



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 569**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02727736 .7**

86 Fecha de presentación : **20.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1389241**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2004**

54 Título: **Procedimiento de secuenciación de polinucleótidos.**

30 Prioridad: **18.05.2001 GB 0112238**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **Medical Biosystems Ltd.
The Old Mill, Beaston Cross, Broadhempston
Nr. Totnes, Devon TQ9 6BX, GB**

72 Inventor/es: **Densham, Daniel Henry**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 299 569 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

Procedimiento de secuenciación de polinucleótidos.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la secuencia de un polinucleótido.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de determinar la secuencia de un polinucleótido es de gran importancia científica, como se muestra por el Proyecto de Genoma Humano en el mapeo de tres billones de bases de ADN codificadas en el genoma humano.

15 El procedimiento fundamental en el uso general para la secuenciación de ADN a gran escala es el procedimiento de terminación de cadena. Este procedimiento se desarrolló primero por Sanger y Coulson (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977; 74: 5463-5467), y depende del uso de los derivados dideoxi de los cuatro trifosfatos de nucleósidos que se incorporan en la cadena de polinucleótidos naciente en una reacción de polimerasa. Tras la incorporación, los derivados dideoxi terminan la reacción de la polimerasa y después los productos se separan mediante electroforesis en gel y se analizaron para revelar la posición a la que el derivado dideoxi se incorporaba a la cadena.

20 Aunque este procedimiento se usa ampliamente y produce resultados fiables, se reconoce que es lento, de trabajo intensivo y caro. Se han usado marcas fluorescentes para identificar la incorporación de nucleótidos en una molécula de ADN naciente en crecimiento, usando la reacción de la polimerasa (véase el documento WO91 /06678). Sin embargo, estas técnicas tienen la desventaja de incrementar la interferencia de fondo de los fluoróforos. A medida que la molécula de AND crece, el "ruido" de fondo aumenta y el tiempo requerido para detectar cada incorporación de nucleótidos necesita aumentarse. Esto restringe severamente el uso del procedimiento para la secuenciación de grandes polinucleótidos. Sin embargo, la limitación más grave de los sistemas de secuenciación de polinucleótidos se construye alrededor de los tintes fluorescentes, es el problema de blanqueo por la luz.

30 El blanqueo por la luz es un fenómeno bien documentado en los sistemas de tintes fluorescentes y se produce por la exposición del tinte a las longitudes de onda de excitación. Todos los sistemas de tintes tienen la capacidad de absorber un número limitado de fotones antes de que se produzca el blanqueo por la luz. Una vez que se ha producido el blanqueo por la luz el tinte fluorescente no es ya más visible para el observador y por lo tanto, si se conjuga a una molécula, esto no será detectable.

35 Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento mejorado para la determinación de la secuencia de un polinucleótido, que incrementa de manera significativa la proporción y tamaño del fragmento del polinucleótido que se está secuenciando y que preferiblemente no depende de los nucleótidos marcados con fluorescencia para la detección. Además, el procedimiento debe ser capaz de llevarse a cabo mediante un procedimiento automático, reduciendo la complejidad y coste asociado a los procedimientos existentes.

40 Sumario de la invención

La presente invención se basa en la realización de un cambio en la conformación y/o masa y/o distribución de energía en una enzima para la elaboración de polinucleótidos, que se produce cuando una enzima se asocia y se mueve a lo largo de un polinucleótido diana, se puede detectar usando la formación de imágenes ópticas no lineales, que incluyen las basadas en la segunda o tercera generación armónica.

50 De acuerdo con la presente invención, un procedimiento para la secuenciación de polinucleótidos comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una enzima de tratamiento de polinucleótidos, inmovilizada en una posición fija, con un polinucleótido diana en condiciones suficientes para inducir la actividad de la enzima; y
- 55 (ii) detectar un efecto consecuente con la interacción de la enzima y el polinucleótido, en el que el efecto se detecta mediante la medición de una señal óptica no lineal o señal lineal acoplada a una señal no lineal.

