aumentar la probabilidad de que las diferentes partículas magnéticas, que son detectadas por el sensor magnéticamente sensible a medida que crece la cadena complementaria, puedan tener distancias relativamente iguales lejos del sensor magnéticamente sensible.

Las realizaciones descritas en la presente descripción también pueden incluir nucleótidos marcados con γ -fosfato en los que el marcador que está acoplado al γ -fosfato incluye la partícula magnética que cambia la resistencia eléctrica de los sensores magnéticamente sensibles.

Algunas realizaciones de SBS incluyen la detección de un protón liberado tras la incorporación de un nucleótido en un producto de extensión. Por ejemplo, la secuenciación basada en la detección de protones liberados puede usar un detector eléctrico y técnicas asociadas que están disponibles comercialmente en Ion Torrent (Guilford, CT, una subsidiaria de Life Technologies) o métodos y sistemas de secuenciación descritos en la Patente US-8.262.900; la Patente US-7.948.015; la publicación de Patente US-20100137143; o la Patente US-8.349.167. Los métodos expuestos en la presente descripción para amplificar ácidos nucleicos diana usando exclusión cinética pueden aplicarse fácilmente a sustratos usados para detectar protones. Más específicamente, los métodos expuestos en la presente descripción pueden usarse para producir poblaciones clonales de amplicones que se usan para detectar protones.

Los métodos de SBS anteriores se pueden llevar a cabo ventajosamente en formatos multiplexados de modo que se manipulen simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana diferentes. En realizaciones particulares, se pueden tratar diferentes ácidos nucleicos diana en un recipiente de reacción común o en una superficie de un sustrato particular. Esto permite la administración conveniente de reactivos de secuenciación, la eliminación de reactivos que no han reaccionado y la detección de eventos de incorporación de una manera multiplexada. En realizaciones que usan ácidos nucleicos diana unidos a la superficie, los ácidos nucleicos diana pueden estar en un formato de matriz. En un formato de matriz, los ácidos nucleicos diana pueden unirse normalmente a una superficie de una manera espacialmente distinguible. Los ácidos nucleicos diana pueden unirse mediante unión covalente directa, unión a una perla u otra partícula o unión a una polimerasa u otra molécula que esté unida a la superficie. La matriz puede incluir una única copia de un ácido nucleico diana en cada sitio (también denominado como una característica) o pueden estar presentes múltiples copias que tienen la misma secuencia en cada sitio o característica. Pueden producirse múltiples copias mediante métodos de amplificación tales como amplificación en puente o polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa - PCR) en emulsión como se describe con más detalle a continuación.

Los métodos expuestos en la presente descripción pueden usar matrices que tienen características en cualquiera de una variedad de densidades que incluyen, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 características/cm², 100 características/cm², 500 características/cm², 1000 características/cm², 5000 características/cm², 10.000 características/cm², 50.000 características/cm², 100.000 características/cm², 1.000.000 características/cm², 5.000.000 características/cm² o superior.

Una ventaja de los métodos expuestos en la presente descripción es que proporcionan una detección rápida y eficaz de una pluralidad de ácidos nucleicos diana en paralelo. Por consiguiente, la presente descripción proporciona sistemas integrados capaces de preparar y detectar ácidos nucleicos usando técnicas conocidas en la técnica tales como las ilustradas anteriormente. Por tanto, un sistema integrado de la presente descripción puede incluir componentes fluidicos capaces de administrar reactivos de amplificación y/o reactivos de secuenciación a uno o más fragmentos de ADN inmovilizados, comprendiendo el sistema componentes tales como bombas, válvulas, depósitos, líneas fluidicas y similares. Una celda de flujo puede configurarse y/o usarse en un sistema integrado para la detección de ácidos nucleicos diana. Se describen celdas de flujo ilustrativas, por ejemplo, en la Patente US-8.241.573 y la publicación de Patente US-20120270305. Como se ilustra en las celdas de flujo, uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado se pueden usar para un método de amplificación y para un método de detección. Tomando una

realización de secuenciación de ácidos nucleicos como ejemplo, se pueden usar uno o más de los componentes fluidicos de un sistema integrado para un método de amplificación expuesto en la presente descripción y para la administración de reactivos de secuenciación en un método de secuenciación como los ilustrados anteriormente. Como alternativa, un sistema integrado puede incluir sistemas fluidicos separados para llevar a cabo métodos de amplificación y para llevar a cabo métodos de detección. Los ejemplos de sistemas de secuenciación integrados que son capaces de crear ácidos nucleicos amplificados y también de determinar la secuencia de los ácidos nucleicos incluyen, sin limitación, la plataforma MiSeq™ (Illumina, Inc., San Diego, CA) y los dispositivos descritos en la publicación de Patente US-20120270305.

Como se usa en esta descripción, los siguientes términos tienen los significados indicados. “Gotita” significa un volumen de líquido en un accionador de gotitas. Normalmente, una gotita está al menos parcialmente delimitada por un fluido de relleno. Por ejemplo, una gotita puede estar completamente rodeada por un fluido de relleno o puede estar delimitada por un fluido de relleno y una o más superficies del accionador de gotitas. Como otro ejemplo, una gotita puede estar delimitada por el fluido de relleno, una o más superficies del accionador de gotitas y/o la atmósfera. Como otro ejemplo más, una gotita puede estar delimitada por el fluido de relleno y la atmósfera. Las gotitas pueden ser, por ejemplo, acuosas o no acuosas o pueden ser mezclas o emulsiones que incluyen componentes acuosos y no acuosos. Las gotitas pueden adoptar una amplia variedad de formas; los ejemplos no limitantes incluyen generalmente en forma de disco, en forma de babosa, esfera truncada, elipsoide, esférica, esfera parcialmente comprimida, hemisférica, ovoide, cilíndrica, combinaciones de tales formas y varias formas formadas durante operaciones de gotitas, tales como fusión o división o formadas como resultado del contacto de tales formas con una o más superficies de un accionador de gotitas. Para ejemplos de fluidos de gotitas que pueden someterse a operaciones de gotitas utilizando el enfoque de la presente descripción, véase Eckhardt y col., publicación de patente internacional. N.º WO / 2007/120241, titulado “Droplet-Based Biochemistry”, publicado el 25 de octubre de 2007.

En diversas realizaciones, una gotita puede incluir una muestra biológica, como sangre total, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido seminal, excreción vaginal, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido cístico, bilis, orina, líquido gástrico, líquido intestinal, muestras fecales, líquidos que contienen una o varias células, líquidos que contienen orgánulos, tejidos fluidizados, organismos fluidizados, líquidos que contienen múltiples organismos celulares, hisopos biológicos y lavados biológicos. Además, una gotita puede incluir un reactivo, como agua, agua desionizada, soluciones salinas, soluciones ácidas, soluciones básicas, soluciones detergentes y/o tampones. Una gotita puede incluir ácidos nucleicos, tales como ADN, ADN genómico, ARN, ARNm o análogos de los mismos; nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos tales como análogos que tienen restos terminadores tales como los descritos en Bentley y col., Nature 456:53-59 (2008); Gormley y col., la Publicación de patente internacional. N.º WO/2013/131962, titulada “Improved Methods of Nucleic Acid Sequencing”, publicada el 12 de septiembre de 2013; Barnes y col., la Patente US-7.057.026, titulada “Labelled Nucleotides”, expedida el 6 de junio de 2006; Kozlov y col., la Publicación de patente internacional N.º WO/2008/042067, titulada, “Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing”, publicada el 10 de abril de 2008; Rigatti y col., la Publicación de Patente internacional N.º WO/2013/117595, titulada, “Targeted Enrichment and Amplification of Nucleic Acids on a Support”, publicada el 15 de agosto de 2013; Hardin y col., la Patente US-7.329.492, titulada “Methods for Real-Time Single Molecule Sequence Determination”, presentada el 12 de febrero de 2008; Hardin y col., la Patente US-7.211.414, titulada “Enzymatic Nucleic Acid Synthesis: Compositions and Methods for Altering Monomer Incorporation Fidelity”, presentada el 1 de mayo de 2007; Turner y col., la Patente US-7.315.019, titulada “Arrays of Optical Confinements and Uses Thereof”, expedida el 1 de enero de 2008; Xu y col., la Patente US-7.405.281, titulada “Fluorescent Nucleotide Analogs and Uses Therefor”, expedida el 29 de julio de 2008; y Rank y col., la Publicación de patente US-20080108082, titulada “Polymerase Enzymes and Reagents for Enhanced Nucleic Acid Sequencing”, publicada el 8 de mayo de 2008; enzimas como polimerasas, ligasas, recombinasas o transposasas; miembros de unión como anticuerpos, epítopos, estreptavidina, avidina, biotina, lectinas o carbohidratos; u otras moléculas bioquímicamente activas. Otros ejemplos de contenido de gotitas incluyen reactivos, como un reactivo para un protocolo bioquímico, como un protocolo de amplificación de ácido nucleico, un protocolo de ensayo basado en afinidad, un protocolo de ensayo enzimático, un protocolo de secuenciación y/o un protocolo para análisis de fluidos biológicos. Una gotita puede incluir una o más perlas.

“Accionador de gotitas” significa un dispositivo para manipular gotitas. Para ejemplos de accionadores de gotitas, véase Pamula y col., la Patente US-6.911.132, titulada “Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques” expedida el 28 de junio de 2005; Pamula y col., la publicación de Patente US-20060194331, titulada “Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board”, publicada el 31 de agosto de 2006; Pollack y col., la publicación internacional de patente N.º WO/2007/120241, titulada “Droplet-Based Biochemistry”, publicada el 25 de octubre de 2007; Shenderov, la Patente US-6.773.566, titulada “Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same”, expedida el 10 de agosto de 2004; Shenderov, la Patente US-6.565.727, titulada “Actuators for Microfluidics Without Moving Parts”, expedida el 20 de mayo de 2003; Kim y col., la publicación de Patente US-20030205632, titulada “Electrowetting-driven Micropumping”, publicada el 6 de noviembre de 2003; Kim y col., la publicación de Patente US-20060164490, titulada “Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle”, publicada el 27 de julio de 2006; Kim y col., la publicación de Patente US-20070023292, titulada “Small Object Moving on Printed Circuit Board”, publicada el 1 de febrero de 2007; Shah y col., la publicación de Patente US-

20090283407, titulada "Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics", publicada el 19 de noviembre de 2009; Kim y col., la publicación de Patente. US-20100096266, titulada "Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip", publicada el 22 de abril de 2010; Velez, la Patente US-7.547.380, titulada "Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface" expedida el 16 de junio de 2009; Sterling y col., la Patente US-7.163.612, titulada "Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like", expedida el 16 de enero de 2007; Becker y col., la Patente US-7.641.779, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", expedida el 5 de enero de 2010; Becker y col., la Patente US-6.977.033, titulada "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing", expedida el 20 de diciembre de 2005; Decre y col., la Patente US-7.328.979, titulada "System for Manipulation of a Body of Fluid", expedida el 12 de febrero de 2008; Yamakawa y col., la publicación de Patente. US-20060039823, titulada "Chemical Analysis Apparatus", publicada el 23 de febrero de 2006; Wu, la publicación de Patente. US-20110048951, titulada "Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes", publicada el 3 de marzo de 2011; Fouillet y col., la publicación de Patente US-20090192044, titulada "Electrode Addressing Method", publicada el 30 de julio de 2009; Fouillet y col., la Patente US-7.052.244, titulada "Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces" expedida el 30 de mayo de 2006; Marchand y col., la publicación de Patente US-20080124252, titulada "Droplet Microreactor", publicada el 29 de mayo de 2008; Adachi y col., la publicación de Patente US-20090321262, titulada "Liquid Transfer Device", publicada el 31 de diciembre de 2009; Roux y col., la publicación de Patente US-20050179746, titulada "Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates" publicada el 18 de agosto de 2005; y Dhindsa y col., "Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality", Lab Chip, 10:832-836 (2010). Ciertos accionadores de gotitas incluirán uno o más sustratos dispuestos con un espacio de operaciones de gotitas entre ellos y electrodos asociados con (p. ej., en capas, adheridos y/o incrustados en) los uno o más sustratos y dispuestos para realizar una o más operaciones de gotitas. Por ejemplo, ciertos accionadores de gotitas incluirán un sustrato base (o fondo), electrodos de operaciones de gotitas asociados con el sustrato, una o más capas dieléctricas encima del sustrato y/o electrodos, y opcionalmente una o más capas hidrófobas encima del sustrato, capas dieléctricas y/o los electrodos forman una superficie de operaciones de gotitas. También se puede proporcionar un sustrato superior, que está separado de la superficie de operaciones de gotitas por un espacio, comúnmente denominado espacio de operaciones de gotitas. Diversas disposiciones de electrodos en los sustratos superior y/o inferior se discuten en las patentes y solicitudes mencionadas anteriormente y ciertas disposiciones de electrodos novedosas se discuten en la descripción de la presente memoria. Durante las operaciones de gotitas, se prefiere que las gotitas permanezcan en contacto continuo o en contacto frecuente con un electrodo de tierra o de referencia. Se puede asociar un electrodo de tierra o de referencia con el sustrato superior que mira hacia el espacio, el sustrato inferior que mira hacia el espacio, en el espacio. Cuando se proporcionan electrodos en ambos sustratos, los contactos eléctricos para acoplar los electrodos a un instrumento accionador de gotitas para controlar o monitorizar los electrodos, pueden asociarse con una o ambas placas. En algunos casos, los electrodos de un sustrato se acoplan eléctricamente al otro sustrato de modo que solo un sustrato está en contacto con el accionador de gotitas. En una realización, un material conductor (p. ej., un epoxi, como MASTER BOND™ Polymer System EP79, disponible en Master Bond, Inc., Hackensack, NJ) proporciona la conexión eléctrica entre los electrodos en un sustrato y las trayectorias eléctricas en los otros sustratos, p. ej., un electrodo de tierra en un sustrato superior se puede acoplar a una trayectoria eléctrica en un sustrato inferior mediante tal material conductor. Cuando se utilizan múltiples sustratos, se puede proporcionar un espaciador entre los sustratos para determinar la altura del espacio entre ellos y definir depósitos de dispensación en el accionador. La altura del espaciador puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 µm, 100 µm, 200 µm, 250 µm, 275 µm o más. Como alternativa o adicionalmente, la altura del espaciador puede ser como máximo de aproximadamente 600 µm, 400 µm, 350 µm, 300 µm o menos. El espaciador puede estar formado, por ejemplo, por una capa de proyecciones de los sustratos superior o inferior, y/o un material insertado entre los sustratos superior e inferior. Se pueden proporcionar una o más aberturas en los uno o más sustratos para formar un paso de fluido a través de la cual se puede administrar líquido al espacio de operaciones de gotitas. En algunos casos, las una o más aberturas pueden estar alineadas para la interacción con uno o más electrodos, p. ej., alineadas de manera que el líquido que fluye a través de la abertura se acerque lo suficiente a uno o más electrodos de operación de gotitas para permitir que una operación de gotitas sea efectuada por los electrodos de operaciones de gotitas que utilizan el líquido. En algunos casos, los sustratos base (o inferior) y superior pueden formarse como un componente integral en algunos casos. Se pueden proporcionar uno o más electrodos de referencia en la base (o el fondo) y/o los sustratos superiores y/o en el espacio. Se proporcionan ejemplos de disposiciones de electrodos de referencia en las patentes y solicitudes de patente mencionadas anteriormente. En diversas realizaciones, la manipulación de gotitas por un accionador de gotitas puede estar mediada por electrodos, p. ej., mediada por electrohumectación o mediada por dielectroforesis o mediada por fuerza coulombica. Ejemplos de otras técnicas para controlar operaciones de gotitas que se pueden usar en los accionadores de gotitas de la presente descripción incluyen el uso de dispositivos que inducen presión fluidica hidrodinámica, tales como los que operan sobre la base de principios mecánicos (p. ej., bombas de jeringa externas, bombas de membrana neumática, bombas de membrana vibratoria, dispositivos de vacío, fuerzas centrífugas, bombas piezoeléctricas/ultrasónicas y fuerzas acústicas); principios eléctricos o magnéticos (p. ej., flujo electroosmótico, bombas electrocinéticas, tapones ferrofluidicos, bombas electrohídrodinámicas, atracción o repulsión mediante fuerzas magnéticas y bombas magnetohidrodinámicas); principios termodinámicos (p. ej., generación de burbujas de gas/expansión de volumen

inducida por cambio de fase); otros tipos de principios de humectación de superficies (p. ej., electrohumectación y optoelectrometría, así como gradientes de tensión superficial inducidos química, térmica, estructural y radiactivamente); gravedad; tensión superficial (p. ej., acción capilar); fuerzas electrostáticas (p. ej., flujo electroosmótico); flujo centrífugo (sustrato dispuesto en un disco compacto y girado); fuerzas magnéticas (p. ej., los iones oscilantes causan el flujo); fuerzas magnetohidrodinámicas; y vacío o presión diferencial. En determinadas realizaciones, se pueden emplear combinaciones de dos o más de las técnicas anteriores para realizar una operación de gotitas en un accionador de gotitas de la presente descripción. De manera similar, uno o más de los anteriores pueden usarse para administrar líquido en un espacio de operaciones de gotitas, p. ej., desde un depósito en otro dispositivo o desde un depósito externo del accionador de gotitas (p. ej., un depósito asociado con un sustrato del accionador de gotitas y un paso de flujo desde el depósito hasta el espacio de operaciones de gotitas). Las superficies de operaciones de gotitas de ciertos accionadores de gotitas de la presente descripción pueden estar hechas de materiales hidrófobos o pueden estar revestidas o tratadas para hacerlas hidrófobas. Por ejemplo, en algunos casos, una parte o la totalidad de las superficies de operaciones de gotitas pueden derivatizarse con materiales o compuestos químicos de baja energía superficial, p. ej., mediante deposición o usando síntesis in situ usando compuestos tales como compuestos polifluorados o perfluorados en solución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen TEFLON® AF (disponible en DuPont, Wilmington, DE), miembros de la familia de materiales cytop, revestimientos de la familia FLUOROPEL® de revestimientos hidrófobos y superhidrófobos (disponibles en Cytonix Corporation, Beltsville, MD), revestimientos de silano, revestimientos de fluorosilano, derivados de fosfonato hidrófobos (p. ej., los vendidos por Aculon, Inc) y recubrimientos electrónicos NOVEC™ (disponibles en 3M Company, St. Paul, MN), otros monómeros fluorados para la plasma-enhanced chemical vapor deposition (deposición química en fase de vapor mejorada con plasma - PECVD) y organosiloxano (p. ej., SiOC) para PECVD. En algunos casos, la superficie de operaciones de gotitas puede incluir un revestimiento hidrófobo que tiene un espesor que varía de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1000 nm. Además, en algunas realizaciones, el sustrato superior del accionador de gotitas incluye un polímero orgánico eléctricamente conductor, que después se recubre con un recubrimiento hidrófobo o se trata de otro modo para hacer que la superficie de operaciones de gotitas sea hidrófoba. Por ejemplo, el polímero orgánico eléctricamente conductor que se deposita sobre un sustrato plástico puede ser poli(3,4-etilendioxitiofeno) poli(estirenosulfonato) (PEDOT: PSS). Otros ejemplos de polímeros orgánicos eléctricamente conductores y capas conductoras alternativas se describen en Pollack y col., Publicación de Patente Internacional N.º WO/2011/002957, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods", publicada el 6 de enero de 2011. Se pueden fabricar uno o ambos sustratos usando una printed circuit board (placa de circuito impreso - PCB), vidrio, indium tin oxide (vidrio revestido con óxido de indio y estaño - ITO,) y/o materiales semiconductores como el sustrato. Cuando el sustrato es vidrio revestido con ITO, el revestimiento ITO tiene preferentemente un espesor de al menos aproximadamente 20 nm, 50 nm, 75 nm, 100 nm o más. Como alternativa o adicionalmente, el espesor puede ser como máximo de aproximadamente 200 nm, 150 nm, 125 nm o menos. En algunos casos, el sustrato superior y/o inferior incluye un sustrato de PCB que está revestido con un dieléctrico, tal como un dieléctrico de poliimida, que en algunos casos también puede revestirse o tratarse de otro modo para hacer que la superficie de las operaciones de gotitas sea hidrófoba. Cuando el sustrato incluye un PCB, los siguientes materiales son ejemplos de materiales adecuados: MITSUI™ BN-300 (disponible de MITSUI Chemicals America, Inc., San Jose CA); ARLON™ 11N (disponible en Arlon, Inc, Santa Ana, CA); NELCO® N4000-6 y N5000-30/32 (disponible en Park Electrochemical Corp., Melville, NY); ISOLA™ FR406 (disponible de Isola Group, Chandler, AZ), especialmente IS620; familia de fluoropolímero (adecuada para la detección de fluorescencia, ya que tiene baja fluorescencia de fondo); familia de poliimida; poliéster; polietileno naftalato; policarbonato; polietertercetona; polímero de cristal líquido; cyclo-olefin copolymer (copolímero de cicloolefina - COC); cyclo-olefin polymer (polímero de cicloolefina - COP); aramida; refuerzo de aramida no tejida THERMOUNT® (disponible en DuPont, Wilmington, DE); fibra de marca NOMEX® (disponible de DuPont, Wilmington, DE); y papel. También son adecuados diversos materiales para su uso como componente dieléctrico del sustrato. Los ejemplos incluyen: dieléctrico depositado al vapor, como PARYLENE™ C (especialmente en vidrio), PARYLENE™ N y PARYLENE™ HT (para alta temperatura, ~300 °C) (disponible en Parylene Coating Services, Inc., Katy, TX); Recubrimientos TEFLON® AF; cytop; Máscaras de soldadura, tal como máscaras de soldadura líquidas con fotoimagen (p. ej., en PCB) como las series TAIYO™ PSR4000, TAIYO™ PSR y AUS (disponibles en Taiyo America, Inc. Carson City, NV) (buenas características térmicas para aplicaciones que involucran control térmico), y PROBIMER™ 8165 (buenas características térmicas para aplicaciones que suponen control térmico (disponible de Huntsman Advanced Materials Americas Inc., Los Ángeles, CA); máscara de soldadura de película seca, como las de la línea de máscara de soldadura de película seca VACREL® (disponible en DuPont, Wilmington, DE); película dieléctrica, como película de poliimida (p. ej., película de poliimida KAPTON®, disponible en DuPont, Wilmington, DE), polietileno y fluoropolímeros (p. ej., FEP), politetrafluoroetileno; poliéster; naftalato de polietileno; copolímero de cicloolefina (COC); polímero de cicloolefina (COP); cualquier otro material de sustrato de PCB mencionado anteriormente; resina de matriz negra; polipropileno; y materiales de circuito flexible negros, como DuPont™ Pyralux® HXC y DuPont™ Kapton® MBC (disponible en DuPont, Wilmington, DE). El voltaje y la frecuencia de transporte de las gotitas se pueden seleccionar para el rendimiento con los reactivos utilizados en protocolos de ensayo específicos. Los parámetros de diseño pueden variar, p. ej., el número y la ubicación de depósitos en el accionador, el número de conexiones de electrodo independientes, el tamaño (volumen) de diferentes depósitos, la ubicación de imanes/zonas de lavado de perlas, el tamaño de electrodo, el paso entre electrodos y la altura del espacio (entre los sustratos superior e inferior) se pueden variar para su uso con reactivos específicos, protocolos, volúmenes de gotitas, etc. En algunos casos, un sustrato de la presente descripción puede

derivatizarse con materiales o compuestos químicos de baja energía superficial, p. ej., usando deposición o síntesis in situ utilizando compuestos poli o perfluorados en solución o monómeros polimerizables. Los ejemplos incluyen revestimientos TEFLON® AF y revestimientos FLUOROPEL® para revestimiento por inmersión o pulverización, otros monómeros fluorados para la plasma-enhanced chemical vapor deposition (deposición química en fase de vapor mejorada con plasma - PECVD) y organosiloxano (p. ej., SiOC) para PECVD. Además, en algunos casos, una parte o la totalidad de la superficie de operaciones de las gotitas se puede recubrir con una sustancia para reducir el ruido de fondo, como la fluorescencia de fondo de un sustrato de PCB. Por ejemplo, el revestimiento reductor de ruido puede incluir una resina de matriz negra, como las resinas de matriz negra disponibles en Toray industries, Inc., Japón. Los electrodos de un accionador de gotitas son controlados normalmente por un controlador o un procesador, que a su vez se proporciona como parte de un sistema, que puede incluir funciones de procesamiento, así como almacenamiento de datos y programas informáticos y capacidades de entrada y salida. Los reactivos se pueden proporcionar en el accionador de gotitas en el espacio de operaciones de gotitas o en un depósito acoplado de manera fluida al espacio de operaciones de gotitas. Los reactivos pueden estar en forma líquida, p. ej., gotitas, o pueden proporcionarse en una forma reconstituible en el espacio de operaciones de gotitas o en un depósito acoplado de manera fluida al espacio de operaciones de gotitas. Los reactivos reconstituibles normalmente se pueden combinar con líquidos para su reconstitución. Un ejemplo de reactivos reconstituibles adecuados para su uso con los métodos y aparatos expuestos en la presente descripción, incluye los descritos en Meathrel y col., en la Patente US-7.727.466, titulada "Disintegratable Films for Diagnostic Devices", expedida el 1 de junio de 2010.