Se logran numerosas ventajas con la presente invención. La secuenciación se puede llevar a cabo con pequeñas cantidades de polinucleótido, con la capacidad de secuenciación se moléculas de polinucleótido individuales, eliminando por lo tanto la necesidad de amplificación antes del inicio de la secuenciación. Se pueden obtener longitudes de lecturas de secuencia largas y consideraciones de estructura minimizadas. La obtención de largas longitudes de lectura elimina la necesidad de reensamblaje del fragmento extensivo usando la técnica de ordenadores. Además, ya que la invención no depende de la necesidad de nucleótidos marcados con fluorescencia o cualquier medida de fluorescencia, se evita la limitación de la longitud de lectura al nivel de la molécula individual como una función del blanqueo por la luz u otros efectos fluorescentes no predecibles. La presente invención también permite fragmentos de polinucleótidos largos a leer de manera secuencial mediante el mismo sistema de enzima. Esto tiene el beneficio de permitir usar un sistema de enzima individual que se puede regenerar y volver a usar, permitiendo muchos moldes de polinucleótidos diferentes a secuenciar. Por último, la utilización de la Segunda o tercera Generación ofrece ventajas debido a la caren-

cia de daño por la luz y blanqueo por la luz. Esto se debe al hecho de que no se produce ninguna fotoquímica, incluso en el plano focal debido a que la señal, estimulada por la radiación no resonante, no implica un estado excitado con un tiempo de vida finito.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, un material de soporte sólido comprende al menos una polimerasa y al menos una molécula bipolar posicionada sobre o próxima a la polimerasa, en el que dicha molécula bipolar es una marca que genera la segunda o tercera armónica y una señal que surge de la misma, para la detección usando procedimientos ópticos no lineales.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, un sistema de formación de imágenes establecido para detectar una señal óptica no lineal, comprende un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre él una enzima que interactúa con un polinucleótido, y una molécula bipolar posicionada sobre o próxima a la enzima.

Descripción de los dibujos

15 La invención se describe con referencia a la figura adjunta, en la que:

La Figura 1 es una ilustración esquemática de un sistema de formación de imágenes que utiliza la segunda generación armónica; y

20 La Figura 2 muestra la segunda señal armónica generada por una polimerasa tras la incorporación de un polinucleótido específico.

Descripción detallada la invención

25 La presente invención utiliza las medidas ópticas no lineales convencionales para identificar un cambio de conformación y/o masa y/o distribución de energía que se produce a medida que una enzima de elaboración de polinucleótidos interactúa con las bases individuales sobre un polinucleótido diana o incorpora nucleótidos sobre una molécula de polinucleótido naciente.

30 Se conoce el uso de procedimientos ópticos no lineales para la formación de imágenes de moléculas. Lo que no se ha apreciado es que estos procedimientos se pueden aplicar a la secuenciación de un polinucleótido, usando una enzima inmovilizada o fija.

35 En una realización separada, se genera una señal lineal además de una señal no lineal y se detecta la señal lineal. Las dos señales se dice que están acopladas, dando como resultado una potenciación en la detección.

40 El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se ha de interpretar en su sentido más amplio, e incluye ADN y ARN, incluyendo ADN y ARN modificado, híbridos de ADN/ARN, así como otras moléculas de tipo ácido nucleico de hibridación, por ejemplo, ácido nucleico peptídico (PNA).

45 El término "enzima de elaboración de polinucleótido" como se usa en el presente documento se ha de interpretar en su sentido más amplio y se refiere a cualquier enzima que interactúa con un polinucleótido y se mueve continuamente a lo largo del polinucleótido. La enzima es preferiblemente una enzima polimerasa, y puede ser de cualquier tipo conocido. Por ejemplo, la polimerasa puede ser cualquier ADN polimerasa dependiente de ADN. Si el polinucleótido Diana es una molécula de ARN, entonces la polimerasa puede ser una ADN polimerasa dependiente de ARN, es decir transcriptasa inversa, o ARN polimerasa dependiente de ARN, es decir, ARN replicasa. En una realización preferida de la invención, la polimerasa es la polimerasa de T4. En las realizaciones preferidas adicionales de la invención, la polimerasa es cualquier polimerasa III holoenzima de *E. coli* (McHenry, Ann. Rev. Biochem., 1988; 57:519); polimerasa de T7 (Schwager *et al.*, Methods in Molecular and Cellular Biology, 1989/90; 1 (4): 155-159) o polimerasa del gen 5 del bacteriófago T7 formando complejo con *E. coli* Thioredoxin (Tabor *et al.*, J. Biol. Chem., 1987; 262: 1612-1623). Cada una de estas enzimas polimerasa se une a un polinucleótido diana con alta capacidad de elaboración (y fidelidad) y por lo tanto mantiene un complejo a polimerasa-polinucleótido, incluso cuando no está teniendo lugar de manera activa la polimerización.

55 Las enzimas alternativas que interactúan con un polinucleótido incluyen las enzimas helicasa, primasa, holoenzima, topoisomerasa o girasa. Tales enzimas ofrecen ventajas adicionales. Por ejemplo, usando una helicasa reduce el problema de estructuras secundarias que existen dentro de las moléculas de polinucleótido, como helicasas que se encuentran y superan estas estructuras dentro de su ambiente natural. En segundo lugar, las helicasas permiten las reacciones necesarias para llevar a cabo sobre el ADN de cadena doble a temperatura ambiente.

60 A medida que la enzima interactúa con las bases sucesivas sobre el polinucleótido, su conformación cambiará dependiendo de la base (o nucleótido) sobre la diana con la que está en contacto. De este modo, el orden temporal de las adiciones de pares de bases durante la reacción se mide sobre una molécula individual de ácido nucleico, es decir, la actividad del sistema de enzima sobre el polinucleótido de molde a secuenciar se puede seguir en tiempo real. La secuencia se deduce mediante la identificación de la base (nucleótido) que se está incorporando en la hebra complementaria en crecimiento del polinucleótido diana mediante la actividad catalítica de la enzima.

Un aspecto importante de la presente invención es la inmovilización de la enzima en una posición fija con relación al sistema de formación de imágenes. Esto preferiblemente se lleva a cabo mediante la inmovilización de la enzima a un soporte sólido, reteniendo la enzima su actividad biológica. Se conocen los procedimientos para la inmovilización de las enzimas adecuadas a un soporte sólido. Por ejemplo, el documento WO-A-99105315 describe la inmovilización de una enzima polimerasa a un soporte sólido. Son adecuados los procedimientos generales para la inmovilización de proteínas a los soportes.

Los procedimientos de detección ópticos usados en la presente invención pretenden que formen imágenes a nivel de molécula individual, es decir, generar una imagen/señal distinta para una enzima. Se puede inmovilizar una pluralidad de enzimas sobre un soporte sólido a una densidad que permita la resolución de la enzima individual. Por lo tanto, en una realización, existen múltiples enzimas inmovilizadas sobre un soporte sólido, y el procedimiento de la invención se puede llevar a cabo sobre éstos de manera simultánea. Esto permite que se secuencien conjuntamente diferentes moléculas de polinucleótidos.

Será evidente para los expertos en la técnica llevar a cabo el procedimiento de formación de imágenes en las condiciones adecuadas para promover la actividad de la enzima. Por ejemplo, con relación a una enzima polimerasa, será evidente que se requieren otros componentes necesarios para que la reacción de la polimerasa proceda. En esta realización, se requerirán una molécula de cebador de y cada uno de los trifosfatos de nucleósidos dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Los trifosfatos de nucleósidos se pueden añadir de manera secuencial, con la retirada de los nucleótidos no unidos antes de la introducción de del siguiente trifosfato de nucleósido. Como alternativa, todos los trifosfatos pueden estar presentes al mismo tiempo. Puede ser preferible utilizar trifosfatos que tienen uno o más grupos de bloqueo que se pueden retirar de manera selectiva mediante luz monocromática pulsada, evitando por lo tanto la incorporación no controlada. Los trifosfatos bloqueados adecuados se describen en el documento WO-A-99/05315.

Los sistemas de formación de imágenes ópticas no lineales de alta resolución se conocen en la técnica. En general, la polarización no lineal para el material se puede expresar como:

$$P = X^{(1)}E^1 + X^{(2)}E^2 + X^{(3)}E^3 + \dots$$

donde P es la polarización inducida, X(n) es la susceptibilidad no lineal de orden n, y E es el vector del campo eléctrico. El primer término describe la absorción y reflexión normal de la luz; el segundo describe la segunda generación armónica (SHG), suma y diferencia de la generación de frecuencia; y el tercero describe la dispersión de la luz, procedimientos de Raman estimulados, tercera generación armónica (TGH), y tanto la absorción de dos y tres fotones.

Un sistema preferido de formación de imágenes de la presente invención se basa en la detección de la señal que surge de la segunda y tercera generación armónica.

La resolución de la molécula individual que usa la segunda y tercera generación armónica (en lo que sigue denominada en el presente documento SHG) se conoce en la técnica (Peleg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 95: 6700-6704 y Peleg *et al.*, Bioimaging, 1996; 4: 215-224).