"Operación de gotitas" significa cualquier manipulación de una gotita en un accionador de gotitas. Una operación de gotitas puede incluir, por ejemplo: cargar una gotita en el accionador de gotitas; dispensar una o más gotitas de una gotita fuente; dividir, separar o dividir una gotita en dos o más gotitas; transportar una gotita de un lugar a otro en cualquier dirección; fusionar o combinar dos o más gotitas en una sola gotita; diluir una gotita; mezclar una gotita; agitar una gotita; deformar una gotita; retener una gotita en posición; incubar una gotita; calentar una gotita; vaporizar una gotita; enfriar una gotita; deshacerse de una gotita; transportar una gotita de un accionador de gotitas; otras operaciones de gotitas descritas en la presente descripción; y/o cualquier combinación de los anteriores. Los términos "fusionar", "fusión", "combinar", "combinación" y similares se utilizan para describir la creación de una gotita a partir de dos o más gotitas. Debe entenderse que cuando tal término se usa en referencia a dos o más gotitas, se puede usar cualquier combinación de operaciones de gotitas que sea suficiente para dar como resultado la combinación de dos o más gotitas en una gotita. Por ejemplo, "fusionar la gotita A con la gotita B" se puede lograr transportando la gotita A en contacto con una gotita estacionaria B, transportando la gotita B en contacto con una gotita estacionaria A o transportando las gotitas A y B en contacto entre sí. Los términos "partir", "separar" y "dividir" no pretenden implicar ningún resultado en particular con respecto al volumen de las gotitas resultantes (es decir, el volumen de las gotitas resultantes puede ser el mismo o diferente) o el número de gotitas resultantes (el número de gotitas resultantes puede ser 2, 3, 4, 5 o más). El término "mezclar" se refiere a operaciones de gotitas que dan como resultado una distribución más homogénea de uno o más componentes dentro de una gotita. Ejemplos de operaciones de "carga" de gotitas incluyen carga de microdiálisis, carga asistida por presión, carga robótica, carga pasiva y carga de pipetas. Las operaciones de gotitas pueden estar mediadas por electrodos. En algunos casos, las operaciones de gotitas se facilitan aún más mediante el uso de regiones hidrófilas y/o hidrófobas en superficies y/o mediante obstáculos físicos. Para ver ejemplos de operaciones de gotitas, consulte las patentes y solicitudes de patente citadas anteriormente bajo la definición de "accionador de gotitas". En ocasiones, se pueden utilizar técnicas de detección o formación de imágenes de impedancia o capacitancia para determinar o confirmar el resultado de una operación de gotitas. Se describen ejemplos de tales técnicas en Sturmer y col., la Publicación de patente US-20100194408, titulada "Capacitance Detection in a Droplet Actuator", publicada el 5 de agosto de 2010. En términos generales, las técnicas de detección o formación de imágenes se pueden usar para confirmar la presencia o ausencia de una gotita en un electrodo específico. Por ejemplo, la presencia de una gotita dispensada en el electrodo de destino después de una operación de dispensación de gotitas confirma que la operación de dispensación de gotitas fue eficaz. De manera similar, la presencia de una gotita en un punto de detección en una etapa apropiada en un protocolo de ensayo puede confirmar que un conjunto previo de operaciones de gotita ha producido con éxito una gotita para la detección. El tiempo de transporte de las gotitas puede ser bastante rápido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el transporte de una gotita de un electrodo al siguiente puede superar aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente 0,1 segundos, o aproximadamente 0,01 segundos, o aproximadamente 0,001 segundos. En una realización, el electrodo funciona en modo de CA pero se cambia al modo de CC para la obtención de imágenes. Es útil para realizar operaciones de gotitas que el área de huella de la gotita sea similar al área de electrohumectación; en otras palabras, las gotitas de 1x, 2x, 3x se controlan de manera útil utilizando 1, 2 y 3 electrodos, respectivamente. Si la huella de la gotita es mayor que el número de electrodos disponibles para realizar una operación de gotitas en un momento dado, la diferencia entre el tamaño de la gotita y el número de electrodos no debería ser normalmente mayor que 1; en otras palabras, una gotita de 2x se controla de manera útil usando 1 electrodo y una gotita de 3x se controla de manera útil usando 2 electrodos. Cuando las gotitas incluyen perlas, es útil que el tamaño de la gotita sea igual al número de electrodos que controlan la gotita, p. ej., que transportan la gotita.

"Fluido de relleno" significa un fluido asociado con un sustrato de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas, cuyo fluido es suficientemente inmiscible con una fase de gotitas para hacer que la fase de gotitas esté sujeta a operaciones de gotitas mediadas por electrodos. Por ejemplo, el espacio de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas se llena normalmente con un fluido de relleno. El fluido de relleno puede ser, por ejemplo, o incluir un aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de relleno de hexadecano. El fluido de relleno puede ser o incluir un aceite halogenado, tal

como un aceite fluorado o perfluorado. El fluido de relleno puede llenar todo el espacio del accionador de gotitas o puede revestir una o más superficies del accionador de gotitas. Los fluidos de relleno pueden ser conductores o no conductores. Los fluidos de relleno se pueden seleccionar para mejorar las operaciones de las gotitas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias diana de las gotitas, mejorar la formación de microgotitas, reducir la contaminación cruzada entre las gotitas, reducir la contaminación de las superficies del accionador de gotitas, reducir la degradación de los materiales del accionador de gotitas, etc. Por ejemplo, se pueden seleccionar fluidos de relleno para que sean compatibles con los materiales del accionador de gotitas. Como ejemplo, los fluidos de relleno fluorados se pueden emplear de manera útil con revestimientos superficiales fluorados. Los fluidos de relleno fluorados son útiles para reducir la pérdida de compuestos lipofílicos, tales como sustratos de umbeliferona como sustratos de 6-hexadecanoilamido-4-metilumbeliferona (p. ej., para uso en Krabbe, Niemann-Pick u otros ensayos); otros sustratos de umbeliferona se describen en Winger y col., la publicación de Patente US-20110118132, titulada "Enzymatic Assays Using Umbelliferone Substrates with Cyclodextrins in Droplets of Oil", publicada el 19 de mayo de 2011. Ejemplos de aceites fluorados adecuados incluyen los de la línea Galden, tales como Galden HT170 (pe = 170 °C, viscosidad = 1,8 cSt, densidad = 1,77), Galden HT200 (pe = 200 °C, viscosidad = 2,4 cSt, d = 1,79), Galden HT230 (pe = 230 °C, viscosidad = 4,4 cSt, d = 1,82) (todos de Solvay Solexis); los de la línea Novec, como Novec 7500 (pe = 128 °C, viscosidad = 0,8 cSt, d = 1,61), Fluorinert FC-40 (pe = 155 °C, viscosidad = 1,8 cSt, d = 1,85), Fluorinert FC-43 (pe = 174 °C, viscosidad = 2,5 cSt, d = 1,86) (ambos de 3M). En general, la selección de fluidos de relleno perfluorados se basa en la viscosidad cinemática (se prefiere <7 cSt, pero no se requiere) y en el punto de ebullición (se prefiere > 150 °C, pero no se requiere, para su uso en aplicaciones basadas en ADN/ARN [PCR, etc.]). Los fluidos de relleno pueden, por ejemplo, estar dopados con tensioactivos u otros aditivos. Por ejemplo, se pueden seleccionar aditivos para mejorar las operaciones de las gotitas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias diana de las gotitas, la formación de microgotitas, la contaminación cruzada entre gotitas, la contaminación de las superficies del accionador de gotitas, la degradación de los materiales del accionador de gotitas, etc. La composición del fluido de relleno, incluido el dopado con tensioactivo, se puede seleccionar por su rendimiento con los reactivos utilizados en los protocolos de ensayo específicos y la interacción o no interacción eficaz con los materiales del accionador de gotitas. Se proporcionan ejemplos de fluidos de relleno y formulaciones de fluido de relleno adecuados para su uso con los métodos y aparatos expuestos en la presente descripción en Srinivasan y col, la Publicación de Patente Internacional N.º WO/2010/027894, titulada "Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods," publicada el 3 de junio de 2010; Srinivasan y col, la Publicación de Patente Internacional N.º WO/2009/021173, titulada "Use of Additives for Enhancing Droplet Operations," publicada el 12 de febrero de 2009; Sista y col., la Publicación de Patente Internacional N.º WO/2008/098236, titulada "Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads," publicada el 15 de enero de 2009; y Monroe y col, la Publicación de Patente US-20080283414, titulada "Electrowetting Devices", publicada el 20 de noviembre de 2008. En algunos casos, los aceites fluorados pueden estar dopados con tensioactivos fluorados, p. ej., Zonyl FSO-100 (Sigma-Aldrich) y/u otros. Un fluido de relleno es normalmente un líquido. En algunas realizaciones, se puede usar un gas de relleno en lugar de un líquido.

"Depósito" significa un recinto o recinto parcial configurado para contener, almacenar o suministrar líquido. Un sistema accionador de gotitas de la presente descripción puede incluir depósitos dentro del cartucho y/o depósitos fuera del cartucho. Los depósitos en el cartucho pueden ser (1) depósitos en el accionador, que son depósitos en el espacio de operaciones de gotitas o en la superficie de operaciones de gotitas; (2) depósitos fuera del accionador, que son depósitos en el cartucho accionador de gotitas, pero fuera del espacio de operaciones de gotitas, y no en contacto con la superficie de operaciones de gotitas; o (3) depósitos híbridos que tienen regiones en el accionador y regiones fuera del accionador. Un ejemplo de un depósito sin accionador es un depósito en el sustrato superior. Un depósito fuera del accionador está normalmente en comunicación fluida con una abertura o paso de flujo dispuesto para hacer fluir líquido desde el depósito fuera del accionador al espacio de operaciones de gotitas, tal como a un depósito en el accionador. Un depósito fuera del cartucho puede ser un depósito que no forma parte del cartucho accionador de gotitas en absoluto, pero que fluye líquido a alguna parte del cartucho accionador de gotitas. Por ejemplo, un depósito sin cartucho puede ser parte de un sistema o estación de acoplamiento a la que se acopla el cartucho accionador de gotitas durante el funcionamiento. De manera similar, un depósito fuera del cartucho puede ser un recipiente de almacenamiento de reactivos o una jeringa que se usa para forzar el ingreso de fluido en un depósito en el cartucho o en un espacio de operaciones de gotitas. Un sistema que usa un depósito fuera del cartucho incluirá normalmente un medio de paso de fluido mediante el cual el líquido puede transferirse desde el depósito fuera del cartucho a un depósito dentro del cartucho o en un espacio de operaciones de gotitas.

Los términos "arriba", "abajo", "encima", "debajo" y "encendido" se utilizan a lo largo de la descripción con referencia a las posiciones relativas de los componentes de la celda de flujo y/o accionador de gotitas, como las posiciones relativas de sustratos superior e inferior de la celda de flujo y/o el accionador de gotitas. Se apreciará que la celda de flujo y/o el accionador de gotitas es funcional independientemente de su orientación en el espacio.

Cuando un líquido en cualquier forma (p. ej., una gotita o un cuerpo continuo, ya sea en movimiento o estacionario) se describe como "encima", "en" o "sobre" un electrodo, sección, matriz o superficie, dicho líquido podría estar ya sea en contacto directo con el electrodo/sección/matriz/superficie, o podría estar en contacto con una o más capas o películas que se interponen entre el líquido y el electrodo/sección/matriz/superficie. En un ejemplo, el fluido de relleno se puede considerar como una película entre dicho líquido y el electrodo/sección/matriz/superficie.

Cuando una gotita se describe como “sobre” o “cargada” en un accionador de gotitas, debe entenderse que la gotita está dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita el uso del accionador de gotitas para realizar una o más operaciones de gotita en la gotita, estando la gotita dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita la detección de una propiedad o una señal de la gotita, y/o la gotita se ha sometido a una operación de gotita en el accionador de gotitas.

Las realizaciones expuestas en la presente descripción pueden incluir métodos, sistemas, dispositivos y aparatos para análisis biológico o químico usando un esquema de detección magnética. Por ejemplo, las realizaciones pueden usar la detección por sensor magnético para la detección y discriminación de bases durante un protocolo de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS). Diversas realizaciones pueden proporcionar métodos para SBS basado en biosensores magnéticos en una celda de flujo CMOS integrada y/o un accionador de gotitas. En algunas realizaciones, una celda de flujo puede incluir uno o más canales definidos por superficies que pueden tener cadenas molde inmovilizadas en las mismas. Se pueden dirigir diferentes soluciones a través de los canales, según un programa predeterminado, para administrar reactivos para la secuenciación de SBS. En otras realizaciones, los reactivos se pueden administrar mediante gotitas que se controlan en un accionador de gotitas.

En algunas realizaciones, la secuenciación de SBS se puede llevar a cabo mediante una reacción en un solo recipiente (también denominada síntesis en un solo recipiente). Por ejemplo, los cebadores pueden proporcionarse simultáneamente con una polimerasa, análogos de nucleótidos bloqueados de forma reversible y un agente de desbloqueo. Los ácidos nucleicos, la polimerasa, los análogos de nucleótidos bloqueados de forma reversible y el agente de desbloqueo pueden estar presentes en la reacción simultáneamente. La polimerasa es capaz de catalizar la adición de un único análogo de nucleótido bloqueado reversiblemente al cebador para crear un cebador extendido que tiene un extremo 3' bloqueado. El agente de desbloqueo es capaz de desbloquear el extremo 3' del cebador extendido de modo que se puedan añadir análogos de nucleótidos posteriores al cebador extendido. En otra realización más, los nucleótidos pueden no tener un bloqueo en 3' y no se añade un agente de desbloqueo. Los cambios en la resistencia se pueden monitorizar en tiempo real a medida que la polimerasa incorpora nucleótidos sucesivos. Tales realizaciones pueden ser particularmente aplicables para el análisis de moléculas individuales. Debido a que los reactivos están juntos simultáneamente, el cebador se puede extender secuencialmente para incorporar varios análogos de nucleótidos en una reacción de un solo recipiente. Al menos una ventaja de una reacción en un solo recipiente es que no es necesario añadir reactivos a la reacción ni eliminarlos de la reacción, lo que reduce el desperdicio de reactivo causado por transferencias repetitivas de fluidos y aumenta el tiempo de respuesta de la reacción al minimizar las etapas de transferencia fluidica que consumen mucho tiempo. La secuenciación de SBS a través de reacciones de un solo recipiente se describe en la publicación de solicitud de patente US-2013/0085073.

Durante las reacciones de un solo recipiente, los sensores magnéticamente sensibles monitorizan de manera eficaz la cadena complementaria y la detectan cuando se añade un nucleótido a la cadena. En tales realizaciones, el nucleótido o la polimerasa pueden tener la partícula magnética unida a la misma. Por ejemplo, cada tipo de nucleótido puede tener una partícula (o partículas) magnéticas que proporcionen una propiedad magnética única de modo que el nucleótido se distinga de otros tipos de nucleótidos. En otras realizaciones, la polimerasa puede tener las partículas magnéticas unidas a la misma. Como se describe en la presente descripción, diferentes tipos de nucleótidos pueden tener diferentes tasas de incorporación, de modo que las realizaciones pueden identificar el tipo de nucleótido que se añadió.

Como se describe en la presente descripción, las cadenas molde en algunas realizaciones pueden inmovilizarse, por ejemplo, en una superficie de una celda de flujo. Sin embargo, en otras realizaciones, la polimerasa puede inmovilizarse en la superficie de una celda de flujo. La polimerasa puede inmovilizarse dentro de una pequeña cámara de reacción o pocillo. Por ejemplo, la polimerasa puede estar ubicada dentro de un volumen pequeño (p. ej., a escala de zeptolitro) de manera que las partículas magnéticas que se difunden libremente se pueden distinguir fácilmente de las asociadas de manera estable con la polimerasa, basándose en el tiempo en que la señal está presente. Cada volumen puede asignarse a uno o más sensores magnéticamente sensibles.

La polimerasa puede inmovilizarse en una superficie usando enlazadores conocidos. Ejemplos de estos enlazadores incluyen: conjugación de enlazador de NHS-ésteres, isocianatos e isotiocianato con aminas, maleimidas con cisteínas, química de clic con azidas a alquinos, uso de etiquetas de fusión como Halotag, Spytag y otros métodos similares de bioconjugación proteína-proteína. Para obtener más información sobre enlaces ilustrativos que se pueden utilizar, consulte las siguientes referencias: Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2ª Ed., Elsevier, 2008; Zakeri y col., “Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin”, *PNAS* 109(12): E691-E697 (2012); y Liu y col., “Specific Enzyme Immobilization Approaches and Their Application with Nanomaterials”, *Topics in Catalysis* 55(16-18): 1146-1156 (2012).

En una realización ilustrativa, el grupo tiol reducido (-SH) (también llamado grupo sulfhidrido) de un resto de cisteína se puede hacer reaccionar con un anclaje que tenga un grupo reactivo con tiol. Los ejemplos de tales grupos incluyen maleimida y yodoacetamida. Los reactivos tiorreactivos primarios, que incluyen yodoacetamidas, maleimidas, haluros bencílicos y bromometilcetonas, pueden reaccionar mediante S-alquilación de tioles para generar productos de tioéter estables; los reactivos de arilación como los haluros de 7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol (NBD) pueden reaccionar con tioles

o aminas mediante una sustitución similar del haluro aromático por el nucleófilo; y debido a que el anión tiolato es un mejor nucleófilo que el tiol neutro, la cisteína es más reactiva por encima de su pKa. Además, los grupos químicos reactivos con sulfhidrilo incluyen haloacetilo, maleimidaz, aziridinas, acrilóilo, agentes arilantes, vinilsulfonas, piridil disulfuros, TNB-tioles (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico) y agentes reductores de disulfuro; dichos grupos pueden conjugarse con sulfhidrilos mediante alquilación (p. ej., mediante la formación de un enlace tioéter) o intercambio disulfuro (p. ej., formación de un enlace disulfuro). También pueden usarse adecuadamente reacciones de intercambio de sulfhidrilo.

Como alternativa, se pueden direccionar aminas (-NH₂). Por ejemplo, la amina primaria del resto de lisina y el extremo N-terminal del polipéptido son relativamente reactivos. Los restos de amina se pueden dirigir con ésteres de N-hidroxisuccinimida (ésteres de NHS), que pueden formar un enlace amida estable, o reticuladores de imidoéster, que pueden reaccionar con aminas primarias para formar enlaces amidina. Hay muchos otros compuestos reactivos con amina. Por ejemplo, los grupos químicos sintéticos que pueden formar enlaces químicos con aminas primarias incluyen isotiocianatos, isocianatos, acilazidas, ésteres NHS, cloruros de sulfonilo, aldehídos, glioxales, epóxidos, oxiranos, carbonatos, haluros de arilo, imidoésteres, carbodiimidaz, anhídridos y ésteres de fluorofenilo; dichos grupos pueden conjugarse con aminas, por ejemplo, mediante acilación o alquilación. En otras realizaciones más, se puede usar un resto de aminoácido modificado para introducir una nueva funcionalidad como una azida o alquino para usar con la química del clic. Por ejemplo, las reactividades de tiol o amina como las descritas anteriormente se pueden usar con enlazadores que permiten la adición de funcionalidades azida o alquino para usarse adicionalmente en una reacción química del clic.

En algunas realizaciones, la secuenciación puede realizarse causando una reacción designada que une dos restos o separa (p. ej., escinde) dos restos. En muchos casos, la reacción designada puede ser causada química o enzimáticamente. En algunas realizaciones, sin embargo, la reacción designada puede ser causada cambiando una temperatura o característica eléctrica que experimentan los reactivos.

En algunas realizaciones, las partículas magnéticas tienen propiedades o estados magnéticos que son sustancialmente constantes o uniformes. Por ejemplo, las propiedades magnéticas pueden proporcionar un campo magnético constante o uniforme. En otras realizaciones, sin embargo, la propiedad o estado magnético puede ser inducible o sintonizable. Por ejemplo, las propiedades magnéticas se pueden alterar de un estado a otro aplicando energía electromagnética de una frecuencia designada.

Diversas realizaciones también incluyen un sistema y/o un aparato de detección. Como se usa en la presente descripción, un “aparato de detección” incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles y una cámara que permite el flujo de fluido a su través próximo a los sensores magnéticamente sensibles. En diversas realizaciones, el aparato de detección incluye un dispositivo de estado sólido. El flujo de fluido puede ser, por ejemplo, un flujo continuo de líquido, como los descritos en la publicación de solicitud de Patente US-2015/0079596, la Patente US-8.951.781 y la Publicación Internacional N.º WO 2015/089092. Como alternativa, el flujo de fluido también puede dirigirse a través de operaciones de gotitas, tales como operaciones de electrohumección, que se describen con mayor detalle en la presente descripción.

Las realizaciones pueden comprender un esquema de biosensor magnético SBS basado en magnetorresistencia y/o espintrónica. Por ejemplo, una celda de flujo o un accionador de gotitas puede comprender una matriz de sensores magnéticos de alta densidad basada en dispositivos de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) y/o dispositivos de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR). Los dispositivos GMR y los dispositivos TMR también pueden denominarse sensores GMR o sensores TMR, respectivamente. En realizaciones particulares, la matriz de sensores magnéticos puede usarse para detectar grupos clonales amplificados de ADN o cadenas simples de ADN que están marcadas con partículas magnéticas. Las partículas magnéticas pueden ser, por ejemplo, nanopartículas magnéticas y/o single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).

Como se usa en la presente descripción, una matriz de sensores magnéticamente sensibles incluye una pluralidad de sensores que tienen una disposición designada. La matriz puede incluir sensores que se colocan uno al lado del otro en una disposición de rejilla o matriz (p. ej., 10 filas y 10 columnas) o la matriz de sensores puede tener una disposición más dispersa y no uniforme. En algunas realizaciones, los sensores magnéticamente sensibles de la matriz pueden colocarse inmediatamente adyacentes entre sí sin ningún elemento intermedio. En otras realizaciones, sin embargo, los sensores magnéticos de la matriz pueden estar separados entre sí. Opcionalmente, se pueden colocar otros elementos (p. ej., electrodos) entre sensores adyacentes que responden magnéticamente.

En algunas realizaciones, las muestras biológicas o químicas pueden colocarse selectivamente junto a uno o más sensores magnéticos de la matriz antes de detectar señales. Por ejemplo, cada sensor magnéticamente sensible puede asignarse a un área o volumen correspondiente (al que se hace referencia generalmente como un espacio designado) de manera que el sensor que responde magnéticamente está configurado para detectar un campo magnético externo del espacio designado. Como ejemplo específico, las cadenas molde pueden inmovilizarse en una superficie o matriz ubicada en el espacio designado. Como otro ejemplo, la muestra biológica o química se

puede colocar dentro de un hueco (p. ej., un pocillo) que se coloca sobre uno o más sensores magnéticamente sensibles.

Como alternativa, las muestras biológicas o químicas pueden tener posiciones desconocidas a lo largo de la matriz de sensores magnéticos antes de la detección. En tales realizaciones, se puede determinar solo después de la detección de las partículas magnéticas si las partículas magnéticas están dentro de los espacios designados de los sensores magnéticamente sensibles. En tales realizaciones, uno o más de los sensores magnéticamente sensibles pueden no ser capaces de detectar una muestra biológica o química. En otras realizaciones, una pluralidad de sensores magnéticamente sensibles puede estar próxima a una única muestra de manera que cada uno de la pluralidad de sensores puede detectar la misma partícula magnética o puede detectar diferentes partículas magnéticas que están acopladas a la misma muestra.

Como se usa en la presente descripción, expresiones como “una matriz de [elementos]” o “una pluralidad de [elementos]” y similares, cuando se usan en la descripción detallada y las reivindicaciones, no necesariamente incluyen todos y cada uno de los elementos que un componente puede tener. El componente puede tener otros elementos que sean similares a la pluralidad de elementos. Por ejemplo, la expresión “una pluralidad de sensores que responden magnéticamente [que tienen una característica mencionada]” no significa necesariamente que todos y cada uno de los sensores magnéticamente sensibles de un aparato de detección tiene la característica mencionada. Otros sensores magnéticamente sensibles pueden no incluir la característica mencionada. Por consiguiente, a menos que se indique explícitamente lo contrario (p. ej., “todos y cada uno de los sensores magnéticamente sensibles [que tienen una característica mencionada]”), las realizaciones pueden incluir elementos similares que no tienen las características mencionadas.

Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles puede usarse para detectar un cambio en la resistencia eléctrica. Por ejemplo, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles puede tener asociada una resistencia eléctrica. El sensor magnéticamente sensible puede detectar cambios en la resistencia eléctrica que están causados, por ejemplo, por una propiedad magnética de un material situado cerca del sensor magnéticamente sensible. Como se usa en la presente descripción, una “propiedad magnética” puede incluir un campo magnético, una dirección magnética, un momento magnético. La propiedad magnética puede ser causada por materiales que presentan paramagnetismo, diamagnetismo, ferromagnetismo y antiferromagnetismo. La propiedad magnética también puede ser causada, al menos en parte, por los espines de electrones en el material. En algunas realizaciones, la propiedad magnética puede ser inmutable. Sin embargo, en otros casos, la propiedad magnética se puede alterar o inducir.

Por ejemplo, un sensor GMR puede tener una capa conductora que tiene una resistencia eléctrica que es capaz de cambiar cuando está en presencia de un material que tiene una propiedad magnética designada. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden tener respectivos campos magnéticos o momentos magnéticos que causan un cambio en la resistencia. El sensor GMR puede tener una primera resistencia eléctrica cuando el campo magnético externo no está presente y una segunda resistencia eléctrica cuando está presente el campo magnético externo. Asimismo, un sensor TMR puede tener una capa aislante que presenta una corriente de túnel. El flujo de la corriente de túnel se ve impedido por la resistencia eléctrica del sensor TMR. El sensor TMR puede tener una primera resistencia eléctrica cuando el material magnético no está presente y una segunda resistencia eléctrica cuando está presente el material magnético. Las realizaciones de la presente descripción son capaces de determinar una diferencia en la resistencia eléctrica para determinar si el material magnético estaba presente. En algunos casos, el material magnético puede tener diferentes propiedades magnéticas. Como tal, las realizaciones pueden discriminar diferentes campos magnéticos y/o diferentes momentos magnéticos.

Para cada sensor magnéticamente sensible, la circuitería del aparato de detección, como la circuitería incluida en un circuito de lectura, puede transmitir señales que se correlacionan con la resistencia eléctrica en el sensor magnéticamente sensible. Por ejemplo, los circuitos se pueden acoplar eléctricamente a una o más de las capas del sensor magnéticamente sensible, tal como una de las capas ferromagnéticas y/o una de las capas no magnéticas. Las señales de cuando los campos magnéticos externos están presentes y no están presentes pueden compararse para detectar un cambio en la resistencia eléctrica. El cambio en la resistencia eléctrica puede determinar si las partículas magnéticas estaban presentes cuando se transmitieron las señales. Por ejemplo, cualquier cambio sustancial en la resistencia eléctrica puede indicar que las partículas magnéticas están presentes. Además, en algunas realizaciones, se puede analizar una magnitud del cambio para determinar un tipo de partícula magnética que está presente o un número de partículas magnéticas que están presentes. En otras palabras, las realizaciones pueden configurarse para (a) detectar si había algún campo magnético presente en el espacio designado o (b) identificar una fuerza del campo magnético que estaba presente en el espacio designado. Con estos datos, las realizaciones pueden determinar información útil con respecto a la muestra biológica o química. La información útil puede ser, por ejemplo, la identidad de un nucleótido o la secuencia de un ácido nucleico.

Como se describió anteriormente, las realizaciones pueden recibir señales, que representan la resistencia eléctrica, cuando la propiedad magnética está presente y cuando la propiedad magnética no está presente. Estos datos pueden analizarse para determinar un cambio en la resistencia eléctrica. Debe entenderse que las realizaciones también pueden recibir las señales cuando la propiedad magnética tiene un primer estado o calidad y cuando la propiedad magnética tiene

un segundo estado o calidad diferente. De nuevo, estos datos pueden analizarse para determinar un cambio en la resistencia eléctrica. Por ejemplo, el material magnético puede tener una propiedad magnética que se altera o induce. Como ejemplo, una partícula SMM puede ser sensible a un conjunto diferente de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA. El estado magnético de la partícula SMM se puede alterar proporcionando una frecuencia de luz ENCENDIDA o una frecuencia de luz APAGADA. Por tanto, las realizaciones pueden comparar señales que se recibieron después de que se aplicó la frecuencia de luz ENCENDIDA con señales que se recibieron después de que se aplicó la frecuencia de luz APAGADA.