El establecimiento general de del sistema de formación de imágenes puede ser como se describe en Peleg *et al.*, 1996, *supra*, y como se muestra en la Figura 1. Con relación a la Figura 1, se una un láser (1) es como fuente de iluminación, para generar un rayo láser que después se pasa a través de un polarizador (2). Parte del rayo de láser se puede dirigir a través de un cristal no lineal (3) para producir un rayo verde que ayuda a la alineación del rayo láser. Se coloca un fotodiodo (4) en proximidad estrecha a la trayectoria óptica con el fin de proporcionar un medio de control de la intensidad generada de infrarrojo cercano (NIR). Se coloca un filtro (5) en frente de la entrada de un microscopio para evitar cualquier segunda armónica de la entrada del microscopio. El rayo láser se enfoca sobre el soporte sólido que comprende la enzima inmovilizada, y la señal no lineal se recoge mediante las (7) y se dirige usando un monocromador (8). La intensidad fundamental se bloquea usando un filtro IR. La señal del fotomultiplicador se amplifica, se promedia y se integra usando un promediador de vagón e integrador de canal (9). Las señales generadas se transfieren después a un ordenador (10) para generar las imágenes.

Con el fin de generar la segunda o tercera armónica, es necesario posicionar una marca apropiada o en proximidad cercana a la enzima inmovilizada. Las moléculas altamente bipolares son adecuadas para este propósito. (Lewis *et al.* Chem. Phys., 1999; 245: 133-144). Un ejemplo de las moléculas adecuadas son tintes, particularmente tintes de estirilo (tal como el tinte de membrana JPW 1259 - suministrado por Molecular Probes). La Proteína Fluorescente Verde (GFP) es otro ejemplo de un "tinte" o "marca" que se puede usar para formar imágenes mediante SHG. Como se usa en el presente documento, GFP se refiere a tanto la proteína de tipo salvaje, como sus mutantes desplazados espectralmente (Tsien, Ann. Rev. Biochem., 1998; 67: 509 y los documentos US 5.777.079 y US 5.625.048). Otros tintes adecuados incluyen di-4- ANEPPS, di-8-ANEPPS y JPW2080 (Molecular Probes).

Las moléculas dipolares se pueden localizar sobre las bases individuales del polinucleótido (o su complemento si las moléculas bipolares se unen a los trifosfatos de nucleósidos y se usan en una reacción de la polimerasa).

En una realización preferida de la invención, la enzima, por ejemplo, una polimerasa, se prepara como una fusión recombinante con GFP. La GFP se puede localizar en el extremo N- o C- de la enzima (el extremo C- puede ser

ES 2 299 569 T3

deseable si una polimerasa se va a usar junto con un “corrector de deslizamiento”). Como alternativa, la molécula de GFP se puede localizar en cualquier lugar dentro de la enzima, con la condición de que se mantenga la actividad enzimática.

- 5 En una realización separada de la presente invención, el sistema de formación de imágenes óptico no lineal es espectroscopía de Raman o espectroscopía de Raman potenciada por superficie (SERS). Una revisión de la espectroscopía de Raman está contenida en McGilp, *Progress in Surface Science*, 1995; 49 (1): 1-106.

10 La radiación óptica usada para excitar el sistema Raman es, preferiblemente, Radiación de Infrarrojo Cercano (NIR). La excitación de NIR tiene la ventaja de disminuir la fluorescencia y señal de Raman del medio o disolvente circundante.

15 En una realización separada de la invención, la señal no lineal se puede potenciar mediante el uso de una nanopartícula metálica y/o una superficie metálica rugosa (Boyed *et al.*, *Phys Rev.*, 1984; B. 30: 519-526, Chen *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, 1981; 46: 1010-1012 y Peleg *et al.*, 1996, *supra*). Una nanopartícula metálica que potencia la señal se puede conjugar a la enzima (por ejemplo, con un anticuerpo conjugado a una nanopartícula, Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 6700-6704), inmovilizada cerca de la enzima inmovilizada/localizada o puesta en proximidad estrecha con el tinte/enzima de la SHG.

20 Una nanopartícula metálica potencia la formación espectroscópica asociada a, en particular, SHG de las regiones nanométricas, permitiendo por lo tanto la formación de imágenes al nivel de la molécula individual. La formación de imágenes espectroscópicas basada en la dispersión de Raman también se puede mejorar usando una nanopartícula metálica. Se conocen las nanopartículas metálicas adecuadas, e incluyen nanopartículas de oro y de plata. Las nanopartículas son generalmente de un diámetro de entre 5 nm y 100 nm, preferiblemente entre 10 nm y 60 nm. Las nanopartículas pueden estar unidas al polinucleótido (o su complemento si las nanopartículas están unidas a trifosfatos de nucleósidos y se usan en una reacción de polimerasa).