Los ejemplos que se describen a continuación incluyen la determinación de los cambios en la resistencia eléctrica causados por los campos magnéticos solamente. Debe entenderse, sin embargo, que tales cambios pueden ser causados por otras propiedades magnéticas (p. ej., dirección magnética y/o momento) dependiendo de la implementación.

En realizaciones particulares, los dispositivos y métodos pueden usarse para secuenciar grupos clonales amplificados de ADN o cadenas simples de ADN.

En realizaciones particulares, los nucleótidos marcados con hapteno y las nanopartículas magnéticas funcionalizadas se utilizan para la detección y discriminación de un evento de incorporación de nucleótidos en un esquema de biosensor magnético SBS.

En realizaciones particulares, los nucleótidos marcados con SMM se utilizan para la detección y discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS.

En realizaciones particulares, los nucleótidos no marcados y una ADN polimerasa funcionalizada se utilizan para la detección y discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS. En un ejemplo, la ADN polimerasa se funcionaliza (etiqueta) con una partícula magnética, como un imán de una sola molécula.

1.1 Sensores magnetorresistivos para secuenciación de ADN

Las realizaciones expuestas en la presente descripción pueden incluir métodos, sistemas, dispositivos y aparatos para análisis biológico o químico usando un esquema de detección magnética. Por ejemplo, las realizaciones pueden incluir dispositivos y métodos de uso de biosensores magnéticos para la secuenciación de ADN, como para soportar un esquema de biosensor magnético SBS. Es decir, una o más realizaciones proporcionan una celda de flujo y/o un accionador de gotitas que comprende un esquema de biosensor magnético SBS basado en magnetorresistencia y/o espintrónica. La *magnetorresistencia* es la propiedad de un material para cambiar el valor de su resistencia eléctrica cuando se le aplica un campo magnético externo. Ciertos materiales (y dispositivos multicapa) muestran giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR), colossal magnetoresistance (magnetorresistencia colosal - CMR), tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR) y extraordinary magnetoresistance (magnetorresistencia extraordinaria - EMR). Generalmente, la resistencia puede depender de la magnetización (controlada por el campo magnético aplicado) o directamente del campo magnético. La *espintrónica*, también conocida como espinelectrónica o flujotrónica, es una tecnología emergente que aprovecha tanto el espín intrínseco del electrón como su momento magnético asociado, además de su carga electrónica fundamental, en dispositivos de estado sólido. En espintrónica, los espines no solo son manipulados por campos magnéticos, sino también por campos eléctricos.

Una o más realizaciones pueden usar, por ejemplo, una matriz de sensores basados en GMR y/o basados en TMR. Mientras que los mecanismos de detección de los dispositivos SBS convencionales requieren sistemas ópticos voluminosos y costosos, los sensores basados en GMR y/o basados en TMR pueden aprovechar los procesos de fabricación de semiconductores conocidos para hacer matrices de memoria, que se pueden utilizar para fabricar matrices de sensores magnéticos de forma económica. Además, utilizando estos procesos de fabricación de semiconductores conocidos, se pueden implementar matrices de sensores magnéticos de alta densidad en un esquema de biosensor magnético SBS en, por ejemplo, una celda de flujo y/o un accionador de gotitas.

Al hacerlo, las realizaciones pueden proporcionar un dispositivo de secuenciación no óptico, portátil y económico en el que (1) incluso las muestras biológicas más complejas carecen de una señal de fondo magnética detectable, (2) las muestras biológicas no interfieren con el mecanismo de transducción magnética, y (3) la contaminación por sal, pH, fondo de fluorescencia no es un problema con respecto a la biodetección magnética. Además, una o más realizaciones se pueden prestar bien a los diagnósticos (sangre, lisado celular, saliva, orina, etc.). Con respecto a la secuenciación, estas características se prestan a la detección de una sola molécula (en algunas realizaciones, los grupos todavía tienen una ventaja de precisión) y aplicaciones mínimas de preparación de muestras.

Las Figuras 1A y 1B ilustran una vista superior y una vista en sección transversal, respectivamente, de un ejemplo de un sistema 100. En la realización ilustrada, el sistema 100 incluye un aparato 102 de detección (o detector), un sistema 104 de control fluido (Figura 1A) que está en comunicación de flujo con el aparato 102 de detección, un circuito 106 de lectura (Figura 1A), y un circuito 105 de análisis (Figura 1A). El aparato 102 de detección comprende una matriz 110 de sensores magnéticos para soportar, por ejemplo, un esquema de biosensor magnético SBS. Por ejemplo, el aparato 102 de detección incluye un sustrato inferior 108 que incluye una printed circuit board (placa de

circuito impreso - PCB) 112 y una matriz 110 de sensores magnéticos que está montada sobre la PCB 112. El aparato 102 de detección también incluye un sustrato superior 114 (o celda de flujo) que se proporciona en relación con la matriz 110 de sensores magnéticos. La matriz 110 de sensores magnéticos se coloca a lo largo de una superficie 109 de sustrato (Figura 1B) del sustrato inferior 108. Se define una cámara o depósito 118 entre la superficie 109 del sustrato y el sustrato superior 114. La matriz 110 de sensores magnéticos puede incluir una pluralidad de sensores que se colocan cerca de los espacios designados dentro de la cámara 118. Por ejemplo, los sensores pueden tener superficies expuestas que definen la cámara 118. Como alternativa, se pueden colocar una o más capas (p. ej., capa de pasivación) entre la cámara 118 y la matriz 110 de sensores magnéticos. Por ejemplo, la superficie 109 del sustrato puede estar definida por una capa de pasivación. En la realización ilustrada, el sustrato superior 114 y el sustrato inferior 108 están separados por espaciadores 116. En otras realizaciones, el sustrato superior 114 puede tener forma para formar un hueco que se convierte en la cámara 118 cuando el sustrato superior 114 se monta en el sustrato inferior 108.

El sustrato superior 114 puede ser, por ejemplo, un sustrato de vidrio o un sustrato de plástico. En un ejemplo, el sustrato superior 114 tiene aproximadamente 400 μm de espesor. En un ejemplo, los espaciadores 116 son espaciadores adhesivos que tienen aproximadamente 100 μm de altura. En otro ejemplo, los espaciadores 116 son elevadores integrados con el sustrato superior o inferior y tienen aproximadamente 100 μm de altura. La cámara 118 de secuenciación es un canal de flujo que es alimentado por una entrada 120 y una salida 122 en el sustrato superior 114. Es decir, el líquido puede entrar y salir de la cámara 118 de secuenciación usando la entrada 120 y la salida 122.

En un ejemplo, la matriz 110 de sensores magnéticos es una matriz de 10 x 10 en la que el paso de los sensores que responden magnéticamente puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 100 μm . En otro ejemplo, la matriz 110 de sensores magnéticos es una matriz de sensores magnéticos basada en CMOS de alta densidad, como una matriz de 8000 x 8000 en la que el paso de los sensores magnéticamente sensibles es de aproximadamente 200 nm (por dispositivos de 64 Mbit actuales), o una matriz de 100.000 x 100.000 en la que el paso de los sensores de respuesta magnética es de aproximadamente 100 nm (por dispositivos de 10 Gbit actuales). En un ejemplo, la matriz 110 de sensores magnéticos es un dispositivo de 100 nm x 400 nm.

Los sensores magnéticamente sensibles que forman la matriz 110 de sensores magnéticos pueden ser, por ejemplo, dispositivos o sensores basados en GMR o dispositivos o sensores basados en TMR. Los dispositivos basados en GMR o los dispositivos basados en TMR se pueden usar para, por ejemplo, detectar grupos clonales amplificados de ADN o cadenas simples de ADN que están marcadas con, por ejemplo, nanopartículas magnéticas y/o SMM. El sistema 100 puede usarse para otras aplicaciones, tales como aplicaciones de diagnóstico, en las que las sondas u otros restos que tienen partículas magnéticas se unen selectivamente a dianas biológicas o químicas designadas.

Como se muestra en la Figura 1A, el circuito 106 de lectura está separado del aparato 102 de detección. En otras realizaciones, sin embargo, el circuito 106 de lectura puede estar completamente integrado con el aparato 102 de detección. Por ejemplo, el aparato 102 de detección puede incluir un dispositivo de estado sólido, tal como un CMOS, que incluye un circuito que forma al menos una parte del circuito 106 de lectura. En algunas realizaciones, el sustrato inferior 108 puede incluir un dispositivo CMOS.

El circuito 106 de lectura está acoplado comunicativamente a los sensores magnéticamente sensibles que forman la matriz 110. El circuito 106 de lectura está configurado para transmitir señales, que pueden estar basadas en (o indicativas o representativas de) resistencias eléctricas de los sensores magnéticamente sensibles, al circuito 105 de análisis. El circuito 106 de lectura incluye trayectorias conductoras. En algunas realizaciones, el circuito 106 de lectura incluye un circuito que está configurado para modificar las señales antes de transmitir las señales al circuito 105 de análisis. Por ejemplo, el circuito 106 de lectura puede amplificar las señales, digitalizar las señales, convertir las señales basándose en una tabla de consulta, etc. Como alternativa, el circuito 106 de lectura no modifica las señales antes de transmitir las señales al circuito de análisis.

En algunas realizaciones, el circuito 106 de lectura determina una resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles y transmite estos datos al circuito 105 de análisis. En otras realizaciones, el circuito 106 de lectura transmite los datos brutos al circuito 105 de análisis y el circuito de análisis determina la resistencia eléctrica en cada sensor magnéticamente sensible. La resistencia eléctrica se puede calcular utilizando la ley de Ohm u otra fórmula/algoritmo que se base, al menos en parte, en la ley de Ohm. Se puede calcular una resistencia eléctrica, por ejemplo, proporcionando información (p. ej., corriente o voltaje detectados) a una tabla de consulta que convierte la información en una señal o valor que es representativo de la resistencia eléctrica.

El circuito 105 de análisis está configurado para recibir (directa o indirectamente) señales del circuito 106 de lectura y analizar las señales según uno o más algoritmos/fórmulas predeterminados para proporcionar información útil. Opcionalmente, el circuito 105 de análisis puede integrarse con el aparato 102 de detección. Por ejemplo, el circuito de análisis se puede asegurar al sustrato inferior 108.

El circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis pueden determinar un cambio detectado en la resistencia eléctrica en cada uno de los sensores magnéticamente sensibles. Como se usa en la presente descripción, la expresión “determinar un cambio detectado en la resistencia eléctrica” (y similares), no pretende limitarse a un simple cálculo matemático. En algunos casos, la única información necesaria es si la resistencia eléctrica (u otra característica indicativa de la resistencia eléctrica, como la corriente o el voltaje) satisface una determinada condición. Por ejemplo, si la resistencia eléctrica está por debajo de un valor designado, entonces la lectura puede designarse como una lectura positiva (es decir, una partícula magnética estaba presente dentro del espacio designado). Si la resistencia eléctrica está por encima de un valor designado, entonces la lectura puede designarse como una lectura negativa (es decir, no había partículas magnéticas presentes). En el ejemplo anterior, la diferencia entre la resistencia eléctrica y el valor designado es irrelevante. La consulta es solo si la resistencia eléctrica estaba por encima o por debajo del valor designado.

Sin embargo, en otras realizaciones, la cantidad en que la resistencia eléctrica (u otra característica eléctrica) difiere de un valor designado puede ser útil. Por ejemplo, la cantidad de cambio en la resistencia eléctrica puede ser indicativa de la fuerza del campo magnético. La fuerza del campo magnético, a su vez, puede corresponder a varias partículas magnéticas y/o un tipo de partículas magnéticas dentro de un espacio designado.

Por consiguiente, la etapa de determinar un cambio detectado en la resistencia eléctrica puede incluir (a) determinar si existe algún cambio y/o (b) determinar una cantidad del cambio. Además, la etapa de determinar un cambio detectado en la resistencia eléctrica puede incluir el uso de valores que sean representativos de otras características eléctricas (p. ej., corriente, voltaje).

Como ejemplo, el cambio detectado puede determinarse encontrando una diferencia entre un primer valor detectado (p. ej., resistencia eléctrica de partida, corriente de línea base o voltaje de partida) que se obtiene en un primer período de tiempo, como después de una operación de escisión, y un segundo valor detectado que se obtiene en un segundo período de tiempo posterior, como después de un evento de incorporación.

Como otro ejemplo, el cambio detectado puede determinarse solo después de recibir un único valor detectado. Por ejemplo, se puede asignar un umbral designado o un valor de línea de base para cada sensor de respuesta magnética en la matriz. Las lecturas pueden identificarse como positivas o negativas comparando este valor designado con el valor detectado.

En otras realizaciones, el valor detectado se puede aplicar a una tabla de consulta, que puede proporcionar una salida. La salida puede ser indicativa de la fuerza del campo magnético, que, a su vez, puede corresponder a un número de partículas magnéticas y/o un tipo de partículas magnéticas dentro de los espacios designados.

En otras realizaciones, el valor detectado se puede comparar con una pluralidad de valores diferentes. Cada uno de estos valores diferentes puede corresponder a un tipo de partícula magnética. Por ejemplo, si el valor detectado es aproximadamente igual a una primera magnitud, entonces un primer tipo de partícula magnética puede estar dentro del espacio designado. Si el valor detectado es aproximadamente igual a una segunda magnitud, entonces un segundo tipo de partícula magnética puede estar dentro del espacio designado. De manera similar, el valor detectado se puede comparar con una pluralidad de intervalos de valores diferentes. Si el valor detectado está dentro de un primer intervalo, entonces un primer tipo de partícula magnética puede estar dentro del espacio designado. Si el valor detectado está dentro de un segundo intervalo, entonces un segundo tipo de partícula magnética puede estar dentro del espacio designado.

El valor detectado puede representar un valor único que se obtiene en un instante. Sin embargo, en algunos casos, el valor detectado puede obtenerse durante un período de tiempo predeterminado o durante múltiples períodos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, el valor detectado puede ser un valor máximo o mínimo que se detecta durante el período de tiempo o puede ser un valor medio que se detecta durante el período de tiempo. Aún en otras realizaciones, la duración de un cambio en la resistencia eléctrica también puede proporcionar información útil.

El circuito 105 de análisis está configurado para analizar los cambios detectados para proporcionar información útil con respecto a la muestra biológica o química. Por ejemplo, el circuito 105 de análisis puede identificar o buscar al nucleótido que se añadió en cada evento de SBS para determinar una secuencia de un ácido nucleico. Un evento de SBS puede incluir una o más etapas para causar una adición de un nucleótido a una secuencia complementaria y una o más etapas para detectar la adición. Un evento de SBS puede incluir la adición de un solo nucleótido a una pluralidad de grupos (p. ej., cientos, miles de grupos) o puede incluir la adición de un solo nucleótido a una única cadena complementaria. En la presente descripción se describen diversos métodos para identificar el nucleótido. Los métodos pueden incluir los procesos descritos anteriormente para detectar cambios en la resistencia eléctrica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, solo un único cambio detectado es suficiente para identificar el nucleótido. En otras realizaciones, se pueden comparar dos o más cambios detectados para identificar el nucleótido.

En algunas realizaciones, se puede buscar un nucleótido y/o se puede determinar una secuencia comparando, para cada evento de SBS, los cambios detectados asociados con una pluralidad de los sensores magnéticamente

sensibles. Por ejemplo, si un primer sensor magnéticamente sensible tiene una primera resistencia eléctrica, y un segundo sensor magnéticamente sensible tiene una segunda resistencia eléctrica diferente, entonces se puede determinar que las partículas magnéticas que son detectadas por el primer y segundo sensores son diferentes. Si un tercer sensor de respuesta magnética tiene una resistencia eléctrica que es esencialmente igual a la resistencia eléctrica de un cuarto sensor de respuesta magnética, entonces se puede determinar que las partículas magnéticas detectadas por el tercer y cuarto sensor son las mismas.

En algunas realizaciones, se puede buscar un nucleótido y/o se puede determinar una secuencia comparando los diferentes cambios detectados con cada sensor magnéticamente sensible. Por ejemplo, después de un protocolo SBS, un sensor de respuesta magnética puede tener cientos de lecturas diferentes asociadas. Cada lectura puede corresponder a una de las cuatro bases que se incorporan a la cadena complementaria. Partiendo del supuesto de que las partículas magnéticas del mismo tipo (o mismo número) proporcionarán los mismos cambios en la resistencia eléctrica, pueden buscarse los nucleótidos para cada lectura.

El circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis pueden incluir un sistema de equipo físico y/o programas informáticos que opera para realizar una o más funciones. Por ejemplo, el circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis pueden incluir un procesador de ordenador, un controlador u otro dispositivo basado en lógica que realiza operaciones basadas en instrucciones almacenadas en un medio de almacenamiento legible por computadora tangible y no transitorio, tal como una memoria del ordenador. Como alternativa, el circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis pueden incluir un dispositivo cableado que realiza operaciones basadas en la lógica cableada del dispositivo.

El circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis pueden incluir o representar el equipo físico e instrucciones asociadas (p. ej., el programa informático almacenado en un medio de almacenamiento legible por ordenador tangible y no transitorio, como un disco duro de ordenador, ROM, RAM o similar) que realizan una o más operaciones descritas en la presente descripción. El equipo físico puede incluir circuitos electrónicos que incluyen y/o están conectados a uno o más dispositivos basados en la lógica, tales como microprocesadores, procesadores, controladores o similares. Estos dispositivos pueden ser dispositivos listos para usar que están apropiadamente programados o instruidos para realizar las operaciones descritas en la presente descripción a partir de las instrucciones descritas anteriormente. Adicionalmente o como alternativa, uno o más de estos dispositivos pueden estar cableados con circuitos lógicos para realizar estas operaciones.

Como se usa en la presente descripción, una estructura, limitación o elemento que está “configurado para” realizar una tarea u operación se forma, construye o adapta estructuralmente de forma particular de una manera correspondiente a la tarea u operación. Por motivos de claridad y evitar dudas, un objeto que simplemente es capaz de ser modificado para realizar la tarea u operación no está “configurado para” realizar la tarea u operación como se usa en la presente descripción. En cambio, el uso de “configurado para” como se usa en la presente memoria denota adaptaciones o características estructurales, y denota requisitos estructurales de cualquier estructura, limitación o elemento que se describe como “configurado para” realizar la tarea u operación. Por ejemplo, un circuito de lectura o un circuito de análisis que está “configurado para” realizar una tarea u operación puede entenderse como particularmente estructurado para realizar la tarea u operación (p. ej., tener uno o más programas o instrucciones almacenados en el mismo o utilizados junto con ellos adaptados o destinados a realizar la tarea u operación, y/o tener una disposición de circuitos de procesamiento adaptados o destinados a realizar la tarea u operación). Para mayor claridad y evitar dudas, un ordenador de uso general (que puede “configurarse para” realizar la tarea u operación si se programa adecuadamente) no está “configurado para” realizar una tarea u operación a menos que o hasta que se programe específicamente o se modifique estructuralmente para realizar la tarea u operación. Además, se observa que las operaciones realizadas por el circuito 106 de lectura y/o el circuito 105 de análisis (p. ej., operaciones correspondientes a procesos o métodos discutidos en esta descripción, o aspectos de los mismos) pueden ser lo suficientemente complejas como para que las operaciones no las realice un ser humano que está dentro de un período de tiempo razonable.

El sistema y/o el aparato de detección también pueden incluir un sistema de control de fluidos que está configurado para hacer fluir reactivos, según un programa designado, a través de la cámara para realizar un protocolo predeterminado. El sistema de control fluidoico incluye una red de canales, que pueden estar formados por tubos, celdas de flujo u otros dispositivos fluidoicos. El flujo puede ser controlado por una o más válvulas y bombas que se activan selectivamente para administrar el reactivo deseado. El protocolo puede ser un protocolo SBS en el que se proporcionan reactivos, que incluyen una pluralidad de tipos de nucleótidos, enzimas (p. ej., polimerasa) u otros componentes de reacción, en los espacios designados para extender las cadenas molde. El sistema de control de fluidos puede ser similar o funcionar de una manera similar a los sistemas descritos en las publicaciones de solicitud de patente US-2015/0079596 y 2015/0045234; las Patentes US-8.951.781 y 8.173.080; y las Publicaciones Internacionales N.º WO 2014/143010 y WO 2015/089092. Después o durante cada evento de incorporación, el circuito de lectura puede transmitir las señales al circuito de análisis.

En algunas realizaciones, el sistema de control de fluidos proporciona un flujo continuo de reactivos. Sin embargo, en otras realizaciones, el aparato 102 de detección incluye un accionador de gotitas. Por ejemplo, al menos uno de los sustratos superior e inferior 114, 108 puede incluir electrodos para ejecutar operaciones de gotitas. Los electrodos

pueden estar intercalados o distribuidos dentro de la matriz 110 de sensores magnéticos. Como alternativa, la matriz 110 de sensores magnéticos puede colocarse opuesta a los electrodos con la cámara 118 entre ellos en otras realizaciones.

- 5 Las Figuras 2A y 2B muestran un ejemplo de un dispositivo GMR 200 y un dispositivo TMR 205, respectivamente. Tanto el dispositivo GMR 200 como el dispositivo TMR 205 comprenden un par de capas ferromagnéticas separadas por una capa no magnética.

10 Con referencia ahora a la Figura 2A, el dispositivo GMR 200 comprende una primera capa ferromagnética 210, una capa no magnética 212 y una segunda capa ferromagnética 214. La capa 212 no magnética está intercalada entre la capa ferromagnética 210 y la capa ferromagnética 214. La capa ferromagnética 210 y la capa ferromagnética 214 son aleaciones ferromagnéticas. La capa 212 no magnética es una capa ultrafina, no magnética y eléctricamente conductora (p. ej., una capa de cobre).

15 La Figura 2A muestra el dispositivo GMR 200 en dos estados, en donde la dirección de magnetización en la capa ferromagnética 214 se fija o “mantiene” usando una capa de fijación (no mostrada) encima de la capa ferromagnética 214. Primero, el momento magnético en la capa ferromagnética 210 y la capa ferromagnética 214 se enfrentan en direcciones opuestas debido al acoplamiento antiferromagnético. En este estado, la resistencia a la corriente (I) es alta. La capa 212 no magnética de cobre es normalmente un excelente conductor, pero cuando tiene solo unos pocos átomos de espesor, la dispersión de electrones hace que la resistencia del cobre aumente significativamente. Esta resistencia cambia dependiendo de la orientación relativa de los espines de electrones que rodean la capa conductora (es decir, la capa 212 no magnética).

25 A continuación, el estado del dispositivo GMR 200 puede cambiar aplicando un campo magnético externo (H) que supera el acoplamiento antiferromagnético y alinea los momentos magnéticos en la capa ferromagnética 210 y la capa ferromagnética 214. La exposición al campo magnético externo (H) cambia (es decir, reduce) la resistencia del dispositivo para que la estructura pueda usarse para detectar un campo externo. Los dispositivos prácticos a menudo están hechos de múltiples capas de capas magnéticas y no magnéticas alternas para mejorar la sensibilidad. El cambio de resistencia cuando el dispositivo GMR 200 se somete a un campo magnético puede ser normalmente del 10 % a aproximadamente el 20 %, que es grande en comparación con una sensibilidad máxima de un pequeño porcentaje para otros tipos de sensores magnéticos.

35 Con referencia ahora la Figura 2B, el dispositivo TMR 205 comprende la capa ferromagnética 210, la capa 212 no magnética y la capa ferromagnética 214. Sin embargo, cuando la capa 212 no magnética en el dispositivo GMR 200 es eléctricamente conductora, en el dispositivo TMR 205 la capa 212 no magnética es una capa aislante delgada.

40 Cuando dos capas ferromagnéticas (p. ej., la capa ferromagnética 210 y la capa ferromagnética 214) están separadas por una capa aislante delgada (p. ej., la capa 212 no magnética), la resistencia eléctrica de la multicapa en la dirección perpendicular a la película cambia dependiendo de las orientaciones de las magnetizaciones de capas ferromagnéticas debido al efecto túnel de electrones dependiente del espín entre las dos capas ferromagnéticas.

45 La Figura 2B muestra el dispositivo TMR 205 en dos estados, en donde la dirección de magnetización en la capa ferromagnética 214 se fija o “mantiene” usando una capa de fijación (no mostrada) encima de la capa ferromagnética 214. Primero, cuando las direcciones de las magnetizaciones de las dos capas ferromagnéticas son opuestas, el electrón con orientación de espín opuesta con respecto a la magnetización de la capa ferromagnética no puede tunelizarse. Entonces, la corriente de electrones de efecto túnel se vuelve más pequeña (es decir, mayor resistencia) en comparación con el caso de las mismas direcciones de magnetizaciones. A continuación, cuando las direcciones de las magnetizaciones de las dos capas ferromagnéticas son las mismas, la posibilidad de tunelización de electrones entre las dos capas ferromagnéticas a través de la capa aislante aumenta, lo que da como resultado una corriente de tunelización mayor (es decir, menor resistencia).

50 Las geometrías de dispositivo del dispositivo GMR 200 de la Figura 2A y el dispositivo TMR 205 de la Figura 2B se basan en anisotropía paralela, lo que significa que las magnetizaciones de la capa libre y fija son paralelas al plano del sustrato. Sin embargo, la matriz 110 de sensores magnéticos puede basarse en cualquier geometría de dispositivo GMR/TMR conocida. En otro ejemplo, la matriz 110 de sensores magnéticos puede basarse en geometrías de GMR/TMR que utilizan anisotropía perpendicular en lugar de anisotropía paralela, lo que significa que las magnetizaciones de la capa libre y fija son perpendiculares al plano del sustrato.

60 Con respecto al uso de una matriz 110 de sensores magnéticos basados en GMR y/o TMR de la celda 100 de flujo para detectar grupos clonales amplificados de ADN o cadenas simples de ADN que están marcadas con, por ejemplo, nanopartículas magnéticas y/o SMM, la Figura 3 muestra un ejemplo de una gráfica 300 de la sensibilidad de un biochip de GMR usando una sola nanopartícula magnética. Con referencia ahora al gráfico 300, la dependencia del campo uniforme medida de la señal preamplificada demuestra que el cambio de campo mínimo detectable es mejor que 0,1 Oe. Una sola nanopartícula genera el campo uniforme de 0,12 Oe sobre el área del sensor (por simulación), lo que indica que el biochip de GMR puede realizar la detección de una sola nanopartícula (molécula). Se esperaría que el uso

de agrupaciones que comprendan uno o más moldes de moléculas de ADN aumente la intensidad de la señal de lectura.