30 Una superficie metálica rugosa también se ha mostrado que mejora la sensibilidad del procedimiento de la SHG (Chen *et al.*, 1981, *supra* y Peleg *et al.*, 1996, anteriormente) y es también un requerimiento para la SERS. La superficie metálica es usualmente plata u otro metal noble. Una modificación inicial selectiva inicial de la superficie metálica en la resolución espacial sub-longitud de onda se puede llevar a cabo usando diversas técnicas, incluyendo la microscopía de fuerza atómica (AFM). Un extremo de AFM revestido con platino se puede usar para catalizar la hidrogenación de las azidas terminales a grupos amino que con capaces de una derivación adicional (Muller *et al.*, *Science*, 1995; 268: 272-273). Las enzimas después se pueden colocar en “manchas calientes donde existen campos altos locales en las regiones donde se localizan modos ópticos (Shalaev *et al.* *Phys. Rep.*, 1996; 272: 61).

En una realización separada de la invención, una nanopartícula se puede poner en proximidad estrecha con la enzima que usa un extremo/sonda voladizo de AFM, para potenciar por lo tanto la señal no lineal.

40 La AFM se ha mostrado recientemente que es capaz de tener una resolución de tiempo y sensibilidad aplicable a la formación de imágenes dinámica de los cambios de conformación de proteína (Rouso *et al.*, *J. Struc. Biol.*, 1997; 119: 158-164). Esto se utiliza en una realización preferida de la invención, donde una sonda 7 extremo de AFM se posiciona sobre la enzima y, en combinación con la información óptica no lineal (por ejemplo, SHG), se usa para detectar los cambios de conformación de una proteína debido a la interacción entre la enzima y la secuencia de nucleótidos a medida que la enzima se mueve a lo largo del polinucleótido diana. La información se puede recoger en el campo lejano usando ópticos confocales convencionales o modo de reflexión si se usa junto con la reflexión interna total.

50 En una realización adicional, la señal no lineal, (por ejemplo, SHG) se controla en el campo cercano usando Microscopía Óptica de Barrido de Campo Cercano (NSOM). NSOM es una forma de microscopía de sonda por barrido que usa la interacción óptica entre un extremo nanoscópico (como se usa en AFM) y una muestra para obtener información óptica resuelta de manera espacial. La microscopía del campo cercano junto con SHG se ha estudiado de manera extensiva y se muestra que es sensible a la superficie en una escala atómica (McGilp, 1995, *supra*). La principal ventaja de usar NSOM como parte de del sistema de formación de imágenes es que permite un gran incremento en la resolución de las dimensiones de sub-longitud de onda. Como la presente invención se refiere al control de conformación de una enzima individual, por ejemplo, una enzima polimerasa, como inactiva con un polinucleótido, la resolución espacial de sub-longitud de onda es altamente deseable. En el contexto de este aspecto de la invención, es preferible que se use un extremo voladizo de AFM como un microscopio de barrido de campo cercano sin apertura (Sangohdar *et al.*, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, 1999; 523-530). Esto es análogo al uso de nanopartículas metálicas como una fuente e potenciación de campo local. Se prefiere que el extremo se prepare de, o se revista con, un metal noble o cualquier material que actúe para incrementar el campo electromagnético local. Como alternativa, se puede conectar una nanopartícula directamente al extremo voladizo. Esto ya se ha mostrado que es aplicable al control de cambios de conformación a nivel de molécula individual (Rouso, *et al. supra*).

65 En una realización adicional separada de la presente invención, un plasmón de superficie generado (o campo de polarización/evanescente se puede usar para potenciar la relación señal a ruido de la señal no lineal. Esta técnica de formación de imágenes potenciada por la onda evanescente tiene mayor relación señal a ruido que, por ejemplo, la formación de imágenes de la SHG sola. En esta realización, la señal de campo de la SHG potenciada de manera

evanescente a partir de la enzima marcada se puede recoger en el campo cercano mediante una fibra mientras se obtienen de manera simultánea los datos de conformación de AMF, y al mismo tiempo la cantidad de radiación evanescente absorbida se puede controlar para obtener la información sobre la cantidad de de acoplamiento entre el campo evanescente y el campo polimerasa/SHG marcado.

En esta configuración (modo de recolección de NSOM) el sistema actúa como un microscopio de efecto túnel de barrido fotónico (PSTM) y el campo de plasmón evanescente o de superficie se acopla en el extremo de sonda de fibra de NSOM. Cualquier atenuación en la fuerza del campo de la señal que alcanza el extremo mediante la polimerasa se controlará mediante un detector posicionado al final del extremo.

La resonancia del plasmón de superficie se conoce en la técnica, y depende de la generación de una onda evanescente mediante la aplicación de un rayo de luz incipiente a un prisma. Un establecimiento típico para uso en esta realización consta de un prisma que se acopla ópticamente a un cubreobjetos de vidrio revestido de metal sobre el que se inmoviliza una enzima. El cubreobjetos es parte de un sistema de celdas de flujo de microfluidos con una entrada para la introducción de ligandos (nucleótidos) sobre la enzima inmovilizada. La enzima también se marca para permitir los efectos no lineales a generar. Un rayo de luz incidente se aplica al prisma para generar el campo del plumón de superficie. Al mismo tiempo, una señal no lineal (por ejemplo, Segundo campo armónico) se genera dirigiendo un láser de infrarrojos cercano por pulsos mediante un polarizador y placa de onda media, en un escáner óptico para el control del rayo mediante un filtro para eliminar el ruido del segundo armónico óptico, y después en la muestra. La señal óptica no lineal se recoge con lentes y un filtro y se dirige en un monocromador, se pasa a un tubo fotomultiplicador para la detección y después se amplifica y se registra mediante un sistema de ordenador.

Cuando el óptico no lineal se acopla de manera que se genere el el campo evanescente, la señal que se detecta también puede ser señal lineal (evanescente). En esta realización, se puede usar la NSOM en la recogida hecha para detectar la señal lineal.

Además se describe que la secuenciación de polinucleótidos se puede llevar a cabo dentro de una célula.

Se ha demostrado que, en su ambiente celular nativo, una ADN polimerasa y su complejo de replisoma se ancla en el lugar (o localiza en el sitio) dentro de la célula (Newport *et al.*, Curr. Opin. Cell Biol., 1996; 8: 365; y Lemon *et al.*, Science, 1998; 282: 1516-1519. Este complejo de replicación anclado nativo es análogo a la inmovilización de la enzima a un soporte sólido.

Esto permite el control *in vivo* de la secuencia de los cambios de conformación y relacionados con la secuencia de molde de las moléculas relacionadas con replisoma al nivel de la molécula individual que se lleva a cabo en tiempo real durante la replicación de ADN y/o división celular.

Con el fin de llevar a cabo este aspecto, es necesario modificar la enzima de manera que se pueda formar imagen usando las técnicas de detección óptica no lineal. Esto se puede lograr mediante fusión genética de la enzima con, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP). La célula también se debe inmovilizar para permitir que se produzca la inmovilización.

La proteína de fusión expresada se puede controlar/detectar en su localización celular anclada mediante la aplicación de la detección óptica no lineal (segunda generación armónica).

El siguiente ejemplo ilustra la invención.

En este experimento, una proteína de fusión de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) y una polimerasa se creó mediante técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica.

Se revistieron mediante giro procesadores de cuarzo (14 mm de diámetro, 0,3 mm de espesor) con una capa de espesor de 50 nm de oro y después se cubrieron con una capa de dextrano plana. Los procesadores de cuarzo revestidos de oro se colocaron después en la célula del fluido de una construcción de fluido de costumbre Microscopio Óptico de barrido de Campo cercano (NSOM). Los procesadores de cuarzo revestidos de oro se acoplaron ópticamente a un prisma de cuarzo mediante identificación del índice. La célula de fluido se selló después y se permitió que el tampón de polimerasa fluyera sobre el procesador.

La inmovilización de la polimerasa a la superficie del procesador se llevó a cabo de acuerdo a Jonsson *et al.*, Biotechniques, 1991; 11: 620-627. El ambiente del procesador se equilibró con el tampón de desarrollo (10 mM hepes, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0,05% de tensioactivo P20, pH 7,4). Se mezclaron conjuntamente volúmenes iguales de N-hidroxisuccinimida (0,1 M en agua) y N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) (0,1 M en agua) y se inyectaron a través de la superficie del procesador, para activar el dextrano carboximetilado. La proteína de fusión polimerasa-GFP (150 μ l) se mezcló con 10 mM de acetato de sodio (100 μ l, pH 5) y se inyectó a través de la superficie activada. Finalmente, los ésteres de N-hidroxisuccinimida residuales sobre la superficie del procesador se hicieron reaccionar con etanolamina (35 μ l, 1 M en agua, pH 8,5), y se retiró por lavado la polimerasa no unida de la superficie. El procedimiento de inmovilización se realizó con un flujo continuo de tampón de desarrollo (5 μ l/min) a una temperatura de of 25°C.