La Figura 4 es una vista en sección transversal de una parte del aparato 102 de detección mostrado en las Figuras 1A y 1B, y muestra más detalles de los sensores magnéticamente sensibles de la matriz 110 de sensores magnéticos. De nuevo, el aparato 100 de detección comprende la matriz 110 de sensores magnéticos montada en la PCB 112. La Figura 4 muestra que la matriz 110 de sensores magnéticos comprende una pluralidad de sensores 130 magnéticamente sensibles. En algunas realizaciones, los sensores 130 magnéticamente sensibles se pueden disponer en filas y columnas. Sin embargo, se pueden seleccionar otras disposiciones en función de la aplicación deseada. Cada uno de los sensores 130 magnéticamente sensibles puede ser, por ejemplo, un dispositivo basado en GMR (p. ej., el dispositivo 200 de GMR de la Figura 2A) o un dispositivo basado en TMR (p. ej., el dispositivo 205 de TMR de la Figura 2B). Cada uno de los sensores 130 magnéticamente sensibles puede incluir una capa 212 no magnética que está intercalada entre una primera capa ferromagnética 210 y una segunda capa ferromagnética 214. En este ejemplo, la primera capa ferromagnética 210 de cada sensor magnéticamente sensible 130 está orientada hacia la cámara 118. Además, la dirección de la magnetización en la segunda capa ferromagnética 214 se fija o “mantiene” usando una capa 216 de fijación que está adyacente a la segunda capa ferromagnética 214. Aunque la Figura 4 solo ilustra la primera y segunda capas ferromagnéticas 210, 214 y una capa 212 no magnética, debe entenderse que otras realizaciones pueden incluir más de dos capas ferromagnéticas y más de una capa no magnética apiladas entre sí.

Como se muestra, cada uno de los sensores 130 magnéticamente sensibles está configurado para detectar un campo magnético externo que está ubicado o generado dentro de un espacio 131 designado o asociado dentro de la cámara 118. Como se usa en la presente descripción, la expresión “espacio designado” significa un espacio próximo en el que una partícula o partículas magnéticas pueden ser detectadas por un sensor correspondiente magnéticamente sensible. Debe entenderse que el tamaño y la forma del espacio designado pueden basarse en una pluralidad de factores, como el tamaño y la fuerza de las partículas magnéticas, la configuración de los sensores magnéticamente sensibles (p. ej., tamaño, forma y número de capas), o la sensibilidad de los sensores magnéticamente sensibles. Como tal, el espacio designado puede cambiar según la aplicación. Aunque se contempla que un sensor magnéticamente sensible puede detectar un campo magnético externo de un espacio que está adyacente al espacio designado del sensor, este campo magnético externo puede ser relativamente débil y cualquier señal puede identificarse como ruido.

En la realización ilustrada, cada uno de los espacios designados es solo una pequeña porción o volumen de la cámara 118, que se extiende continuamente a lo largo del conjunto 110 de sensores magnéticos de manera que los espacios designados adyacentes no estén físicamente separados por otra materia, como una pared. Sin embargo, en otras realizaciones, los espacios designados pueden estar físicamente separados entre sí. Por ejemplo, cada espacio designado puede existir dentro de un pocillo o hueco que está definido por una o más paredes. Las paredes pueden separar los espacios designados. Para las realizaciones que incluyen accionadores de gotitas, el espacio designado puede estar ocupado por una gotita cuando los reactivos se administran al espacio designado. En tales realizaciones, los espacios designados pueden estar separados entre sí por un fluido de relleno. Sin embargo, también se contempla que una sola gotita pueda ocupar múltiples espacios designados a la vez.

Además, la Figura 4 muestra que el aparato 102 de detección puede incluir una capa 140 que se coloca entre los sensores 130 magnéticamente sensibles y la cámara 118. La Figura 4 también muestra que el aparato 102 de detección puede incluir una capa conductora 150 colocada a lo largo del sustrato superior 114. La capa conductora 150 sobre el sustrato superior 114 puede ser, por ejemplo, una capa de oro o una capa de indium tin oxide (óxido de indio y estaño - ITO). En un ejemplo, la capa conductora 150 puede usarse como un plano de referencia Vdd que es común a todos los sensores 130 magnéticamente sensibles de la matriz 110 de sensores magnéticos.

La capa 140 puede estar formada por cualquier material hidrófilo, material hidrófobo o combinación de material hidrófilo e hidrófobo adecuado para llevar a cabo la química basada en la superficie en la cámara 118. La capa 140 puede tener, por ejemplo, un espesor de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm. En un ejemplo, la capa 140 es un revestimiento de gel de poliacrilamida, tal como una mezcla de norborneno (o norbornileno o norcanfeno) y poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida), también conocida como PAZAM. Se pueden encontrar más detalles sobre PAZAM con referencia a George y col., la publicación de Patente US-2014-0079923A1, titulada “Polymer Coatings”, presentada el 4 de marzo de 2013.

En la Figura 4, una pluralidad de cebadores 142 de oligonucleótidos están inmovilizados en la capa 140 en la cámara 118 y ubicados en relación con los sensores 130 magnéticamente sensibles de la matriz 110 de sensores magnéticos. En un ejemplo, los cebadores 142 de oligonucleótidos son cebadores de captura en los que hibridan y amplifican fragmentos de ADN monocatenario para formar grupos de molde de ADN clonal para SBS.

Como se describe en la presente descripción, en algunas realizaciones, la(s) señal(es) proporcionada(s) durante una reacción de SBS pueden proporcionarse, por ejemplo, mediante la incorporación de un nucleótido o nucleótidos que se marcan directa o indirectamente con una partícula magnética y se detectan utilizando

sensores 130 magnéticamente sensibles tal como se describe con más detalle a continuación. Una partícula magnética puede ser, por ejemplo, una nanopartícula magnética o un SMM

1.2 SBS basada en nanopartículas magnéticas

En una realización, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas y los nucleótidos marcados con hapteno se utilizan para la detección de un evento de incorporación de nucleótidos en un esquema de biosensor magnético SBS. En un ejemplo, los nucleótidos (A, G, C y T) se biotinilan y las nanopartículas magnéticas se recubren con estreptavidina. Por ejemplo, se usa un solo tipo de nanopartícula magnética y se usan cuatro (4) ciclos

fluídicos/de detección para la adición secuencial de nucleótidos en un ciclo de SBS.

Las Figuras 5-12 ilustran diversos métodos que pueden realizarse con los sistemas y aparatos de detección expuestos en la presente descripción. Por ejemplo, un método puede incluir proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles se puede localizar cerca de un respectivo espacio designado para detectar un campo magnético externo del mismo. El aparato de detección también incluye una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. El método también incluye la realización de una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de cada cadena molde. Al menos algunos de los nucleótidos están unidos a partículas magnéticas correspondientes que proporcionan los respectivos campos magnéticos. Cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por los respectivos campos magnéticos de las partículas magnéticas. El método también puede incluir la determinación de secuencias de las cadenas complementarias. Las secuencias de las cadenas complementarias se basan en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.

La Figura 5 muestra una parte de la celda 100 de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4 y representa un ejemplo de un esquema 500 del biosensor magnético SBS. En el esquema 500 del biosensor magnético SBS, se usa un nucleótido biotinilado incorporado para capturar una nanopartícula magnética recubierta de estreptavidina y generar una señal detectable. En este ejemplo, las cadenas 510 molde de ADN (es decir, las cadenas 510a y 510b del molde de ADN) formadas en un proceso de amplificación de agrupaciones se inmovilizan en la capa 140. La cadena 510a molde de ADN es una cadena molde de un primer grupo clonal y la cadena 510b molde de ADN es una cadena molde en un segundo grupo clonal. Los cebadores 515a y 515b de secuenciación, respectivamente, hibridan con las cadenas 510a y 510b molde de ADN. En una reacción de adición de base, se incorpora un nucleótido biotinilado 520 para extender el cebador 515 de secuenciación. El nucleótido biotinilado 520 se describe con más detalle con referencia a la Figura 6. En un ejemplo, el nucleótido biotinilado 520 es dATP. El nucleótido biotinilado 520 se incorpora en la cadena complementaria en crecimiento solo en el molde de ADN 510b (es decir, el dATP no es complementario para la adición de bases en el molde de ADN 510a). Una solución (no mostrada) que contiene una pluralidad de nanopartículas 525 magnéticas recubiertas de estreptavidina se hace fluir a la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. La nanopartícula magnética 525 puede ser, por ejemplo, nanopartículas superparamagnéticas con un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm. La nanopartícula magnética 525 se une al nucleótido biotinilado 520 incorporado mediante la formación de un complejo de unión biotina-estreptavidina. Las nanopartículas magnéticas 525 no unidas se eliminan mediante lavado. La partícula magnética 525 unida al nucleótido incorporado 520 altera la resistencia del sensor magnético 130b y se generan y miden las señales eléctricas correspondientes. Mientras que no hay una nanopartícula magnética 525 unida a la cadena 510a molde de ADN/cebador 515a de secuenciación en el sensor magnético 130a, la señal generada por el sensor magnético 130a es diferente de la señal generada por el sensor magnético 130b.

La Figura 6A ilustra una fórmula estructural parcial del nucleótido biotinilado 520 de la Figura 5. El nucleótido 520 biotinilado incluye un marcador 610 de biotina. El marcador 610 de biotina se une a una base 615 del nucleótido 520 mediante un enlazador 620 escindible. El grupo hidroxilo (OH) de 3' del nucleótido 520 está protegido por un grupo bloqueante 625. Después de la incorporación del nucleótido 520 en una cadena de ADN complementaria en crecimiento y la detección (biosensibilidad magnética) del evento de incorporación, el complejo de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina puede eliminarse del nucleótido 520 mediante la escisión del enlazador 620 escindible. Después de la eliminación del complejo de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina, la señal de detección vuelve a los niveles de fondo. El grupo bloqueante 625 puede eliminarse mediante una reacción de desbloqueo para la incorporación posterior del siguiente nucleótido biotinilado complementario.

La Figura 6B ilustra una fórmula estructural parcial de un nucleótido 650 marcado magnéticamente, que se puede usar en algunas realizaciones. El nucleótido 650 incluye una base 655 y una partícula magnética 660 que está unida al gamma fosfato 665 a través de un enlazador 670. Pueden usarse una variedad de enlazadores y una variedad de partículas magnéticas.

La Figura 7 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 700 de determinación de base en un esquema de biosensor magnético SBS usando, por ejemplo, la celda 100 de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4. El método 700 utiliza la adición sucesiva de nucleótidos biotinilados (es decir, un nucleótido a la vez) y un tipo

de nanopartícula magnética recubierta de estreptavidina (SA) para la determinación de bases. En un ejemplo, el método 700 usa el esquema 500 de biosensor magnético SBS de la Figura 5 y el nucleótido biotinilado 520 de la Figura 6. Con referencia ahora a la Figura 7, el método 700 incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas.

En una etapa 710, se incorpora un primer nucleótido biotinilado 520 en cadenas de ADN complementarias en crecimiento en una reacción de adición de primera base de un ciclo de SBS. El primer nucleótido biotinilado 520 puede administrarse a los espacios designados que tienen las cadenas molde. Por ejemplo, se hace fluir una solución que contiene el primer nucleótido biotinilado 520 (p. ej., nucleótido biotinilado 520a) hacia la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo y a través de los espacios designados para permitir que los primeros nucleótidos biotinilados 520 extiendan las cadenas complementarias en crecimiento. Como otro ejemplo, una gotita de una solución que contiene los primeros nucleótidos biotinilados 520 puede administrarse a cada espacio designado usando las operaciones de gotita descritas en la presente descripción. La gotita puede ocupar el espacio designado durante un período de tiempo predeterminado para permitir que los primeros nucleótidos biotinilados 520 extiendan las cadenas complementarias en crecimiento. En un ejemplo, el primer nucleótido es dATP biotinilado.

En una etapa 715, se introducen nanopartículas magnéticas SA en la celda de flujo. Las nanopartículas magnéticas de SA pueden administrarse a los espacios designados que tienen las cadenas molde y puede detectarse una primera señal. Por ejemplo, una solución que contiene nanopartículas magnéticas 525 de SA puede fluir hacia la cámara 118 de la celda 100 de flujo. Se permite que las nanopartículas magnéticas 525 de SA sean capturadas por los primeros nucleótidos biotinilados 520. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas 525 pueden capturarse mediante un complejo de unión de biotina/estreptavidina en los sitios (grupos). Como otro ejemplo, una gotita de la solución puede administrarse en cada espacio designado usando las operaciones de gotita descritas en la presente descripción. La gotita puede ocupar el espacio designado durante un período de tiempo predeterminado para permitir que las nanopartículas magnéticas SA se unan a los nucleótidos marcados. Una vez que las partículas magnéticas se unen a los nucleótidos marcados, se puede detectar una primera señal. La señal puede ser un cambio en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. El cambio en la resistencia eléctrica puede ser causado por la(s) partícula(s) magnética(s) ubicada(s) dentro de los espacios designados.

En una etapa 720, las partículas magnéticas pueden eliminarse de los nucleótidos marcados. Por ejemplo, los complejos de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina pueden eliminarse de los nucleótidos 520 incorporados mediante la escisión del enlazador 620 escindible. Después de la eliminación de los complejos de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina, la señal vuelve a los niveles de fondo. El grupo bloqueante 625 de nucleótidos 520 puede eliminarse mediante una reacción de desbloqueo para la incorporación posterior del siguiente nucleótido complementario.

La secuenciación de SBS continúa mediante reacciones posteriores de adición de bases. En realizaciones particulares, se pueden llevar a cabo reacciones de adición de una segunda, tercera y cuarta base. Por ejemplo, una solución que contiene un segundo nucleótido biotinilado 520 (p. ej., nucleótido biotinilado 520b) se hace fluir hacia la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. En un ejemplo, el segundo nucleótido es dGTP biotinilado.

En una etapa 725, se introducen nanopartículas magnéticas SA en la celda de flujo y se detecta una segunda señal. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas 525 se capturan mediante un complejo de unión de biotina/estreptavidina en los sitios (grupos) con incorporación de G y se detecta una segunda señal en los sensores magnéticos 130 asociados.

En una etapa 730, los complejos de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina se eliminan de los nucleótidos 520 incorporados mediante la escisión del enlazador 620 escindible. El grupo bloqueante 625 de nucleótidos 520 puede eliminarse mediante una reacción de desbloqueo para la incorporación posterior del siguiente nucleótido complementario. El ciclo de SBS continúa mediante la reacción de adición de la tercera base. Por ejemplo, una solución que contiene un tercer nucleótido biotinilado 520 (p. ej., nucleótido biotinilado 520c) se hace fluir hacia la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. En un ejemplo, el tercer nucleótido es dCTP biotinilado.

En una etapa 735, se introducen nanopartículas magnéticas SA en la celda de flujo y se detecta una tercera señal. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas 525 se capturan mediante un complejo de unión de biotina/estreptavidina en todos los sitios (grupos) con incorporación de C y se detecta una tercera señal en los sensores magnéticos 130 asociados.

En una etapa 740, los complejos de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina se eliminan de los nucleótidos 520 incorporados mediante la escisión del enlazador 620 escindible. El grupo bloqueante 625 de nucleótidos 520 puede eliminarse mediante una reacción de desbloqueo para la incorporación posterior del siguiente nucleótido complementario. El ciclo de SBS continúa mediante la reacción de adición de la cuarta base. Por ejemplo, una solución que contiene un cuarto nucleótido biotinilado 520 (p. ej., nucleótido biotinilado 520d) se hace fluir hacia la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. En un ejemplo, el tercer nucleótido es dTTP biotinilado.

En una etapa 745, se introducen nanopartículas magnéticas SA en la celda de flujo y se detecta una cuarta señal. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas 525 se capturan mediante un complejo de unión de biotina/estreptavidina en todos los sitios (grupos) con incorporación de T y se detecta una cuarta señal en los sensores magnéticos 130 asociados.

5

En una etapa 750 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS de adición de cuatro bases. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 700 pasa a la etapa 755. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 700 finaliza.

10 En una etapa 755, los complejos de nanopartículas magnéticas de biotina/estreptavidina se eliminan de los nucleótidos 520 incorporados mediante la escisión del enlazador 620 escindible. El grupo bloqueante 625 de nucleótidos 520 puede eliminarse mediante una reacción de desbloqueo para la incorporación posterior del siguiente nucleótido complementario. El método 700 vuelve a la etapa 710.

15 En otro ejemplo, un esquema de biosensor magnético SBS de “2 marcadores” utiliza nucleótidos marcados con hapteno y dos tipos diferentes de nanopartículas magnéticas funcionalizadas. En este ejemplo, se utilizan dos ciclos fluidicos/de detección para la discriminación de bases en un ciclo de SBS.

20 La Figura 8 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 800 de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “dos marcadores” usando, por ejemplo, la celda 100 de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4. La Figura 9 ilustra un diagrama esquemático que muestra gráficamente las etapas del método 800 de la Figura 8. En un ejemplo, el método 800 utiliza nucleótidos A biotinilados con un enlace disulfuro escindible (SS) (A-LN3-SS-Biotina), nucleótidos C biotinilados (C-LN3-Biotina) y nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (SA) para detectar la incorporación de A y C, y nucleótidos T marcados con digoxigenina (DIG) (T-LN3-DIG) y nanopartículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) específico para DIG para detectar la incorporación de los nucleótidos T. Los nucleótidos G no están marcados para la detección. Con referencia ahora a la Figura 8, el método 800 incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas.

25

30 En una etapa 810, los nucleótidos se incorporan en complementarias en crecimiento en un ciclo de SBS. El nucleótido puede ser A-LN3-SS-Biotina, C-LN3-Biotina, T-LN3-Dig o G sin marcar. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

35 En una etapa 815, se detecta una primera señal de nucleótidos A o C incorporados. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detecta una primera señal para la incorporación de nucleótidos A o C. Se hace fluir una solución de nanopartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina (SA) a través de la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo y se forman complejos de biotina/estreptavidina en los sitios (grupos) con incorporación de A o C. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

40 En una etapa 820, se hace fluir una solución que incluye nanopartículas magnéticas recubiertas con anti-DIG (Anti-DIG NP) y un separador de disulfuro (SS) a través de la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. La formación del complejo entre los nucleótidos T-LN3-DIG incorporados y el NP anti-DIG identifica de forma selectiva los sitios (grupos) con incorporación de T. El grupo de escisión de SS escinde el enlace disulfuro en los nucleótidos A-LN3-SS-Biotina incorporados y elimina eficazmente los complejos de biotina/estreptavidina a partir de nucleótidos A, eliminando así las señales que pueden generarse en esos sitios. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

45

50 En una etapa 825, se detecta una segunda señal para la incorporación de nucleótidos T. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detecta una segunda señal para la incorporación de nucleótidos T. También se detecta una señal de la incorporación de un nucleótido C. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

55 En una etapa 830, las búsquedas de bases se realizan utilizando un programa bioinformático. En este ejemplo, la incorporación de A y C se detecta en la primera detección de señal. La incorporación de T y C se detectan en la segunda detección de señal. Debido a que el grupo de escisión SS fluyó a través de la celda de flujo en la etapa 820, la señal de los nucleótidos A incorporados está ausente en la detección de la segunda señal. La incorporación de G se determina basándose en la falta de una señal en la primera y segunda detecciones. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

60 En una etapa 835 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 800 pasa a la etapa 840. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 800 finaliza.

65 En una etapa 840, se llevan a cabo una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se utiliza para eliminar las nanopartículas

magnéticas unidas de los nucleótidos incorporados y devolver la señal a los niveles de fondo. El método 800 vuelve a la etapa 810. Esta etapa también se muestra gráficamente en el diagrama esquemático de la Figura 9.

En otras realizaciones, las partículas magnéticas ya pueden estar unidas a uno o más de los nucleótidos cuando los nucleótidos se añaden a la cadena complementaria. Por ejemplo, los nucleótidos que fluyen a través de la cámara de secuenciación para ser añadidos a la cadena complementaria pueden ser A-LN3-SS-Partícula magnética, C-LN3-Biotina, T-LN3-Partícula Magnética y G sin marcar. No es necesario unir las partículas magnéticas a los nucleótidos A y T después de que los nucleótidos se hayan añadido a la cadena complementaria. En su lugar, puede detectarse una primera señal de los nucleótidos A y T incorporados. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detecta una primera señal para la incorporación de nucleótidos A o T.

Posteriormente, se puede hacer fluir una solución que incluye un grupo de escisión de disulfuro (SS) a través de la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo. El grupo de escisión SS escinde el enlace disulfuro en los nucleótidos de Partículas Magnéticas A-LN3-SS incorporados, eliminando así las señales que pueden generarse a partir de esos sitios. Una solución que incluye partículas magnéticas para adherirse a C-LN3-Biotina también puede fluir a través de la cámara 118 de secuenciación.

A continuación, puede detectarse una segunda señal para la incorporación de nucleótidos T y nucleótidos C. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detecta una segunda señal para la incorporación de nucleótidos T y la incorporación de nucleótidos C.

Después de que se detectan la primera y la segunda señales, se pueden realizar búsquedas de bases utilizando un programa bioinformático. En este ejemplo, la incorporación de A y T se detectan en la primera detección de señal. La incorporación de T y C se detectan en la segunda detección de señal. Debido a que el grupo de escisión de SS fluyó a través de la celda de flujo, la señal de los nucleótidos A incorporados está ausente en la detección de la segunda señal. La incorporación de G se determina basándose en la falta de una señal en la primera y segunda detecciones.

Como se describió anteriormente, si no son necesarios más ciclos, se pueden realizar una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se utiliza para eliminar las nanopartículas magnéticas unidas de los nucleótidos incorporados y devolver la señal a los niveles de fondo.

En otro ejemplo más, un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” utiliza nucleótidos modificados y diferentes magnitudes magnéticas para la discriminación de bases. En un ejemplo, se proporcionan diferentes magnitudes magnéticas mediante la captura de una o más nanopartículas magnéticas en los sitios de incorporación de nucleótidos. Por ejemplo, dATP se modifica para capturar una nanopartícula magnética, dTTP se modifica para capturar dos nanopartículas magnéticas, dCTP se modifica para capturar tres nanopartículas magnéticas y dGTP se modifica para capturar cuatro nanopartículas magnéticas. La magnitud de la señal detectada es entonces una función de la base que se incorporó.

En un ejemplo, se usa un nucleótido modificado que comprende un grupo tiol (SH) para capturar un single molecule magnet (imán de molécula única - SMM) que tiene solo un grupo reactivo (p. ej., SMM modificado con maleimida). El nucleótido puede comprender uno, dos, tres o cuatro grupos tiol y capturar uno, dos, tres o cuatro SMM modificados con maleimida, respectivamente. El aldehído (CHO)-aminooxi (o hidrazina) es un ejemplo de otro par químico que puede usarse en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando nucleótidos modificados y SMM.

En otro ejemplo, se utilizan hasta cuatro compuestos químicos ortogonales para la modificación de nucleótidos, de modo que un solo nucleótido puede reclutar de 1 a 4 perlas magnéticamente sensibles. Un ejemplo de un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” se describe con más detalle con referencia a la Figura 10.

En otra realización, pueden usarse nanopartículas que comprenden diferentes materiales paramagnéticos en un esquema de biosensor magnético SBS. Por ejemplo, los materiales paramagnéticos se seleccionan de manera que cada tipo de nanopartícula tenga una respuesta diferente a la frecuencia de un campo magnético externo aplicado. Algunas partículas paramagnéticas pueden tener frecuencias resonantes sintonizables y no se volverían paramagnéticas, o no seguirían bien el campo externo aplicado, a frecuencias no óptimas. Debido a que cada tipo de nanopartícula responde al campo externo aplicado de manera diferente, cada tipo de nanopartícula puede usarse para la discriminación de bases. Pueden usarse nanopartículas que comprenden diferentes materiales paramagnéticos, por ejemplo, en esquemas de biosensores magnéticos SBS de “un marcador”, “dos marcadores” o “cuatro marcadores”.

En otra realización, el diámetro/volumen de las nanopartículas para cada tipo de marcador puede ser diferente. Por ejemplo, 10 nm de diámetro frente a 50 nm de diámetro dan como resultado una diferencia de volumen de aproximadamente 100 veces y una diferencia de área de superficie de aproximadamente 25 veces (la señal se ve afectada tanto por el volumen como por el área de superficie).

La Figura 10 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 1000 de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando, por ejemplo, la celda 100 de flujo mostrada en las Figuras 1A, 1B y 4. En este ejemplo, dATP se modifica para capturar una nanopartícula magnética (o SMM), dTTP se modifica para capturar dos nanopartículas magnéticas (o SMM), dCTP se modifica para capturar tres nanopartículas magnéticas (o SMM) y dGTP se modifica para capturar cuatro nanopartículas magnéticas (o SMM). El método 1000 incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas.

En una etapa 1010, los nucleótidos se incorporan en cadenas complementarias en crecimiento en un ciclo de SBS. El nucleótido puede ser A, T, C o G.

En una etapa 1015, se detectan señales para nucleótidos incorporados. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detectan señales para la incorporación de nucleótidos. Se hace fluir una solución de nanopartículas magnéticas funcionalizadas a través de la cámara 118 de secuenciación de la celda 100 de flujo y se forman complejos de nucleótidos/nanopartículas en todos los sitios (grupos) con incorporación de A, T, C o G.

En una etapa 1020, las búsquedas de bases se realizan en función de la magnitud magnética utilizando un programa bioinformático. En este ejemplo, la incorporación de A es detectada por una señal de primera magnitud, la incorporación de T es detectada por una señal de segunda magnitud, la incorporación de C es detectada por una señal de tercera magnitud, y la incorporación de G es detectada por una señal de cuarta magnitud.

En una etapa 1025 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1000 pasa a la etapa 1030. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1000 finaliza.

En una etapa 1030, se llevan a cabo una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se utiliza para eliminar las nanopartículas magnéticas unidas de los nucleótidos incorporados y devolver la señal a los niveles de fondo. El método 1000 vuelve a la etapa 1010.

En una realización alternativa de la Figura 10, se puede llevar a cabo un método de SBS usando reacciones de un solo recipiente. En este ejemplo, las cadenas molde se pueden inmovilizar en una superficie o la polimerasa se puede inmovilizar en la superficie. Para la reacción de un solo recipiente, los nucleótidos bloqueados reversiblemente que tienen partículas magnéticas unidas a los mismos se proporcionan simultáneamente con un agente de desbloqueo. Para aquellas realizaciones en las que las cadenas molde están inmovilizadas en la superficie, la polimerasa se puede proporcionar con los nucleótidos y el agente de desbloqueo.

En la etapa 1010, los nucleótidos se pueden incorporar en cadenas complementarias en crecimiento. En una etapa 1015, se detectan señales para nucleótidos incorporados. En particular, a medida que la polimerasa añade el nucleótido a la cadena complementaria, los sensores magnéticamente sensibles pueden detectar un cambio en la resistencia eléctrica causado por la presencia de las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas pueden proporcionar un campo magnético externo constante o, como alternativa, pueden inducirse aplicando un estímulo externo.

En la etapa 1020, las búsquedas de bases se realizan basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica. Por ejemplo, la incorporación de A es detectada por una señal de primera magnitud, la incorporación de T es detectada por una señal de segunda magnitud, la incorporación de C es detectada por una señal de tercera magnitud, y la incorporación de G es detectada por una señal de cuarta magnitud.

En una etapa 1030, se llevan a cabo una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se utiliza para eliminar las nanopartículas magnéticas unidas de los nucleótidos incorporados y devolver la señal a los niveles de fondo.

En realizaciones de un solo recipiente, los reactivos no incluyen agentes bloqueantes o agentes de desbloqueo en 3'. La resistencia eléctrica para cada sensor de respuesta magnética se puede monitorizar para identificar eventos de incorporación en tiempo real. Tales realizaciones pueden ser particularmente aplicables para protocolos de molécula única.

Debido a que la realización anterior ilustra una reacción de un solo recipiente, debe entenderse que las etapas 1010, 1015 y 1030 pueden producirse en diferentes momentos para diferentes cadenas de molde. En algunas realizaciones, se pueden controlar una o más de las etapas. Por ejemplo, la etapa 1030 puede realizarse mediante estímulos externos que aplica el sistema. Además, la etapa 1030 puede tener lugar en tiempo real. Como alternativa, la etapa 1030 puede tener lugar después de una pluralidad de eventos de incorporación o después de que se complete la secuenciación de SBS. En otras realizaciones alternativas, tales como protocolos de molécula única, la etapa 1030 no tiene lugar.

1.3 Imán de molécula única SBS

En otra realización, los nucleótidos marcados con single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM) se utilizan para la discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS. Los SMM son una clase de compuestos organometálicos que muestran un comportamiento superparamagnético, p. ej., son magnéticos solo en presencia de un campo magnético externo. Las propiedades magnéticas o los estados de algunos SMM pueden alterarse aplicando un estímulo externo. En un ejemplo, el estado magnético de un SMM se puede cambiar usando luz. Por ejemplo, se puede usar una frecuencia de luz para ENCENDER un SMM y se puede usar otra frecuencia de luz para APAGAR el SMM. Debido a que el estado magnético se puede cambiar, la proporción signal-to-noise (señal/ruido - S/N) se puede mejorar mediante un muestreo repetido. Se pueden seleccionar uno o más SMM de manera que el tamaño del SMM sea compatible con la química de los nucleótidos. En un ejemplo, un SMM puede tener un tamaño de aproximadamente 1,2 nm.

Los SMM que pueden tener sus respectivas propiedades magnéticas o estados cambiados mediante la aplicación de estímulos externos se describen en Feng y col., “Tristability in a Light-Actuated Single-Molecule Magnet”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135 (42), págs. 15880-15884; Mathonière y col., “Photoinduced Single-Molecule Magnet Properties in a Four-Coordinate Iron(II) Spin Crossover Complex”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135 (51), págs. 19083–19086; Christou y col. “Single-molecule magnets”, *Mrs Bulletin* 25.11 (2000): 66-71; “Single-molecule magnets and related phenomena”, Volumen 122 de Structure and bonding Single-molecule magnets and related phenomena, editores Richard Winpenny y Guillem Aromí, Springer (2006); Sato, “Switchable molecular magnets”, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 11 de junio de 2012; 88(6): 213–225; Sato (2003) “Optically switchable molecular solids: Photoinduced spin-crossover, photochromism, and photoinduced magnetization”. *Acc. Chem. Res.* 36, 692–700; Sato y col. (2007) “Control of magnetic properties through external stimuli”. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 2152-2187.

En un ejemplo, un nucleótido marcado con un SMM tiene esencialmente la misma estructura que el nucleótido 520 de la Figura 6. En este ejemplo, el marcador 610 de biotina se reemplaza por uno o más SMM.

En un ejemplo, los SMM se utilizan en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores”. En este ejemplo, cada nucleótido (A, G, C y T) está marcado con un SMM que es sensible a un conjunto diferente de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA. Por ejemplo, la A está marcada con un primer SMM que es sensible a un primer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA, la G está marcada con un segundo SMM que es sensible a un segundo conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA, la C está marcada con un tercer SMM que es sensible a un tercer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA y la T está marcada con un cuarto SMM que es sensible a un cuarto conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA.

La Figura 11 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 1100 de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando nucleótidos marcados con SMM. En este ejemplo, la A está marcada con un primer SMM que es sensible a un primer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA, la G está marcada con un segundo SMM que es sensible a un segundo conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA, la C está marcada con un tercer SMM que es sensible a un tercer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA y la T está marcada con un cuarto SMM que es sensible a un cuarto conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA.

En una etapa 1110, los nucleótidos marcados con SMM se incorporan en cadenas complementarias en crecimiento en un ciclo de SBS. El nucleótido puede ser A, G, C o T.

En una etapa 1115, se usa un primer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA para detectar la incorporación de un primer nucleótido, p. ej., A. Por ejemplo, la frecuencia “ENCENDIDA” se usa para encender el marcador SMM del nucleótido A incorporado y se detecta una señal. La frecuencia de luz “APAGADA” se utiliza para APAGAR el SMM y devolver la señal a los niveles de fondo.

En una etapa 1120, se usa un segundo conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA para detectar la incorporación de un segundo nucleótido, p. ej., G. Por ejemplo, la frecuencia “ENCENDIDA” se usa para encender el marcador SMM del nucleótido G incorporado y se detecta una señal. La frecuencia de luz “APAGADA” se utiliza para APAGAR el SMM y devolver la señal a los niveles de fondo.

En una etapa 1125, se usa un tercer conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA para detectar la incorporación de un tercer nucleótido, p. ej., C. Por ejemplo, la frecuencia “ENCENDIDA” se usa para encender el marcador SMM del nucleótido C incorporado y se detecta una señal. La frecuencia de luz “APAGADA” se utiliza para APAGAR el SMM y devolver la señal a los niveles de fondo.

En una etapa 1130, se usa un cuarto conjunto de frecuencias de luz ENCENDIDA/APAGADA para detectar la incorporación de un cuarto nucleótido, p. ej., T. Por ejemplo, la frecuencia “ENCENDIDA” se usa para encender el marcador SMM del nucleótido T incorporado y se detecta una señal. La frecuencia de luz “APAGADA” se utiliza para APAGAR el SMM y devolver la señal a los niveles de fondo.

En una etapa 1135 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1100 pasa a la etapa 1140. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1100 finaliza.

5 En una etapa 1140, se llevan a cabo una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se usa para retirar el marcador SMM de los nucleótidos incorporados. El método 1100 vuelve a la etapa 1110.

10 En otro ejemplo, los nucleótidos marcados con SMM pueden usarse en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando diferentes magnitudes magnéticas para la discriminación de bases. En un ejemplo, dATP está marcado con un SMM, dGTP está marcado con dos SMM, dCTP está marcado con tres SMM y dTTP está marcado con cuatro SMM. La magnitud de la señal detectada es entonces una función de la base que se incorporó.

15 La Figura 12 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 1200 de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS de “cuatro marcadores” usando nucleótidos marcados con SMM con diferentes magnitudes magnéticas para la discriminación de bases. En este ejemplo, se usa un solo tipo de SMM, pero cada nucleótido está marcado con un número diferente de SMM. Por ejemplo, dATP está marcado con un SMM, dGTP está marcado con dos SMM, dCTP está marcado con tres SMM y dTTP está marcado con cuatro SMM. El método 1200 usa, por ejemplo, la celda 100 de flujo que se muestra en las Figuras 1A, 1B y 4. El método 1200 incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas.

20 En una etapa 1210, los nucleótidos marcados con SMM se incorporan en cadenas complementarias en crecimiento en un ciclo de SBS. El nucleótido puede ser A, G, C o T.

25 En una etapa 1215, se detectan señales para los nucleótidos incorporados usando, por ejemplo, sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo. Se usa una primera frecuencia de luz para ENCENDER los marcadores SMM y se detecta una señal en todos los sitios (grupos) con incorporación de A, G, C o T. Una segunda frecuencia de luz se usa para APAGAR los SMM y regresar la señal a los niveles de fondo.

30 En una etapa 1220, las búsquedas de bases se realizan en función de la magnitud magnética utilizando un programa bioinformático. En este ejemplo, la incorporación de A es detectada por una señal de primera magnitud, la incorporación de G es detectada por una señal de segunda magnitud, la incorporación de C es detectada por una señal de tercera magnitud, y la incorporación de T es detectada por una señal de cuarta magnitud.

35 En una etapa 1225 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1200 pasa a la etapa 1230. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1200 finaliza.

40 En una etapa 1230, se llevan a cabo una reacción de desbloqueo y una reacción de escisión. La reacción de desbloqueo se usa para eliminar un grupo bloqueante en los nucleótidos incorporados para la siguiente adición de nucleótidos en el siguiente ciclo de SBS. La reacción de escisión se utiliza para eliminar los marcadores SMM de los nucleótidos incorporados y devolver la señal a los niveles de fondo. El método 1200 vuelve a la etapa 1210.

45 1.4 ADN polimerasa funcionalizada en biosensor magnético SBS

En otra realización más, los nucleótidos no marcados y una ADN polimerasa funcionalizada se utilizan para la discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS. En un ejemplo, la ADN polimerasa se marca con un imán de una sola molécula y los nucleótidos se diseñan para tener diferentes tasas de incorporación durante la SBS. Por ejemplo, A se modifica para tener una primera tasa de incorporación, G se modifica para tener una segunda tasa de incorporación, C se modifica para tener una tercera tasa de incorporación y T se modifica para tener una cuarta tasa de incorporación. Debido a que la tasa de incorporación es diferente para cada nucleótido, el tiempo en que la ADN polimerasa se asocia con un sitio de incorporación (grupo) es entonces una función de la base que se incorporó. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de tasas de incorporación de nucleótidos.

Tabla 1. Tasas de incorporación de nucleótidos	
Nucleótido	Tasa de incorporación (ms)
dATP	10
dGTP	100
dCTP	500
dTTP	1000

En un ejemplo, el grupo hidroxilo (OH) de 3' de los nucleótidos manipulados no está protegido por un grupo bloqueante. En otro ejemplo, el grupo hidroxilo (OH) de 3' de los nucleótidos manipulados está protegido por un grupo bloqueante.

En una o más realizaciones, tales como las descritas con respecto a la Figura 13, un protocolo SBS puede incluir la adhesión de partículas magnéticas a la polimerasa. La partícula magnética puede ser, por ejemplo, nanopartículas magnéticas o SMM. Más específicamente, en una o más realizaciones, el método de SBS puede incluir proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles. El aparato de detección puede ser similar a los descritos en la presente descripción. Cada uno de los sensores magnéticamente sensibles se puede localizar cerca de un respectivo espacio designado para detectar un campo magnético externo del mismo. El aparato de detección también puede incluir una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados correspondientes. Las cadenas molde pueden inmovilizarse en una superficie. Como alternativa, las cadenas molde se pueden confinar dentro de un volumen designado, como un pocillo o una matriz de gel.

El método también puede incluir la realización de una pluralidad de ciclos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria añadiendo nucleótidos a lo largo de cada cadena molde usando polimerasa. La polimerasa puede tener las correspondientes partículas magnéticas unidas a la misma que proporcionan los respectivos campos magnéticos. Cuando la polimerasa añade nucleótidos a las cadenas molde, la polimerasa puede ubicarse dentro del espacio designado. Como tal, los sensores pueden ser capaces de detectar los campos magnéticos de las partículas magnéticas unidas a la polimerasa.

Cada ciclo de SBS puede incluir detectar cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles. Más específicamente, los cambios detectados pueden ser causados por la presencia de partículas magnéticas en los espacios designados cuando la polimerasa añade los nucleótidos. El método también puede incluir la determinación de secuencias de las cadenas complementarias, tal como se describe en la presente descripción.

La Figura 13 ilustra un diagrama de flujo de un ejemplo de un método 1300 de discriminación de bases en un esquema de biosensor magnético SBS usando una ADN polimerasa marcada con SMM y nucleótidos con diferentes tasas de incorporación. En este ejemplo, los nucleótidos están desbloqueados y tienen tasas de incorporación como se muestra en la Tabla 1.

En una etapa 1310, los nucleótidos se incorporan en cadenas complementarias en crecimiento en un ciclo de SBS. El nucleótido puede ser A, G, C o T. En un ejemplo, cuatro nucleótidos que tienen el mismo tiempo de incorporación fluyen por separado. A continuación, se monitoriza la asociación de la incorporación de polimerasa (que probablemente sea de aproximadamente 30 ms a aproximadamente 100 ms). En otro ejemplo, cuatro nucleótidos que tienen tiempos de incorporación muy diferentes fluyen todos al mismo tiempo.

En una etapa 1315, se detectan señales de la etiqueta de SMM de polimerasa. Por ejemplo, utilizando sensores magnéticos 130 de la celda 100 de flujo, se detecta una señal de la ADN polimerasa marcada con SMM en cada sitio de incorporación de nucleótidos. Se usa una primera frecuencia de luz para ENCENDER las etiquetas de SMM de polimerasa y se detecta una señal en todos los sitios (grupos) con incorporación de A, G, C o T. Una segunda frecuencia de luz se usa para APAGAR la etiqueta de SMM de la polimerasa y regresar la señal a los niveles de fondo.

En una etapa 1320, las búsquedas de bases se realizan basándose en la tasa de incorporación de nucleótidos utilizando el programa bioinformático. En este ejemplo, la incorporación de A se detecta mediante una señal de una primera duración (p. ej., aproximadamente 10 ms), la incorporación de G se detecta mediante una señal de una segunda duración (p. ej., aproximadamente 100 ms), la incorporación de C se detecta mediante una señal de una tercera duración (p. ej., aproximadamente 500 ms) y la incorporación de T se detecta mediante una señal de una cuarta duración (p. ej., aproximadamente 1000 ms).

En una etapa 1325 de decisión, se determina si se desea otro ciclo de SBS. Si se desea otro ciclo de SBS, entonces el método vuelve a la etapa 1310. Si no se desea otro ciclo de SBS, entonces el método 1300 finaliza.

Sin embargo, las realizaciones de la presente solicitud no se limitan a las realizaciones mostradas en las Figuras 1A a 13. Los sensores magnéticos (p. ej., sensores basados en GMR y/o basados en TMR) se pueden usar en combinación con otras estructuras, mecanismos y/o sistemas para dar soporte a un esquema de biosensor magnético SBS; ejemplos de los cuales se muestran y describen a continuación con referencia a las Figuras 14A a 18.

Las Figuras 14A y 14B ilustran una vista en planta y una vista en sección transversal, respectivamente, de la matriz 110 de sensores magnéticos en combinación con un ejemplo de una región semihidrófoba en una celda de flujo o un accionador 1400 de gotitas. La celda de flujo o el accionador 1400 de gotitas incluye una matriz 110 de

sensores magnéticos encima de la PCB 112 en relación con el sustrato superior 114 y la capa conductora 150, como se describe con referencia a la celda 100 de flujo de las Figuras 1A, 1B y 4.

El accionador 1400 de celda de flujo o de gotitas incluye además una región 1410 semihidrófoba encima de la matriz 110 de sensores magnéticos. En este ejemplo, la región semihidrófoba 1410 comprende un sustrato 1418. El sustrato 1418 puede ser, por ejemplo, un sustrato de vidrio o un sustrato de CMOS. En un ejemplo, el sustrato 1418 es un sustrato de dióxido de silicio (SiO₂). La región 1410 semihidrófoba comprende además una pluralidad de nanopocillos 1412 que están modelados en el sustrato 1418. El interior de los nanopocillos 1412 está recubierto con una capa hidrófila 1414 y de ese modo forma nanopocillos hidrófilos 1412. La superficie del sustrato 1418 que está fuera de los nanopocillos 1412 está recubierta con una capa hidrófoba 1416. Además, se proporcionan cebadores 142 de oligonucleótidos dentro de cada uno de los nanopocillos 1412.

La capa hidrófila 1414 dentro de los nanopocillos 1412 puede ser cualquier material hidrófilo adecuado para llevar a cabo la química basada en la superficie en un accionador de gotitas. En un ejemplo, la capa hidrófila 1414 es un recubrimiento de gel de poliacrilamida, como una mezcla de norborneno (o norbornileno o norcanfeno) y poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida), también conocida como PAZAM. En otro ejemplo, la capa hidrófila 1414 comprende Poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida-co-acrilonitrilo), también conocido como PAZAM-PAN. En algunas realizaciones, el PAZAM y/o PAZAM-PAN se pueden modificar para que respondan térmicamente, formando así un gel de poliacrilamida termosensible. Se pueden encontrar más detalles sobre PAZAM con referencia a George y col., la publicación de Patente US-2014-0079923A1, titulada "Polymer Coatings", presentada el 4 de marzo de 2013.

La capa hidrófoba 1416 llena el espacio intersticial entre los nanopocillos 1412. La capa hidrófoba 1416 puede ser cualquier material hidrófobo adecuado para llevar a cabo la química basada en la superficie en un accionador de gotitas. En un ejemplo, la capa hidrófoba 1416 es fluoro-octil-triclorosilano (FOTS), conocido formalmente como (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil) triclorosilano. En otro ejemplo, la capa hidrófoba 1416 es un fotorresistente fluorado (es decir, un fluoropolímero hidrófobo), como el fotodieléctrico ALX2010, disponible en Asahi Glass Co., Ltd. (Tokio, Japón), también conocido como AGC.

En la celda de flujo o el accionador 1400 de gotitas, los nanopocillos 1412 están dispuestos en filas y columnas que tienen posiciones que se corresponden sustancialmente con las filas y columnas de los sensores magnéticos 130 de la matriz 110 de sensores magnéticos. Cada nanopocillo 1412 tiene una cierta profundidad y diámetro. En un ejemplo, los nanopocillos 1412 tienen una profundidad de aproximadamente 350 nm y un diámetro de aproximadamente 400 nm. En otro ejemplo, los nanopocillos 1412 tienen una profundidad de aproximadamente 350 nm y un diámetro de aproximadamente 500 nm.

Las Figuras 15A y 15B ilustran una vista en planta y una vista en sección transversal, respectivamente, de la matriz 110 de sensores magnéticos en combinación con otro ejemplo de una región semihidrófoba 1410 en la celda de flujo o el accionador 1400 de gotitas. En este ejemplo, se invierte la polaridad de la capa hidrófila 1414 y la capa hidrófoba 1416. Es decir, en lugar de que la capa hidrófila 1414 esté en un pocillo con respecto al plano de la capa hidrófoba 1416, la capa hidrófila 1414 está sobre un pedestal con respecto al plano de la capa hidrófoba 1416. Por ejemplo, los nanopocillos 1412 de la región semihidrófoba 1410 descritos en las Figuras 14A y 14B se reemplazan con pedestales 1420. Encima de los pedestales 1420 se encuentra la capa hidrófila 1414 y los cebadores oligonucleotídicos 142, formando así pedestales hidrófilos 1420.

En este ejemplo la celda de flujo o el accionador 1400 de gotitas, los pedestales hidrófilos 1420 están dispuestos en filas y columnas que tienen posiciones que se corresponden sustancialmente con las filas y columnas de los sensores magnéticos 130 de la matriz 110 de sensores magnéticos.

Las Figuras 16A y 16B ilustran una vista en planta y una vista en sección transversal, respectivamente, de una parte de un accionador 1600 de gotitas que incluye una matriz 110 de sensores magnéticos para dar soporte, por ejemplo, a un esquema de biosensor magnético SBS. El accionador 1600 de gotitas incluye un sustrato inferior 1610 y un sustrato superior 1612 que están separados por un espacio 1614 de operaciones de gotitas. El espacio 1614 de operaciones de gotitas contiene fluido 1618 de relleno. El fluido 1618 de relleno es, por ejemplo, aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de relleno de hexadecano. El sustrato inferior 1610 incluye una disposición 1605 de electrodos que comprende, por ejemplo, varias líneas de electrodos 1618 de operación de gotitas (p. ej., electrodos de electrohumectación) que alimentan diversos electrodos 1620 de depósito. Las operaciones de gotitas se llevan a cabo encima de los electrodos 1618 de operaciones de gotitas sobre una superficie de operaciones de gotitas.

Una matriz 110 de sensores magnéticos que tiene un tamaño aproximadamente igual que los electrodos 1618 de operación de gotitas puede proporcionarse en una o más de las líneas de electrodos 1618 de operación de gotitas, como se muestra. En este ejemplo, las porciones del sustrato superior 1612 cerca de los electrodos 1618 de operación de gotitas pueden incluir un electrodo o plano de referencia de tierra (no se muestra), mientras que las porciones del sustrato superior 1612 cerca de la matriz 110 de sensores magnéticos pueden incluir un electrodo o plano de referencia Vdd (no mostrado). Una gotita 1630 (p. ej., una muestra o gotita de reactivo) puede ser transportada mediante operaciones de gotitas a lo largo de los electrodos 1618 de operación de gotitas y al conjunto 110 de sensores magnéticos, en donde pueden producirse ciertas operaciones de biosensores magnéticos, como las descritas con referencia a las Figuras 5 a 13.

En algunas realizaciones, uno o más de los sensores magnéticamente sensibles pueden moverse con respecto a un sustrato de muestra que tiene la muestra biológica o química sobre el mismo. Por ejemplo, un sistema de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS) puede incluir un cabezal de lectura que tiene un brazo y un sensor de respuesta magnética unido al brazo. El sensor magnéticamente sensible puede incluir al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR).

El sistema también puede incluir un sustrato de muestra que tiene una superficie del sustrato. La superficie del sustrato está configurada para tener una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los espacios designados a lo largo de la superficie del sustrato. Al menos uno del cabezal de lectura y el sustrato de muestra están configurados para moverse con respecto al otro para colocar el sensor magnéticamente sensible cerca de los espacios designados en una relación operativa. Más específicamente, el sensor que responde magnéticamente se coloca de manera que se puedan detectar los campos magnéticos externos generados por partículas magnéticas. El sistema también incluye un circuito de lectura que está acoplado comunicativamente al sensor magnéticamente sensible. El circuito de lectura está configurado para transmitir señales que corresponden a una resistencia eléctrica del sensor magnéticamente sensible cuando se coloca en uno de los espacios designados. El circuito de lectura puede ser similar al circuito 106 de lectura (Figura 1).

La Figura 17 ilustra una vista en planta de tal sistema. Más específicamente, la Figura 17 ilustra un instrumento 1700 basado en un disco giratorio en el que se proporciona un sensor magnético móvil para dar soporte, por ejemplo, a un esquema de biosensor magnético SBS. El instrumento 1700 basado en disco giratorio comprende un sustrato 1710 de disco (o sustrato de muestra), que puede ser, por ejemplo, un sustrato de compact disc (disco compacto - CD) de plástico. Se proporciona un conjunto de pistas concéntricas (o ranuras) 1712 en la superficie del sustrato 1710 de disco. El instrumento 1700 basado en disco giratorio incluye además un cabeza 1714 de lectura magnético en un brazo móvil 1716. Es decir, hay un punto de pivote en un extremo del brazo móvil 1716 y el cabezal 1714 de lectura magnético está en el extremo opuesto del brazo móvil 1716. La cabeza 1714 de lectura magnética comprende un sensor magnético, tal como un sensor basado en GMR y/o basado en TMR, tal como un sensor magnético 130 tal como se describe con referencia a las Figuras 1A a 4. Sin embargo, se contempla que el cabezal de lectura magnético pueda incluir más de un sensor magnéticamente sensible.

En el instrumento 1700 basado en disco giratorio, el sustrato 1710 del disco puede girar usando tecnología de CD estándar. Las pistas concéntricas 1712 se pueden poblar con una pluralidad de, por ejemplo, cebadores oligonucleotídicos 142 (no mostrados). De nuevo, los cebadores 142 de oligonucleótidos son cebadores de captura en los que hibridan y se pueden amplificar fragmentos de ADN monocatenario para formar grupos de molde de ADN clonal para SBS.

En un ejemplo, hay aproximadamente 10 pistas concéntricas 1712 con aproximadamente 100 grupos/pista, que son aproximadamente 1000 grupos/disco. Haciendo girar el sustrato 1710 de disco, los reactivos se pueden dispensar y distribuir sobre pistas concéntricas 1712 usando la fuerza centrípeta. Entonces, utilizando el único sensor magnético de la cabeza 1714 de lectura magnética, pueden producirse operaciones de biosensores magnéticos, por ejemplo, a aproximadamente 10 RPM. La distancia entre la cabeza 1714 de lectura magnética y las partículas magnéticas incorporadas o capturadas durante una reacción de incorporación de nucleótidos SBS debe ser adecuadamente pequeña para una buena detección. Los aspectos del instrumento 1700 basado en disco giratorio incluyen un sustrato económico (p. ej., sustrato de CD), ahorros en el bombeo de microfluidos por encima de la cabeza, fluidos rápidos y el sensor o los sensores se puede(n) reutilizar porque el disco está funcionalizado, adecuado para realizar SBS.

Aunque el instrumento 1700 utiliza un disco giratorio. Se contempla que se puedan utilizar otros tipos de movimiento. Por ejemplo, el sustrato de muestra puede incluir un portaobjetos. El portaobjetos y/o el cabezal de lectura pueden moverse para colocar los sensores magnéticamente sensibles con respecto a los espacios designados. Por ejemplo, el portaobjetos y/o el cabezal de lectura pueden acoplarse operativamente a un motor.

En comparación con los sistemas de detección óptica convencionales en aplicaciones de SBS, los dispositivos y métodos de SBS que se describen actualmente que utilizan una matriz de sensores magnéticos para soportar un esquema de biosensores magnéticos SBS proporcionan ciertas ventajas, tales como, entre otras:

- (1) Tamaño pequeño: una matriz de sensores magnéticos ocupa un área mucho más pequeña que los dispositivos optomecánicos. Por ejemplo, un dispositivo de matriz de sensores magnéticos de 1 gigabit puede ocupar un área de aproximadamente 13 cm x 3 cm x 0,1 cm, mientras que la optomecánica puede ocupar un área de aproximadamente 5,08 cm x 5,08 cm x 5,08 cm;
- (2) Simplicidad y bajo coste: un sistema de biosensores magnéticos solo requiere un controlador, mientras que los sistemas de detección óptica requieren etapas de traducción, componentes ópticos y controlador;
- (3) Robustez: un sistema biosensor magnético no tiene partes móviles delicadas, mientras que los sistemas de detección óptica tienen partes móviles delicadas; y
- (4) Velocidad: un esquema de biosensores magnéticos puede ser aproximadamente 6,5 veces más rápido que las imágenes CMOS directas y aproximadamente 100 veces más rápido que la optomecánica de XTen. Por ejemplo,

la biodetección magnética puede admitir una velocidad de datos de 3,2 Gbytes/s; 1,6 mil millones de transferencias por segundo por E/S, que son 1,6 mil millones de grupos por segundo.