ES 2 299 569 T3

50 μ l de tampón de unión a anticuerpo (10 mM MES pH 6,0, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA) se hizo fluir sobre la polimerasa inmovilizada/GFP sobre la superficie del chip a un caudal de 5 μ l/min a 25°C. Un anticuerpo primario (GFP (B-2)B biotina conjugado a 200 μ l ml⁻¹, Santa Cruz Biotechnology) se diluyó 1:3000 en tampón de unión de anticuerpos y se dejó fluir sobre la superficie del procesador a un caudal de 5 μ l/min durante 30 minutos. Después de retiró por lavado el exceso de anticuerpo de la superficie hacienda fluir el tampón de unión de anticuerpo sobre el procesador a un caudal de 5 μ l/min durante 30 minutos.

Un anticuerpo secundario (IgG (H+L) anti ratón de cabra EM conjugado a inmunooro 40 nm, British Biocell International) se diluyó 1:1000 en tampón de unión de anticuerpo y se dejó fluir sobre la superficie del procesador a un caudal de 5 μ l/min durante 30 minutos. Después se retiró por lavado el exceso de anticuerpo de la superficie hacienda fluir el tampón de unión de anticuerpo sobre la superficie del procesador a un caudal de 5 μ l/min durante 30 minutos. Después el tampón se devolvió al tampón de desarrollo que después se dejó que fluyera sobre el procesador a una velocidad de 5 μ l/min durante 30 minutos antes del inicio de la siguiente fase.

Se sintetizaron dos oligonucleótidos usando la química de fosforamidita. El oligonucleótido definido como la SEQ ID NO. 1 se usó como un polinucleótido diana, y el oligonucleótido definido como SEQ ID NO. 2 se usó como cebador.

SEQ ID NO. 1

CAAGGAGAGGACGCTGCTTGTCTCGAAGGTAAGGAACGGACGAGAGAAGGGAGAG

SEQ ID NO. 2

CTCTCCCTTCTCTCGTC

Los dos oligonucleótidos se hicieron reaccionar en condiciones de hibridación para formar el complejo diana - cebador. El AD de cebador se suspendió después en tampón (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 8 mM MgCl₂, 4% (v/v) glicerol, 5 mM ditiotreitól (DDT) que contiene 150 μ l l de las subunidades β que forman un complejo corregido - corrección alrededor del ADN del cebador. Este procedimiento se conoce como preiniciación.

Con el fin de detectar los cambios de conformación en la polimerasa, se usó la NSOM modificada en modo de movimientos repetitivos, con voladizos de fibra de 100 μ m de longitud multimodales de cuarzo estirados. Se dirigió el voladizo cerca de su frecuencia resonante y se llevó a cabo un barrido de área inicial sobre la superficie del procesador que contenía anticuerpos inmovilizados. La segunda señal armónica se generó a partir de la polimerasa inmovilizada en la célula de flujo mediante la iluminación inicial de una fuente de infrarrojo cercano. El extremo de la NSOM se barrió después sobre la superficie del procesador en la célula de flujo con el fin de obtener una imagen de partículas de oro de 40 nm en la célula de flujo que se asocia a la polimerasa. El extremo se mantiene después de una manera satisfactoria sobre la polimerasa.

El complejo preiniciado precebado se puede después inyectar en la celda de flujo a un caudal de 5 μ l/min de manera que el "corrector" alrededor de la molécula de cebador - molde forme un complejo con la polimerasa inmovilizada. La celda de flujo se mantuvo a 25°C mediante un dispositivo de enfriamiento construido en la celda de flujo.