Las Figuras 18A y 18B ilustran una vista en planta y una vista en sección transversal, respectivamente, de la matriz 110 de sensores magnéticos en una celda de flujo o un accionador 1800 de gotitas. La celda de flujo o el accionador 1800 de gotitas incluye una matriz 110 de sensores magnéticos encima de la PCB 112 en relación con el sustrato superior 114 y la capa conductora 150, como se describe con referencia a la celda 100 de flujo de las Figuras 1A, 1B y 4.

El accionador 1800 de celda de flujo o de gotitas incluye además una región 1410 semihidrófoba encima de la matriz 110 de sensores magnéticos. En este ejemplo, la región semihidrófoba 1810 comprende un sustrato 1818. El sustrato 1818 puede ser, por ejemplo, un sustrato de vidrio o un sustrato de CMOS. En un ejemplo, el sustrato 1818 es un sustrato de dióxido de silicio (SiO₂). La región semihidrófoba 1810 comprende además una pluralidad de pocillos 1812 (p. ej., nanopocillos) que están modelados en el sustrato 1818. El interior de los nanopocillos 1812 está recubierto con una capa hidrófila 1814 y de ese modo forma nanopocillos hidrófilos 1812. La superficie del sustrato 1818 que está fuera de los nanopocillos 1812 está recubierta con una capa hidrófoba 1816. Además, se proporcionan cebadores 142 de oligonucleótidos dentro de cada uno de los nanopocillos 1812.

La capa hidrófila 1814 dentro de los nanopocillos 1812 puede ser cualquier material hidrófilo adecuado para llevar a cabo la química basada en la superficie en un accionador de gotitas. En un ejemplo, la capa hidrófila 1814 es un recubrimiento de gel de poli(acrilamida), como una mezcla de norborneno (o norbornileno o norcanfeno) y poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida), también conocida como PAZAM. En otro ejemplo, la capa hidrófila 1814 comprende Poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida-co-acrilonitrilo), también conocido como PAZAM-PAN. En algunas realizaciones, el PAZAM y/o PAZAM-PAN se pueden modificar para que respondan térmicamente, formando así un gel de poli(acrilamida) termosensible. Se pueden encontrar más detalles sobre PAZAM con referencia a George y col., la publicación de Patente US-2014-0079923A1, titulada "Polymer Coatings", presentada el 4 de marzo de 2013.

La capa hidrófoba 1816 llena el espacio intersticial entre los nanopocillos 1812. La capa hidrófoba 1816 puede ser cualquier material hidrófobo adecuado para llevar a cabo la química basada en la superficie en un accionador de gotitas. En un ejemplo, la capa hidrófoba 1816 es fluoro-octil-triclorosilano (FOTS), conocido formalmente como (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil) triclorosilano. En otro ejemplo, la capa hidrófoba 1816 es un fotorresistente fluorado (es decir, un fluoropolímero hidrófobo), como el fotodieléctrico ALX2010, disponible en Asahi Glass Co., Ltd. (Tokio, Japón), también conocido como AGC.

En la celda de flujo o el accionador 1800 de gotitas, los nanopocillos 1812 están dispuestos en una matriz que tiene posiciones que corresponden sustancialmente a la matriz 110 de sensores magnéticos 130. Como se muestra en la Figura 18B, cada uno de los nanopocillos puede tener una única polimerasa 1820 que está inmovilizada en un área designada 1822 dentro del nanopocillo 1812. La polimerasa 1820 puede inmovilizarse en el área designada 1822 usando un enlazador, como los descritos anteriormente. Cada una de las polimerasas 1820 está configurada para capturar una cadena molde que tiene un cebador unido a la misma. En la Figura 18B, el protocolo SBS está parcialmente completo.

Con la polimerasa 1820 inmovilizada en la superficie, las realizaciones pueden realizar los diversos protocolos descritos anteriormente en los que los nucleótidos se marcan con partículas magnéticas. Por ejemplo, los procesos que se describen anteriormente con respecto a las Figuras 7-12 se pueden realizar con la polimerasa inmovilizada en la superficie. Como se describe en la presente descripción, los sensores 130 magnéticamente sensibles pueden experimentar un cambio en la resistencia eléctrica cuando la partícula magnética unida al nucleótido se añade a la cadena complementaria. Para cada ciclo, las realizaciones pueden administrar un nucleótido a la vez, de manera que deban realizarse cuatro subciclos separados. Como alternativa, las realizaciones pueden administrar simultáneamente dos o más nucleótidos a la vez. Sin embargo, en otras realizaciones, el protocolo SBS puede llevarse a cabo con reacciones de un solo recipiente.

Aunque el ejemplo anterior se describió con la polimerasa inmovilizada en una superficie en un pocillo, se contempla que la polimerasa se pueda ubicar selectivamente a lo largo de una superficie plana.

Con referencia ahora a la Figura 19, se muestra un dispositivo TMR 1905 en tres etapas diferentes 1951, 1952, 1953 de un protocolo SBS. El dispositivo TMR 1905 puede constituir un sensor de respuesta magnética que puede ser parte de una matriz de sensores incorporada por una celda de flujo y/o un accionador de gotitas. El dispositivo TMR 1905 incluye una primera capa ferromagnética 1910 (o capa de almacenamiento), una capa 1912 no magnética y una segunda capa ferromagnética 1914. La capa 1912 no magnética incluye una capa aislante delgada, como Al₂O₃. Como se describió anteriormente, cuando la primera y segunda capas ferromagnéticas 1910, 1914 están separadas por la capa 1912 no magnética, la resistencia eléctrica de la multicapa en la dirección perpendicular a la película cambia dependiendo de las orientaciones de las magnetizaciones de las capas ferromagnéticas 1910, 1914 debido a Túnel de electrones dependiente del espín entre las dos capas ferromagnéticas 1910, 1914. También mostrado, el dispositivo TMR 1905 incluye una capa 1916 de separación de Ru, una capa 1918 de compensación de flujo y una capa antiferromagnética 1920. El dispositivo TMR 1905

está acoplado eléctricamente y posicionado entre una línea de escritura (p. ej., traza conductora) 1922 y una línea 1924 de lectura.

Como se describió anteriormente, cuando las direcciones de las magnetizaciones de las dos capas ferromagnéticas 1910, 1914 son opuestas (como se muestra en la tercera etapa 1953), el electrón con orientación de espín opuesta con respecto a la magnetización de la capa ferromagnética no puede tunelizarse. Entonces, la corriente de electrones de efecto túnel se vuelve más pequeña (es decir, mayor resistencia) en comparación con el caso de las mismas direcciones de magnetizaciones. Cuando las direcciones de las magnetizaciones de las dos capas ferromagnéticas 1910, 1914 son las mismas (como se muestra en la primera y segunda etapas 1951, 1952), la posibilidad de tunelización de electrones entre las dos capas ferromagnéticas a través de la capa aislante aumenta, lo que resulta en mayor corriente de túnel (es decir, menor resistencia).

Las realizaciones pueden llevar a cabo uno o más de los métodos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, antes de la primera etapa 1951, las cadenas molde 1928 pueden estar inmovilizadas en un área designada de una superficie 1926 de sustrato y los cebadores unidos a las mismas. Durante la primera etapa 1951, los nucleótidos 1930 pueden incorporarse a la cadena complementaria y, posteriormente, pueden proporcionarse partículas magnéticas 1932 que se unen a los nucleótidos 1930 incorporados. Como alternativa, los nucleótidos 1930 pueden tener partículas magnéticas 1932 unidas a los mismos cuando los nucleótidos 1930 se añaden a la cadena complementaria.

Las partículas magnéticas 1932 pueden tener una propiedad magnética que sea capaz de cambiar la primera capa ferromagnética 1910 de modo que la primera capa ferromagnética 1910 mantenga su magnetización después de que la partícula magnética 1932 se elimine como se muestra en la segunda etapa 1952. Más específicamente, la magnetización no es transitoria, sino permanente hasta que la magnetización es cambiada por la línea 1922 de escritura. Esta operación puede ser similar a la operación de la memoria no volátil. En tales realizaciones, el dispositivo TMR 1905 puede leerse en momentos designados y durante un período de tiempo designado a través de la línea 1924a de lectura. En tales realizaciones, el dispositivo TMR 1905 puede ser capaz de lograr una proporción señal/ruido más alta que los dispositivos TMR que no tienen capas de almacenamiento que mantienen sus estados magnéticos. Después de leer el dispositivo TMR 1905, la línea 1922 de escritura puede tener un flujo de corriente eléctrica a través de ella para cambiar la magnetización de la primera capa ferromagnética 1910. El protocolo de SBS puede entonces repetir otro ciclo de SBS.

La descripción detallada anterior de realizaciones se refiere a los dibujos adjuntos, que ilustran realizaciones específicas de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS) que comprende:

5 un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, cada uno de los sensores magnéticamente sensibles incluye al menos dos capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa las dos capas ferromagnéticas, formándose cada uno de los sensores magnéticamente sensibles en al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), estando colocados los sensores magnéticamente sensibles
10 adyacentes a los espacios designados correspondientes dentro de una cámara y configurados para detectar partículas magnéticas de los correspondientes espacios designados; incluyendo el aparato de detección una pluralidad de nanopocillos separados por espacios intersticiales, en donde los espacios designados comprenden una capa hidrófila dentro de los nanopocillos o los espacios intersticiales y una pluralidad de cadena molde de ácido nucleico ubicada dentro de los espacios designados;
15 un circuito de lectura acoplado comunicativamente a los sensores magnéticamente sensibles, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir señales que se corresponden con las resistencias eléctricas de los sensores magnéticamente sensibles; y
20 un sistema de control de fluidos configurado para hacer fluir reactivos a través de la cámara para realizar un protocolo de SBS, incluyendo los reactivos una pluralidad de tipos de nucleótidos, en donde el circuito de lectura está configurado para transmitir las señales después de cada evento de incorporación.

- 25 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sistema de control de fluidos está configurado para:

(a) hacer fluir los nucleótidos a los espacios designados para añadir los nucleótidos a las cadenas complementarias; y
30 (b) hacer fluir partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los nucleótidos, presentando las partículas magnéticas una correspondiente propiedad magnética detectable;

en donde el circuito de lectura está configurado para detectar la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles después de (b).

- 35 3. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sistema de control de fluidos está configurado para:

(a) administrar nucleótidos a los espacios designados para añadir los nucleótidos a las cadenas complementarias, incluyendo los nucleótidos al menos un primer, segundo y tercer nucleótidos, teniendo el primero, segundo, y tercer nucleótidos diferentes bases;
40 (b) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los primeros nucleótidos y a los segundos nucleótidos;
(c) administrar partículas magnéticas a los espacios designados, adhiriéndose las partículas magnéticas a los terceros nucleótidos;

45 en donde el circuito de lectura está configurado para detectar la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles después de (b) y después de (c).

- 50 4. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada espacio designado está en una capa hidrófila que está rodeada por una capa hidrófoba.

5. Un método de sequencing-by-synthesis (secuenciación por síntesis - SBS) que comprende:

55 proporcionar un aparato de detección que incluye una matriz de sensores magnéticamente sensibles, incluyendo cada uno de los sensores magnéticamente sensibles al menos dos capas ferromagnéticas y una capa no magnética que separa las dos capas ferromagnéticas, formando cada uno de los sensores magnéticamente sensibles al menos uno de un sensor de giant magnetoresistance (magnetorresistencia gigante - GMR) o un sensor de tunnel magnetoresistance (magnetorresistencia de túnel - TMR), estando cada uno de los sensores de
60 respuesta magnética ubicado cerca de un área designada respectiva dentro de una cámara para detectar una propiedad magnética de la misma, incluyendo el aparato de detección también una pluralidad de nanopocillos separados por espacios intersticiales, en donde los espacios designados comprenden una capa hidrófila dentro de los nanopocillos o en los espacios intersticiales, y una pluralidad de cadenas molde de ácido nucleico ubicadas dentro de los
65 espacios designados;

- llevar a cabo una pluralidad de eventos de SBS para hacer crecer una cadena complementaria incorporando nucleótidos a lo largo de una cadena molde correspondiente, estando los nucleótidos unidos a las correspondientes partículas magnéticas que tienen sus respectivas propiedades magnéticas, en donde cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye la detección de cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles causados por las respectivas propiedades magnéticas de las partículas magnéticas cuando los nucleótidos se añaden a la cadena complementaria; en donde los nucleótidos incluyen múltiples tipos de nucleótidos, cada uno de los cuales tiene un número diferente de partículas magnéticas unidas a los mismos que otros tipos de nucleótidos, produciendo así magnitud variable en la resistencia eléctrica durante múltiples períodos de tiempo predeterminados; y
- determinar las características genéticas de las cadenas complementarias basándose en los cambios detectados en la resistencia eléctrica, incluida la magnitud variable de la resistencia eléctrica durante múltiples períodos de tiempo predeterminados.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la determinación de la característica genética de las cadenas complementarias incluye analizar los cambios detectados en la resistencia eléctrica para determinar si las señales basadas en los cambios detectados forman un patrón designado.
 7. El método de la reivindicación 5, en donde determinar las características genéticas incluye determinar secuencias de las cadenas complementarias, basándose las secuencias de las cadenas complementarias en los cambios detectados en la resistencia eléctrica que se produjeron en los sensores magnéticamente sensibles para cada uno de la pluralidad de eventos de SBS.
 8. El método de la reivindicación 7, en donde determinar las secuencias de las cadenas complementarias incluye determinar las magnitudes de los cambios en la resistencia eléctrica en los sensores magnéticamente sensibles.
 9. El método de la reivindicación 5, en donde los múltiples tipos de nucleótidos incluyen dATP modificado con una nanopartícula magnética, dTTP modificado con dos nanopartículas magnéticas, dCRP modificado con tres nanopartículas magnéticas y dGTP modificado con cuatro nanopartículas magnéticas.
 10. El método de la reivindicación 9, en donde las partículas magnéticas son single-molecule magnets (imanes de molécula única - SMM).
 11. El método de la reivindicación 5, en donde cada uno de la pluralidad de eventos de SBS incluye administrar múltiples tipos de nucleótidos simultáneamente.
 12. El método de la reivindicación 5, en donde se inmoviliza una polimerasa en las áreas designadas, configurada la polimerasa para capturar una cadena molde correspondiente.
 13. El método de la reivindicación 12, en donde una o más de las partículas magnéticas están unidas al gamma fosfato de cada nucleótido, liberándose la partícula magnética cuando la polimerasa añade el nucleótido a la cadena complementaria.
 14. El método de la reivindicación 5, en donde las partículas magnéticas cambian permanentemente las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticamente sensibles de modo que las magnetizaciones de los correspondientes sensores magnéticamente sensibles se mantienen después de que se eliminan las partículas magnéticas, en donde el método incluye cambiar la magnetización de al menos algunos de los sensores magnéticamente sensibles después de leer los sensores magnéticamente sensibles; opcionalmente en donde leer los sensores magnéticamente sensibles se produce después de que se hayan eliminado las partículas magnéticas.

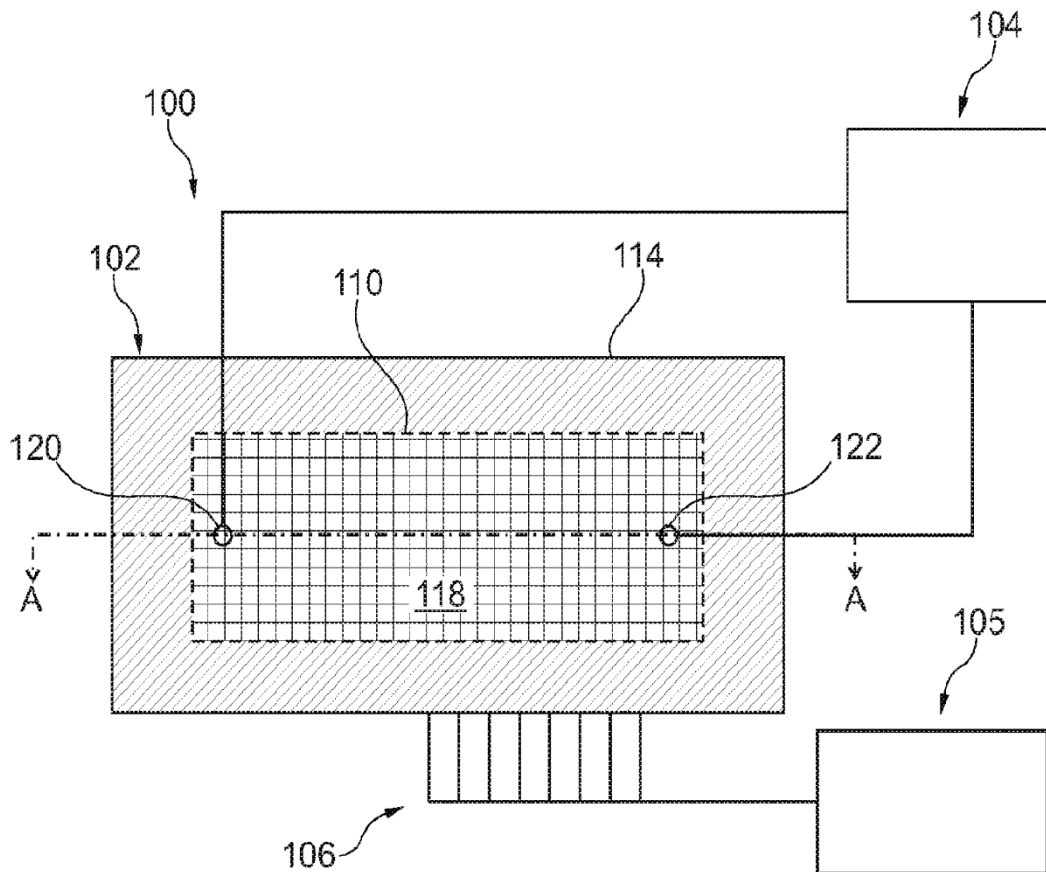


Fig. 1A

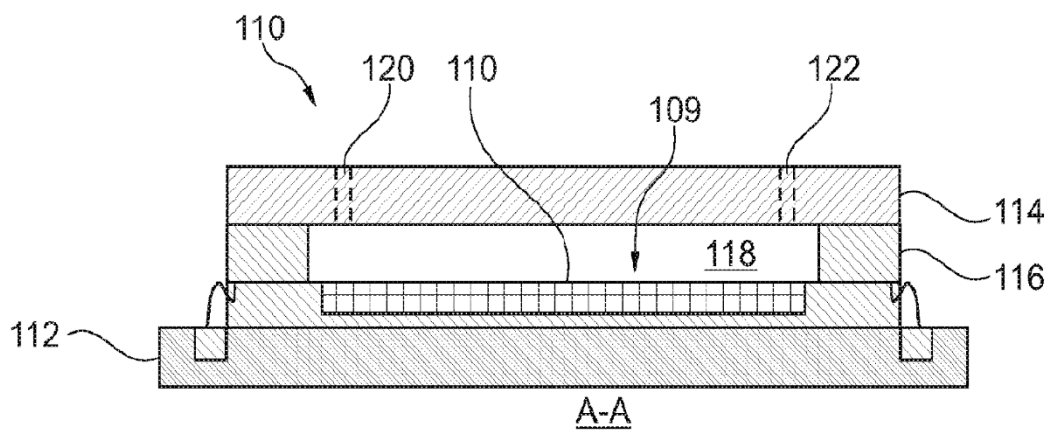


Fig. 1B

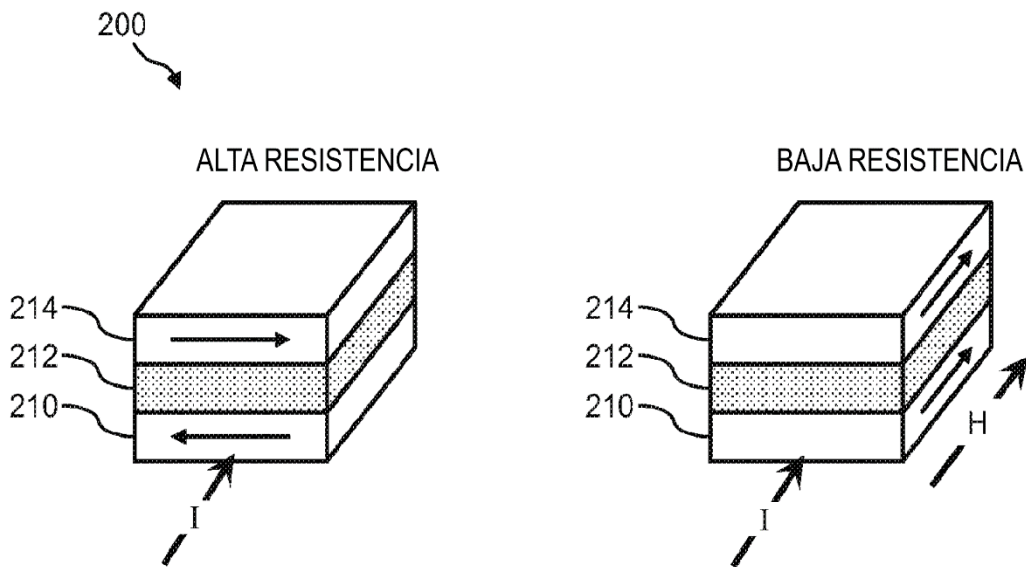


Figura 2A

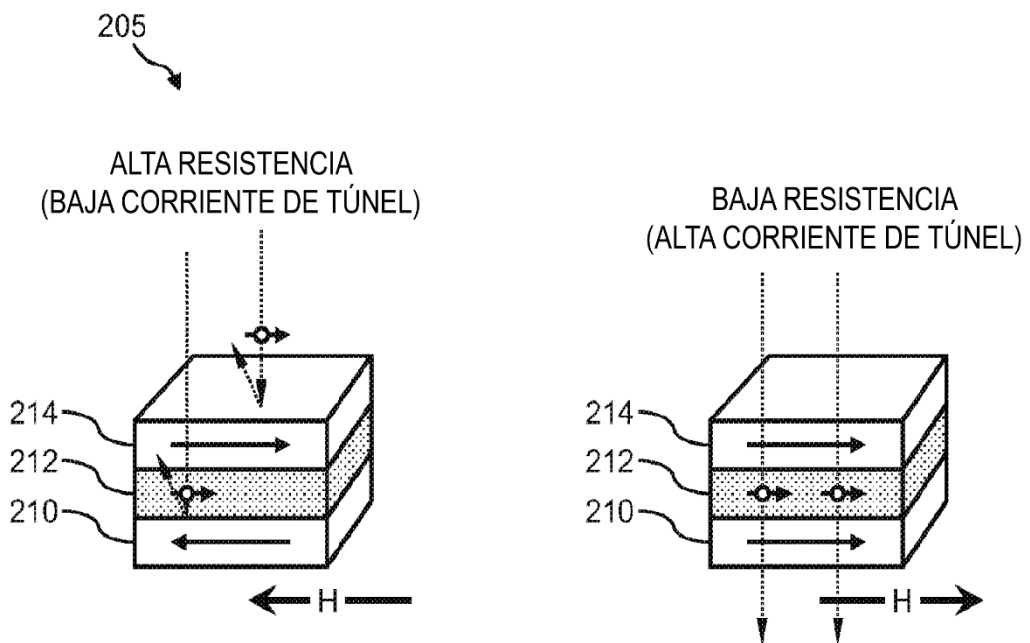


Figura 2B

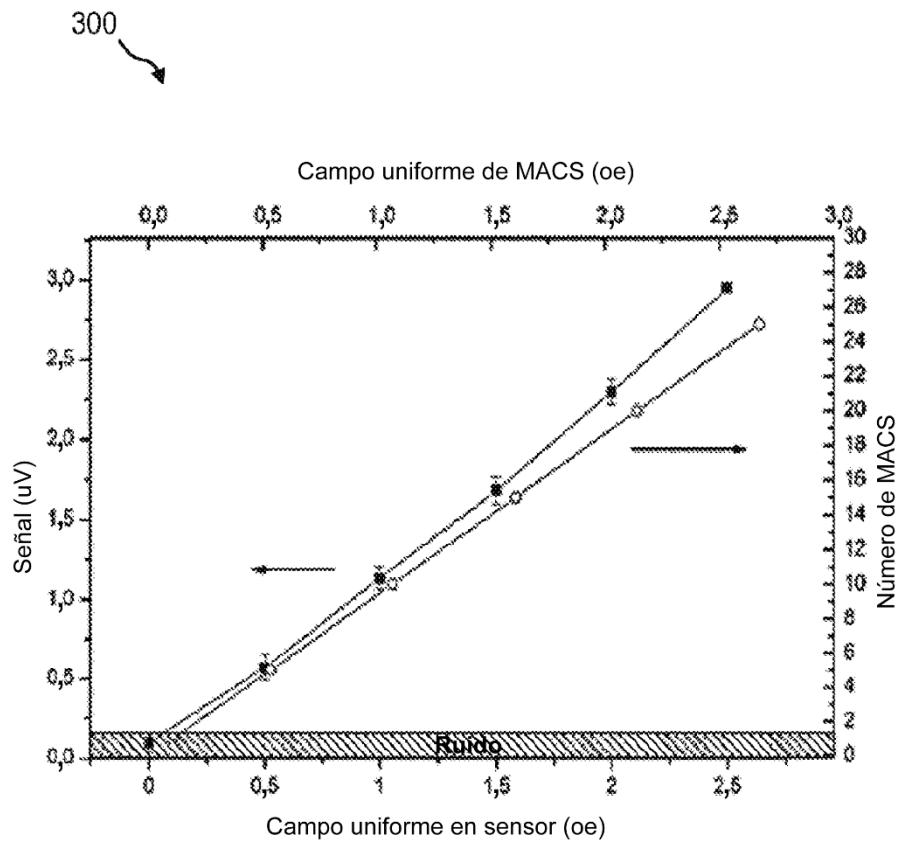


Figura 3

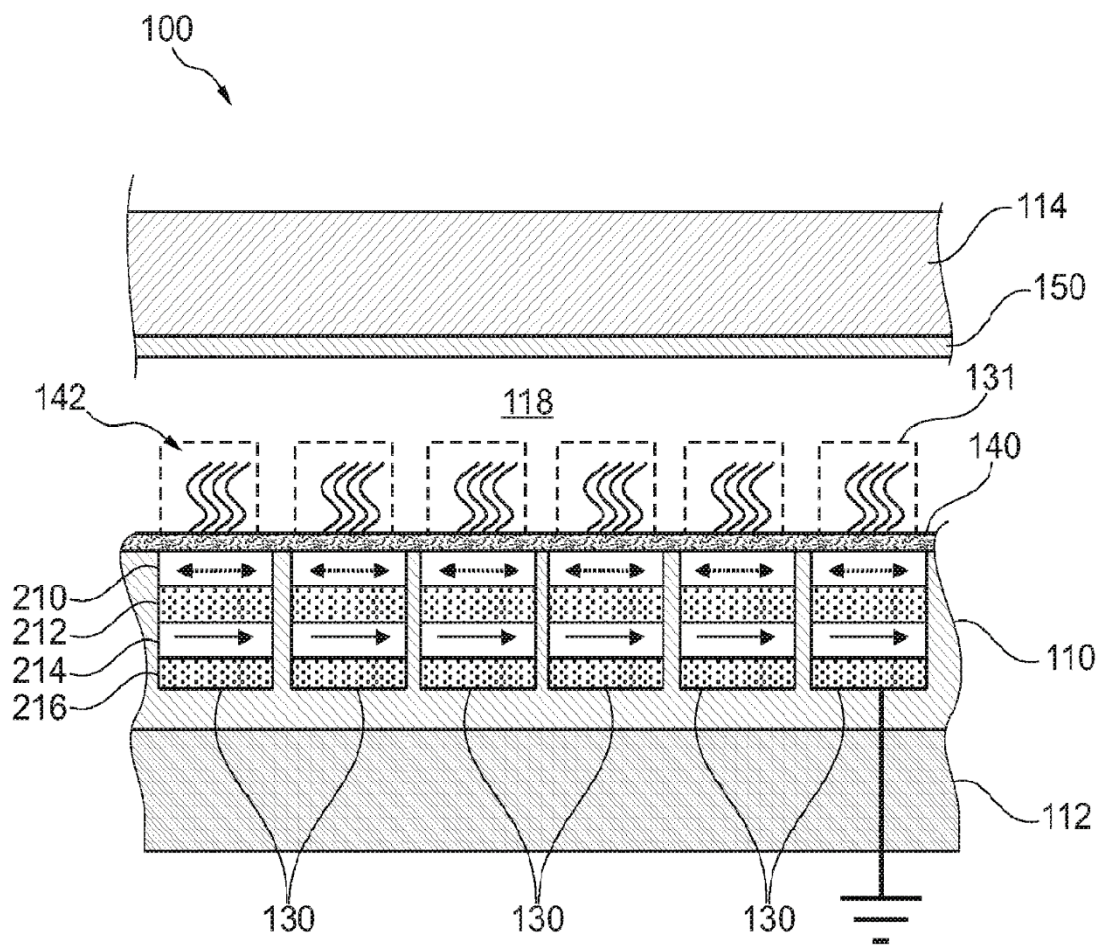


Fig. 4

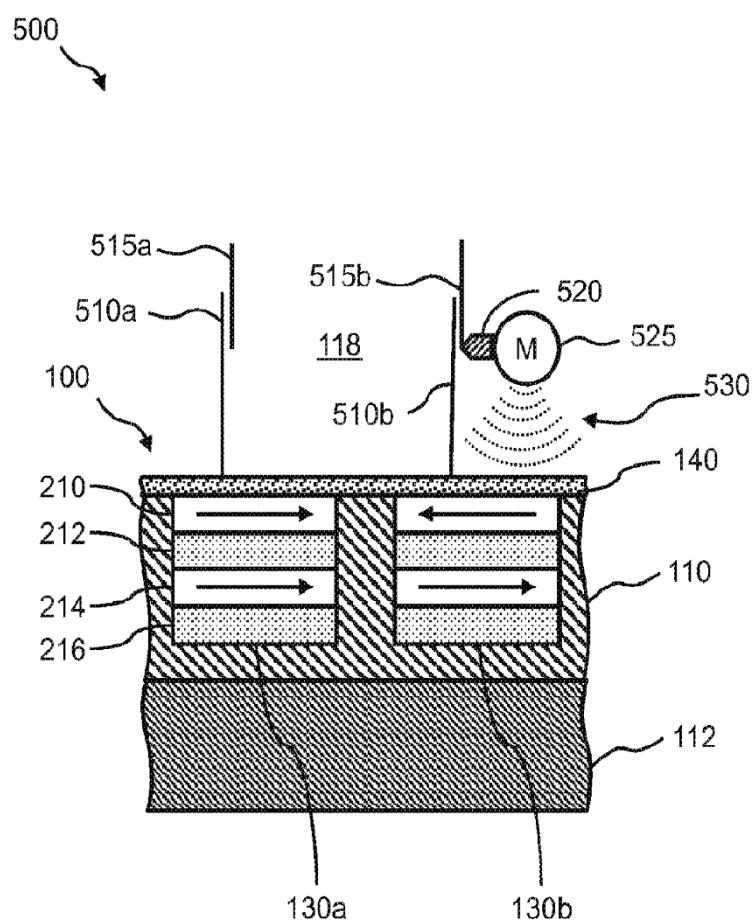


Figura 5

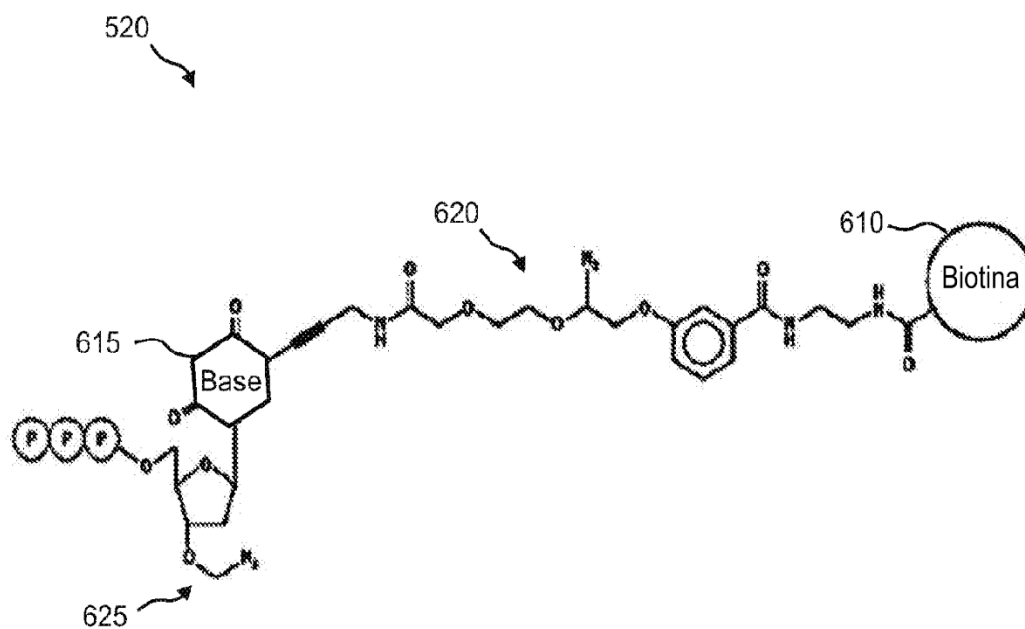


Figura 6A

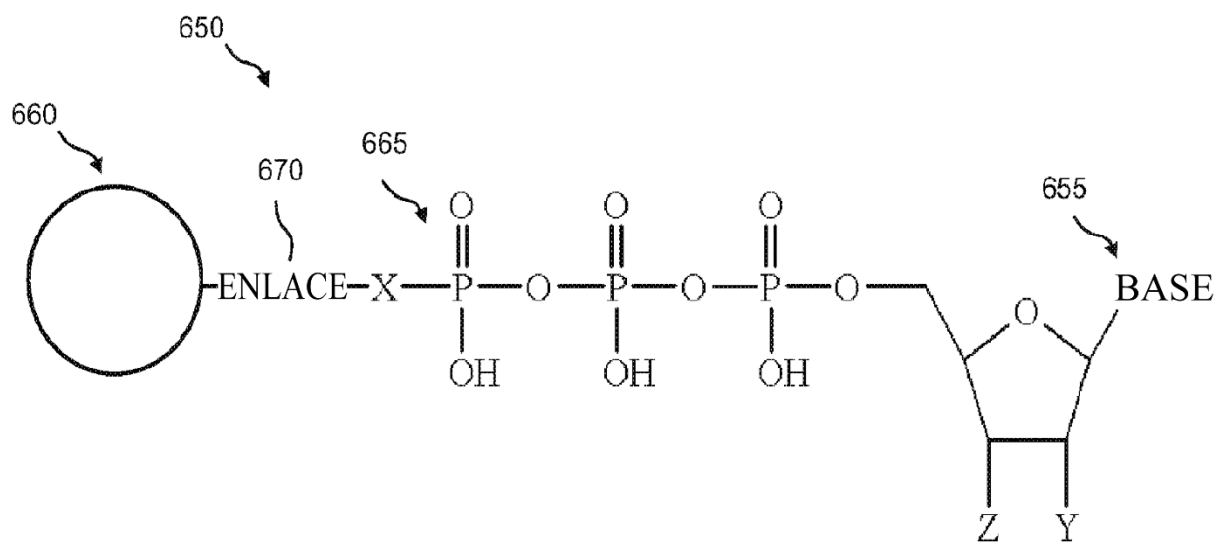


Figura 6B

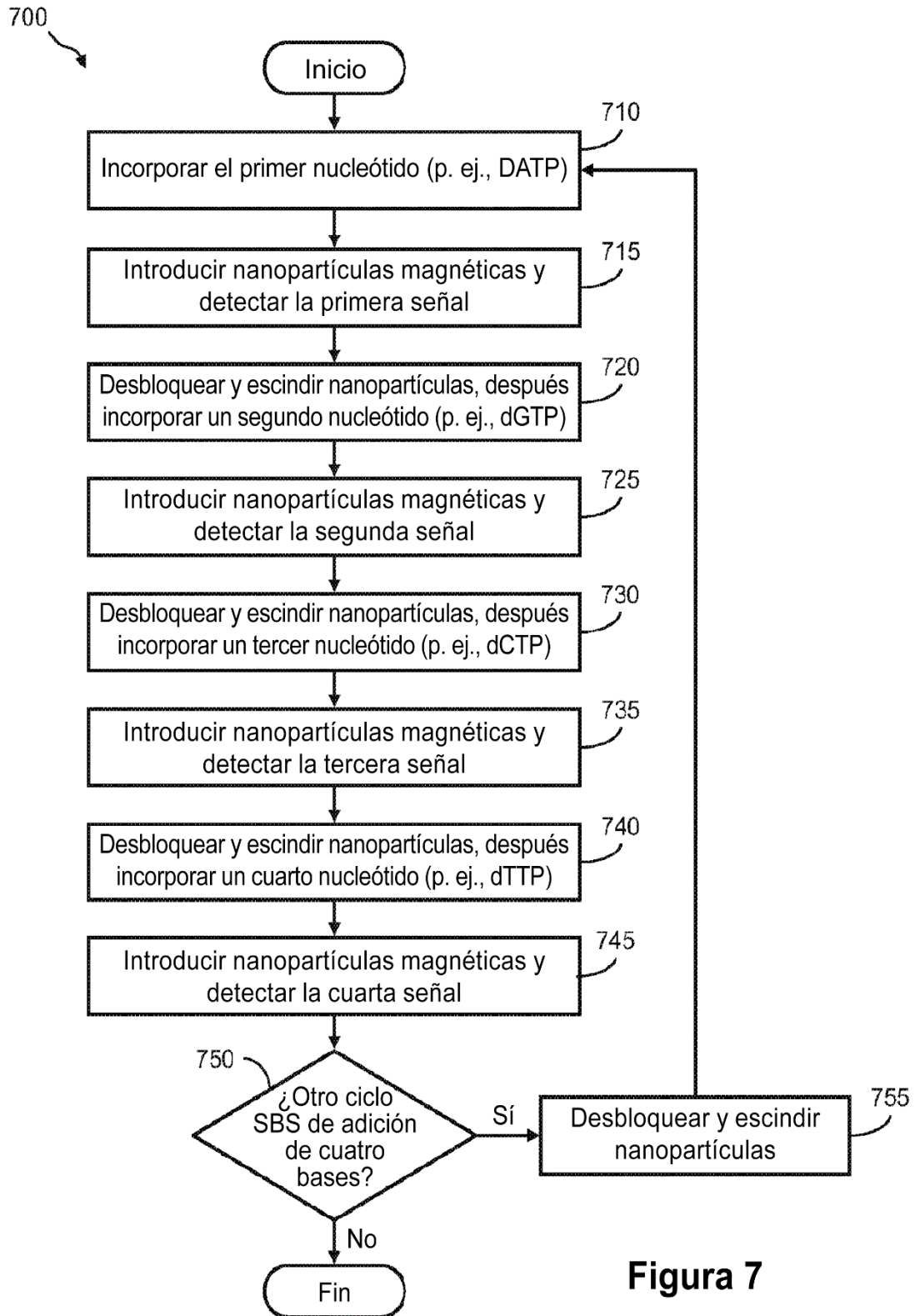
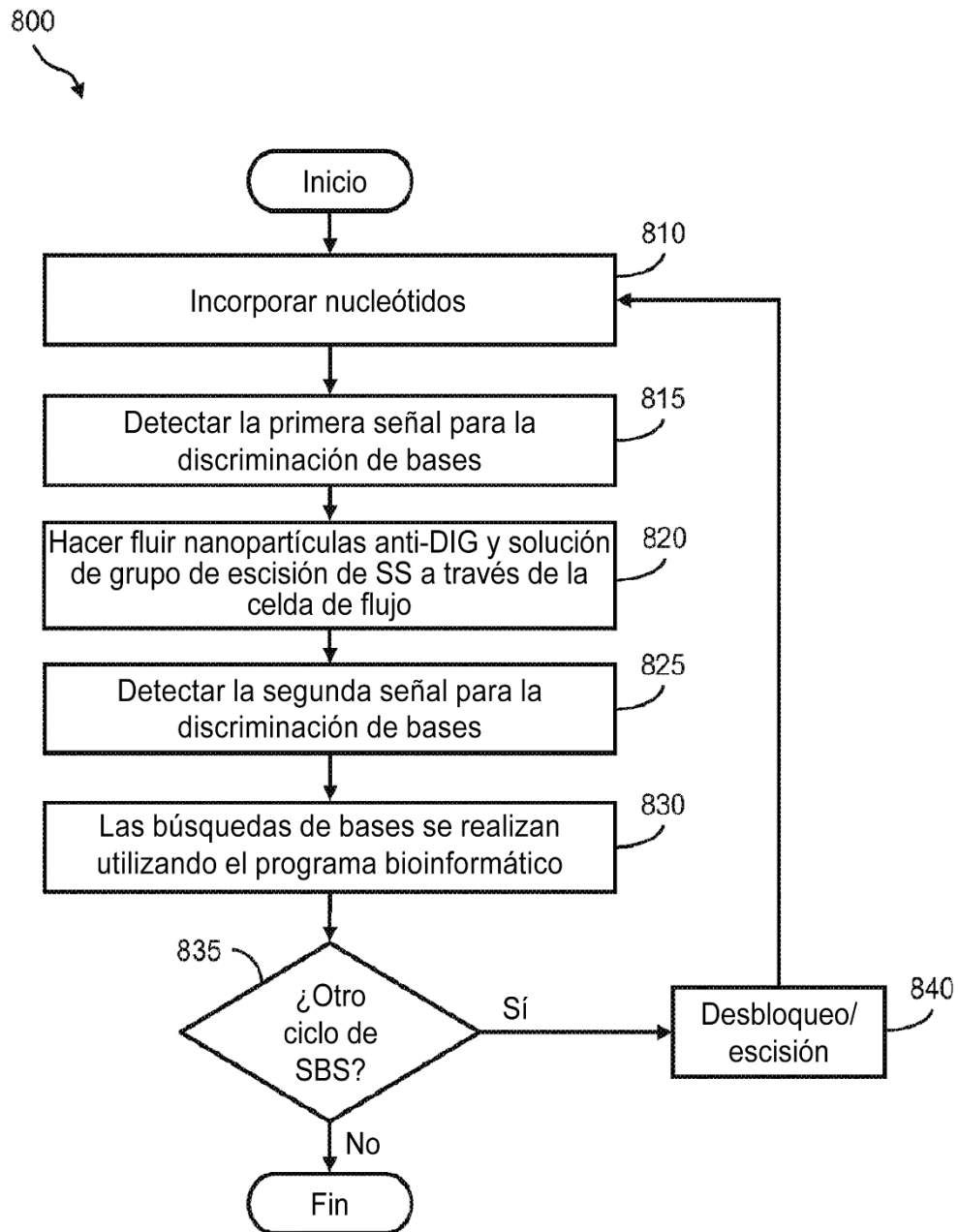