El tampón de desarrollo se lavó abundantemente de manera continua a través de una celda de flujo a 500 μ l/min. Después de 10 minutos la reacción de secuenciación se inició mediante inyección de 0,4 mM dATP (8 μ l) en el tampón a un caudal de 500 μ l/min. Después de 4 minutos se inyectó 0,4 mM dTTP (8 μ l) en la celda de flujo. Después de otros 4 minutos se inyectó 0,4 mM dGTP (8 μ l) y después de otros otros 4 minutos se inyectó 0,4 mM dCTP (8 μ l). Después este ciclo se repitió 10 veces. Durante el período de tiempo entero la segunda señal armónica transmitida mediante la fibra multimodal se pasó en un monocromador y después en un fotomultiplicador. La señal del fotomultiplicador se amplificó después y se introdujo en un ordenador para procesar y almacenar.

El cambio de intensidad de la segunda señal armónica que surge del complejo polimerasa durante un período de 10 segundos desde el comienzo de cada inyección se calculó después y se representó gráficamente contra los nucleótidos inyectados en la celda de flujo. Los resultados de la reacción de secuenciación se muestran en la Figura 2. Como se puede observar a partir del gráfico, cambios grandes de intensidad (cambios grandes de intensidad son responsables de los nucleótidos idénticos adyacentes entre sí) corresponden al complemento de la SEQ ID NO. 1 (leyendo de derecha a izquierda, menos la parte de la que se hibrida con la secuencia del cebador).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar la secuencia de un polinucleótido, que comprende las etapas de:
- 5 (i) poner en contacto una enzima de tratamiento de polinucleótidos, inmovilizada en una posición fija, con un polinucleótido diana en condiciones suficientes para inducir la actividad de la enzima; y
- (ii) detectar un efecto consecuente con la interacción de la enzima y el polinucleótido,
- 10 en el que el efecto se detecta mediante la medición de una señal óptica no lineal o señal lineal acoplada a una señal no lineal.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el efecto se detecta mediante la medida de una señal no lineal.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la detección óptica no lineal es una formación de imágenes de segunda o tercera generación armónica.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la detección óptica no lineal es espectroscopia Raman o espectroscopía Raman potenciada en superficie.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que una molécula bipolar se posiciona en, o próxima, a la enzima.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula es una molécula de tinte de estirilo.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula es proteína fluorescente verde.
- 30 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6, en el que la molécula dipolar está unida a las bases individuales del polinucleótido.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la enzima es una polimerasa.
- 35 10. A Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la enzima es una enzima helicasa o primasa.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la etapa (i) comprende la adición de los trifosfatos de nucleósidos dATP, dTTP, dGTP y dCTP.
- 40 12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que los trifosfatos de nucleósidos comprenden uno o más grupos de bloqueo que se pueden retirar de manera selectiva mediante luz monocromática por pulsos.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que una nanopartícula metálica se posiciona en, o próxima a, la enzima.
- 45 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la nanopartícula es una nanopartícula de oro o de plata.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14, en el que la nanopartícula se incorpora en una o más de las bases individuales del polinucleótido.
- 50 16. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la enzima está inmovilizada sobre un soporte sólido.
- 55 17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que existe una pluralidad de enzimas inmovilizadas sobre el soporte sólido.
18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16 o reivindicación 17, en el que el soporte sólido tiene una superficie metálica rugosa.
- 60 19. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el soporte es plata u oro.
- 65 20. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la detección se lleva a cabo junto con la Microscopía de Fuerza Atómica o Microscopía Óptica de Barrido, de campo próximo.

ES 2 299 569 T3

21. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además la aplicación de resonancia de plasmón de superficie localizada.

5 22. Un material de soporte sólido, que comprende al menos una polimerasa inmovilizada y al menos una molécula dipolar posicionada en o próxima a la polimerasa,

en el que dicha molécula dipolar es una marca que genera el segundo o tercer armónico y una señal que surge de ella, para la detección usando procedimientos ópticos no lineales.

10 23. Un sistema de formación de imágenes establecido para detectar una señal óptica no lineal, que comprende un soporte sólido que tiene inmovilizado sobre él una enzima que interactúa con un polinucleótido, y una molécula dipolar posicionada sobre, o próxima a, la enzima.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 299 569 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Medical Biosystems Ltd.

5 <120> PROCEDIMIENTO DE SECUENCIACIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS

<130> REP06729WO

10 <140> (no conocido todavía)

<141> 20-05-2002

15 <150> 0112238.1

<151> 2001-05-18

20 <160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligonucleótido sintético

35 <400> 1

caaggagagg acgctgcttg tegaaggtaa ggaacggacg agagaagga gag

53

40 <210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: oligonucleótido sintético

50 <400> 2

ctctcccttc tctcgtc

17

55

60

65