Figura 7

**Figura 8**

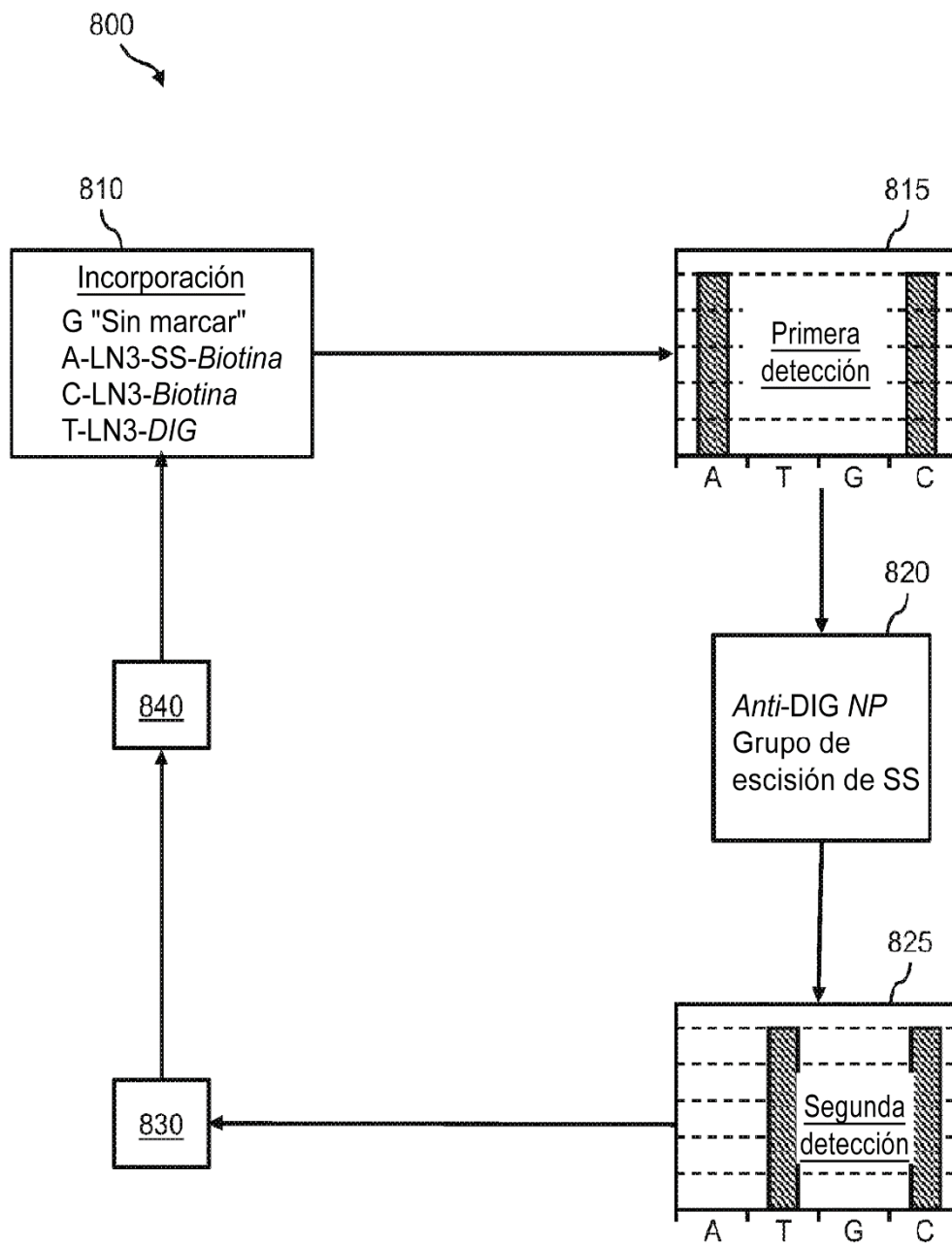


Figura 9

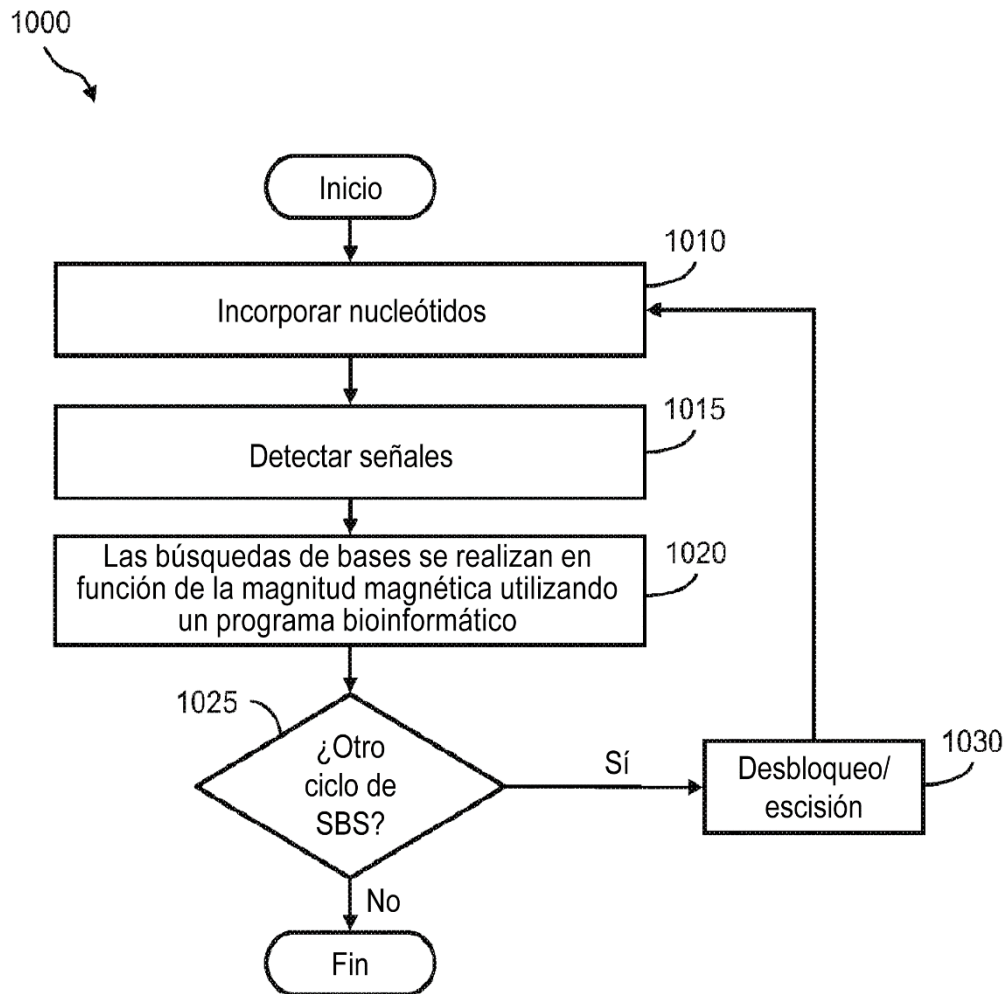


Figura 10

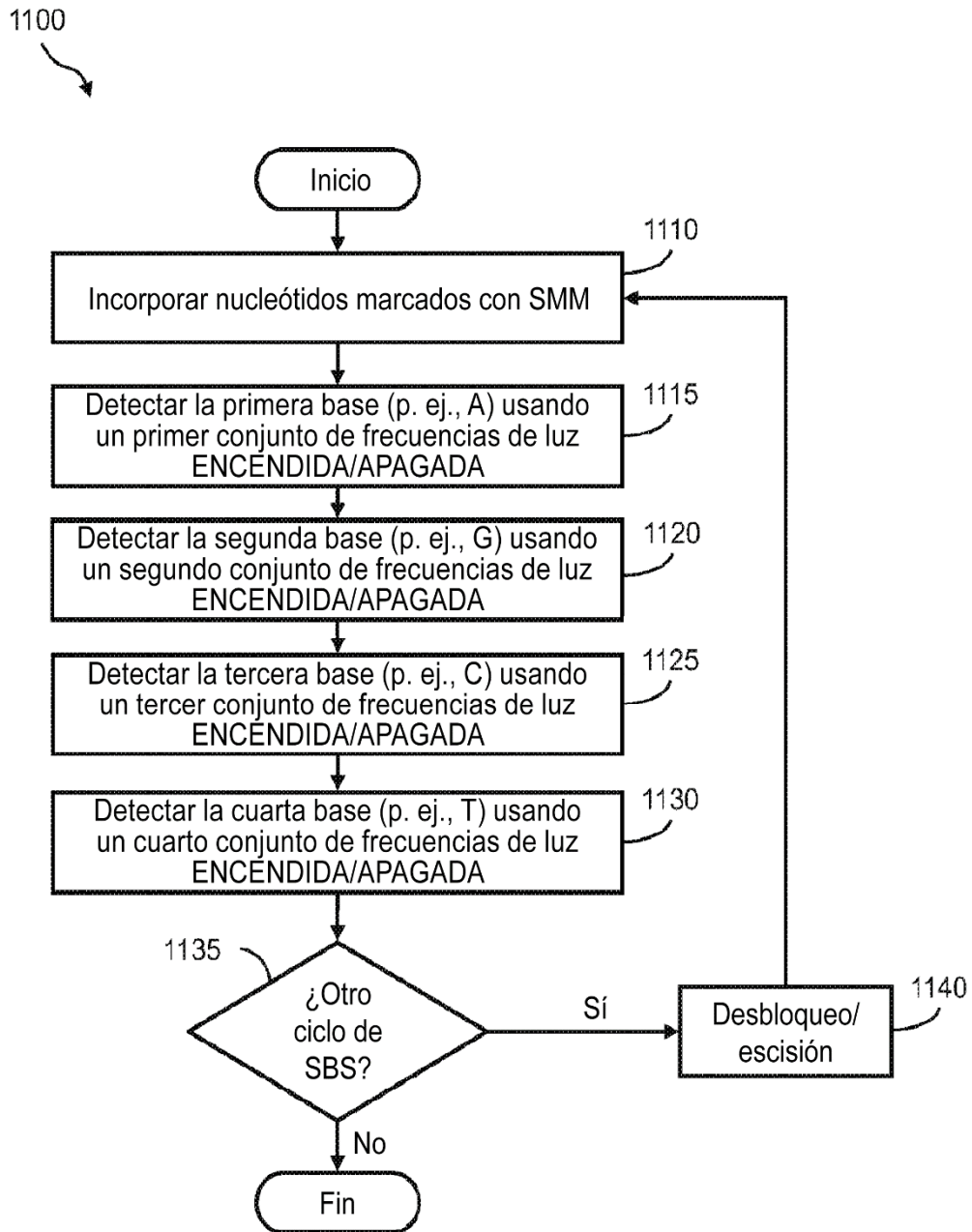


Figura 11

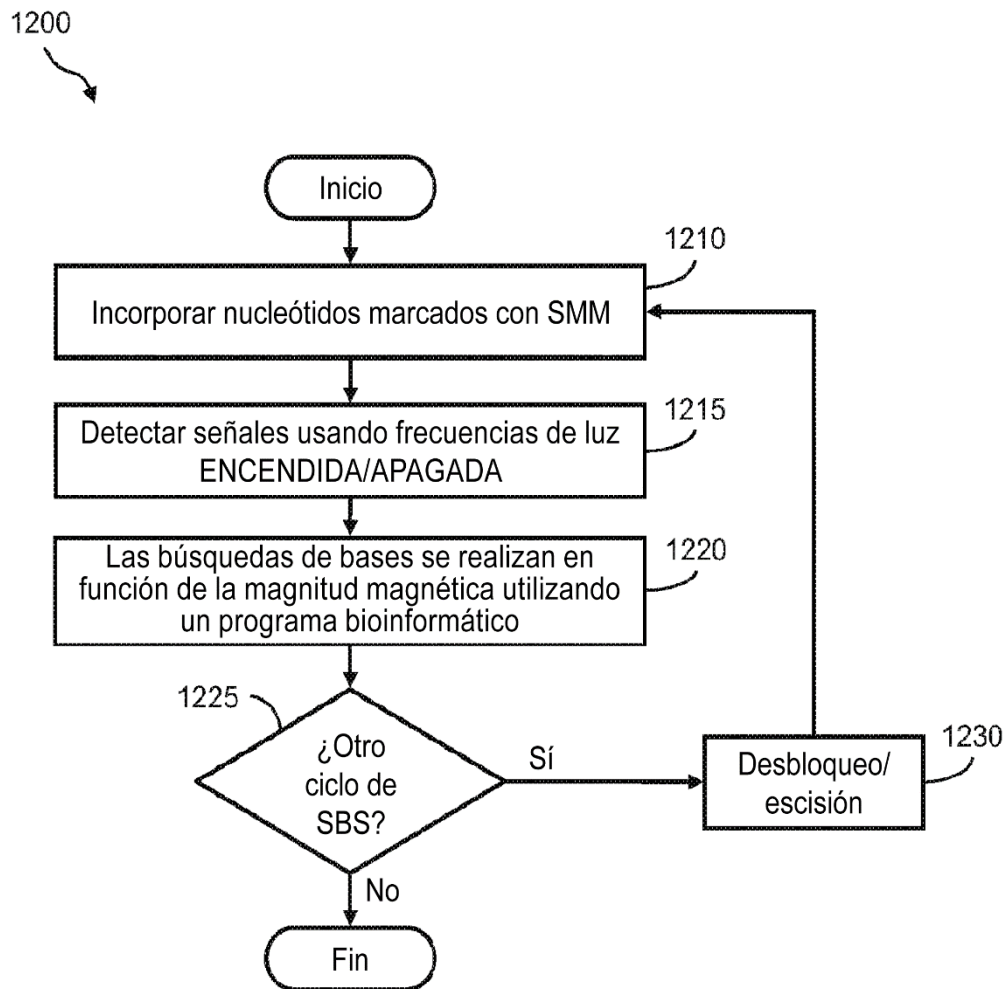


Figura 12

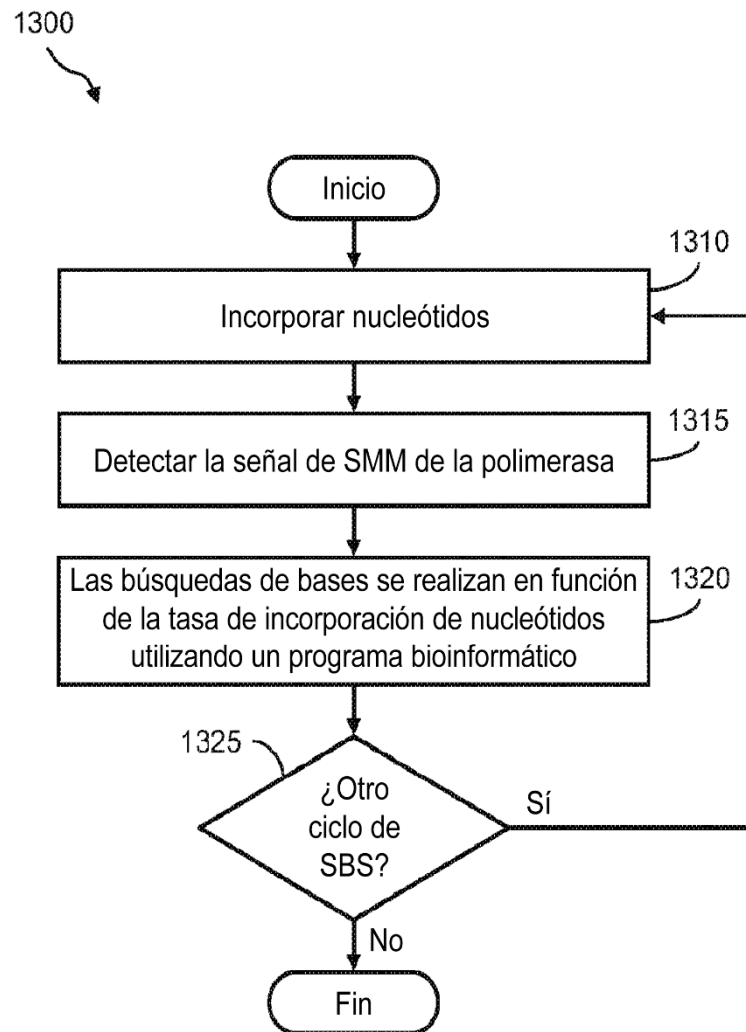


Figura 13

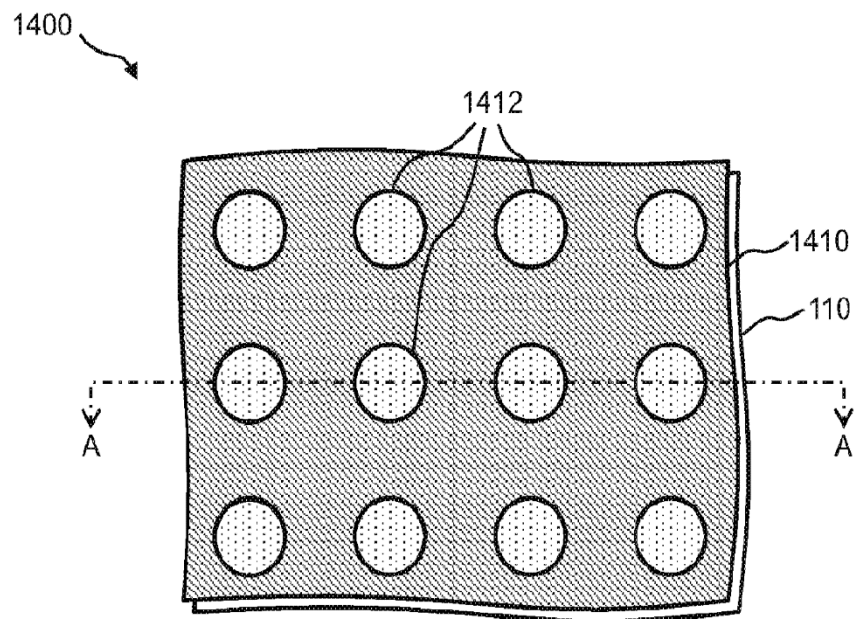


Figura 14A

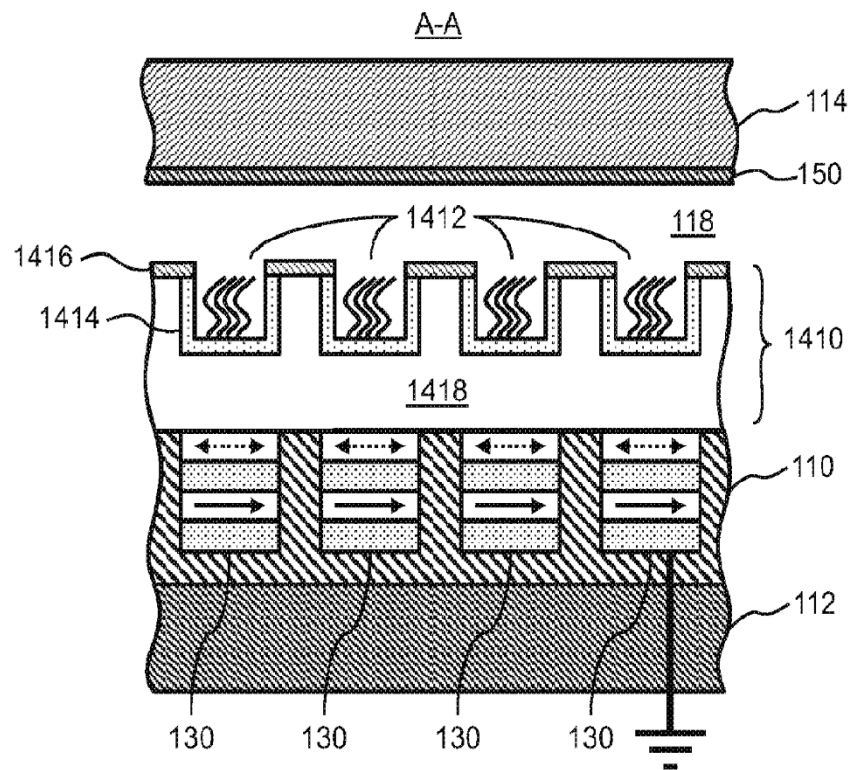


Figura 14B

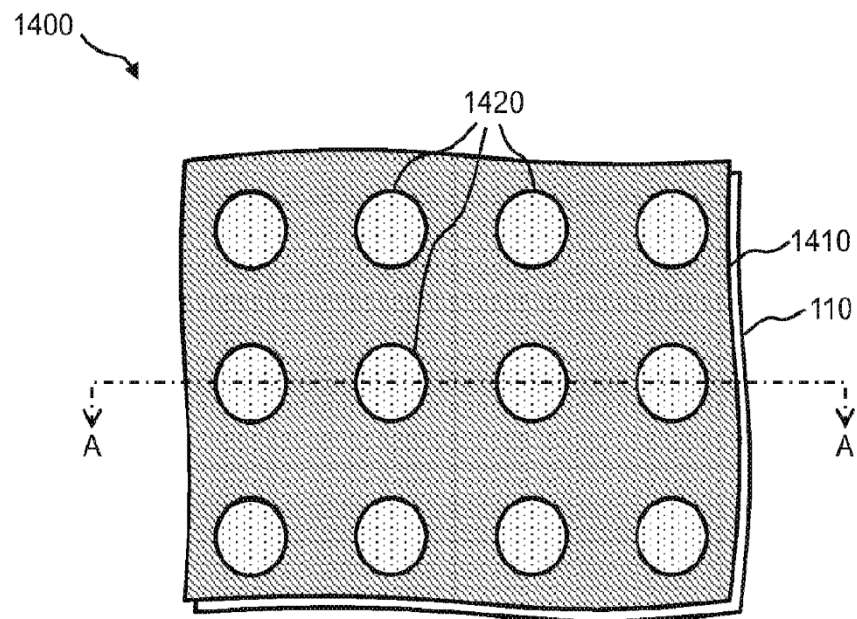


Figura 15A

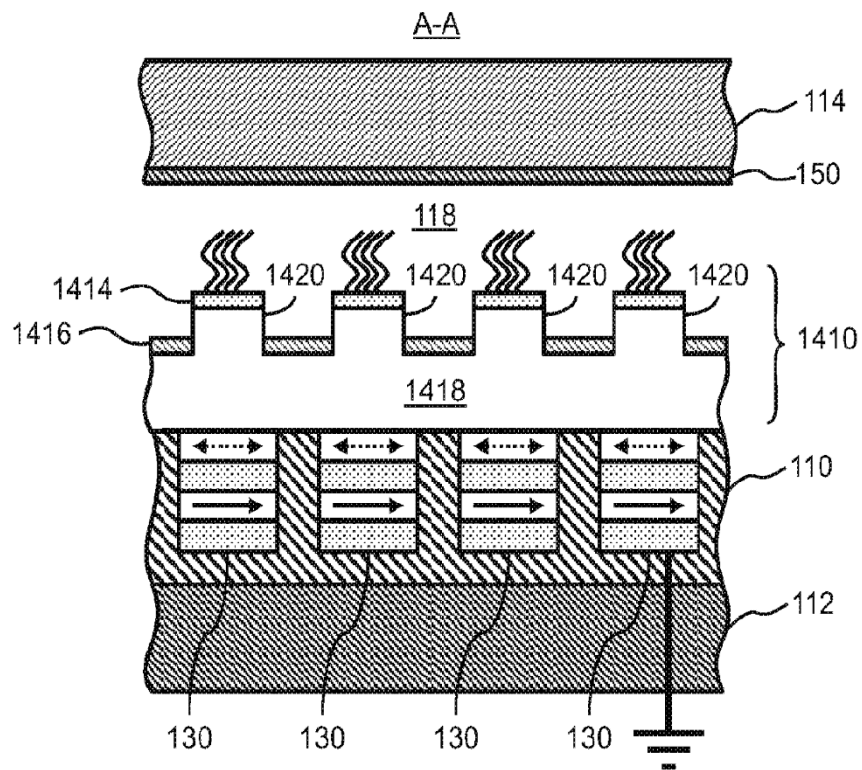


Figura 15B

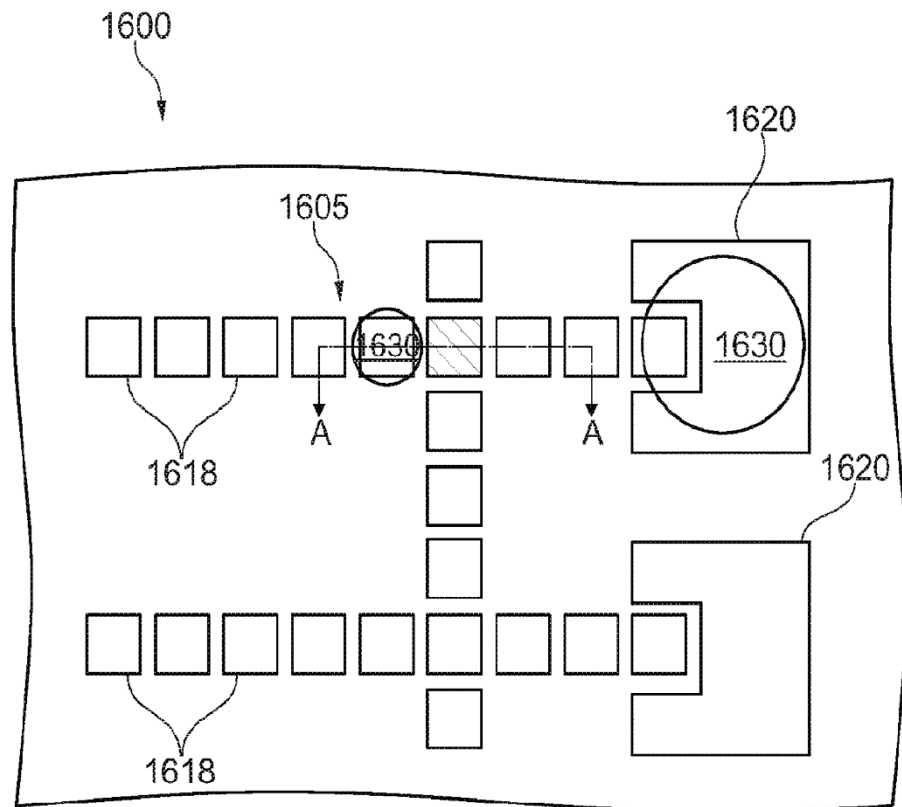


Fig. 16A

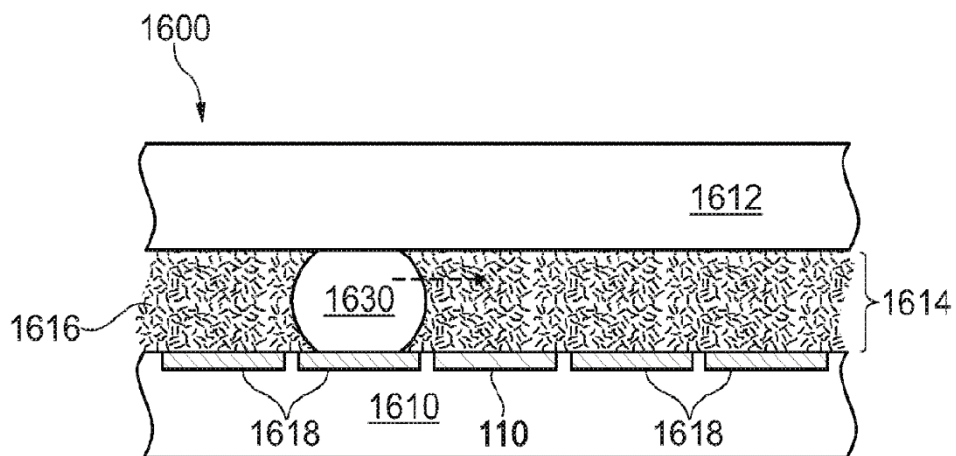


Fig. 16B

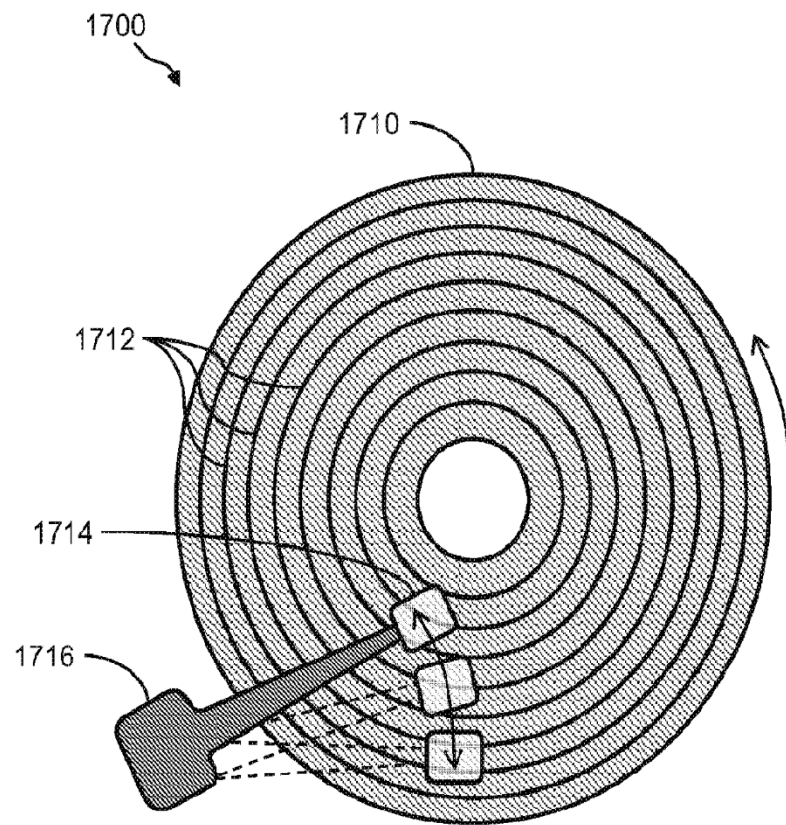


Figura 17

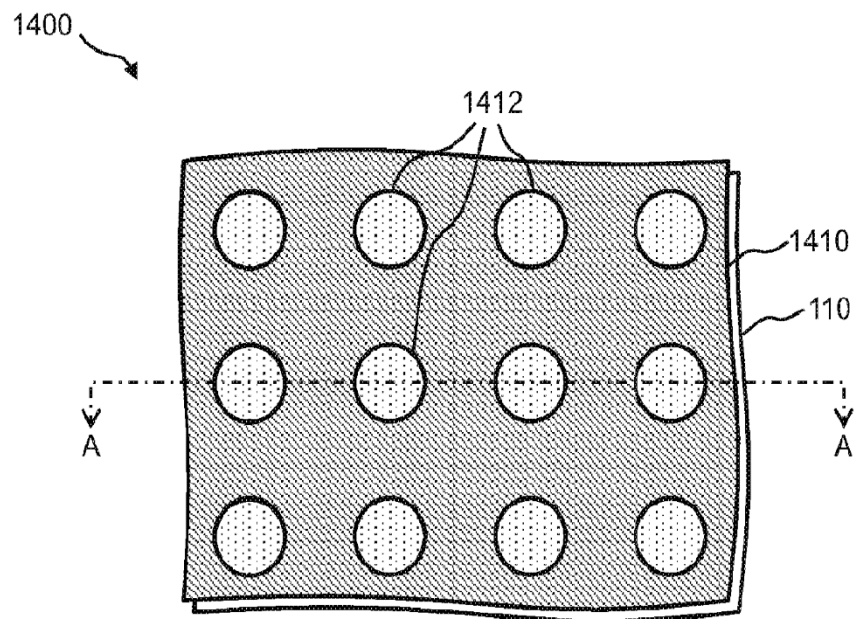


Figura 18A

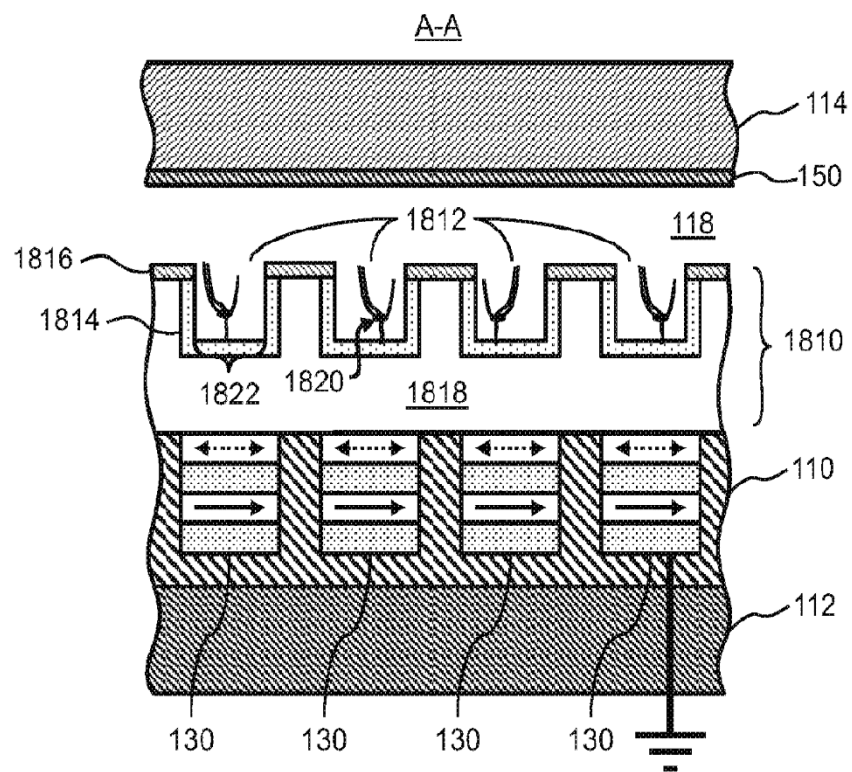


Figura 18B

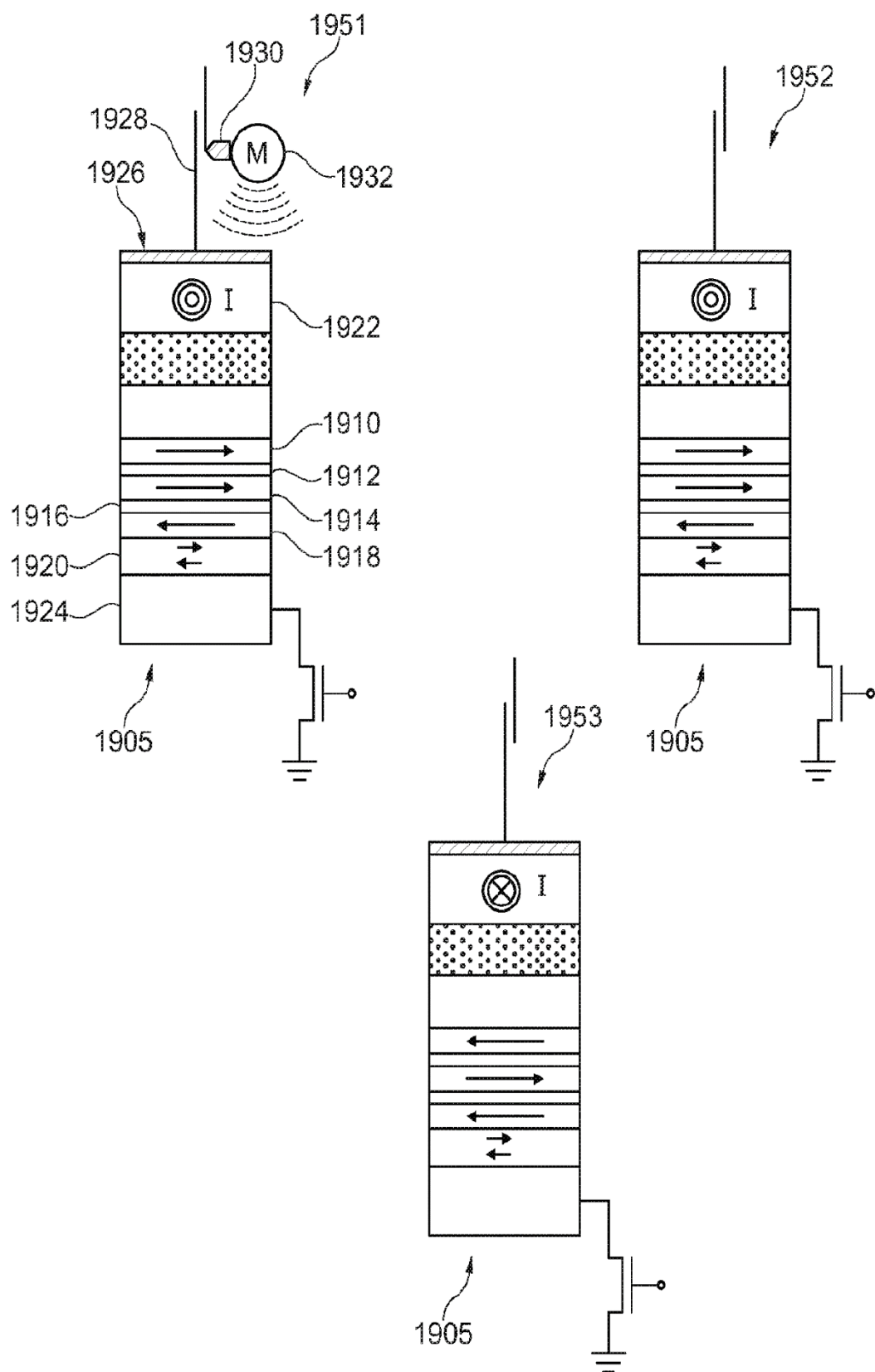


Fig. 19