

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 083**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2017** **PCT/CN2017/095520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19023951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2017** **E 17920285 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2023** **EP 3663407**

54 Título: **Método de secuenciación de ácidos nucleicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2023

73 Titular/es:
MGI TECH CO., LTD. (50.0%)
Main Building and Second Floor of No. 11
Building, Beishan Industrial Zone, Yantian
District
Shenzhen, Guangdong 518083, CN y
COMPLETE GENOMICS, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:
YANG, JIN;
XU, XUN;
WANG, HUI;
XIE, BIN;
LI, ZHUOKUN;
ZHAO, SHENGMING;
CHEN, AO;
XU, CHONGJUN;
ZHANG, WENWEI y
NI, MING

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 941 083 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de secuenciación de ácidos nucleicos

Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la secuenciación de ácidos nucleicos. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para secuenciar un ácido nucleico mediante el uso de un protocolo de reacción con inmersión, en donde el protocolo de reacción con inmersión comprende sumergir secuencialmente un soporte sólido que tiene moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo, en diferentes recipientes de reacción para realizar una secuenciación de ácidos nucleicos.

Técnica anterior

La tecnología de la secuenciación de segunda generación se desarrolla en base a la tecnología de secuenciación de Sanger de primera generación y tiene características de bajo costo, alto rendimiento y automatización, y similares. Ha favorecido en gran medida el desarrollo de la industria de la secuenciación génica. Últimamente, la tecnología de secuenciación de segunda generación se ha utilizado ampliamente en la secuenciación del genoma, la secuenciación del transcriptoma y la secuenciación del metagenoma, etc., es una herramienta poderosa para analizar la evolución y la clasificación de organismos, para estudiar genes asociados con enfermedades como el cáncer y el autismo y similares, y para realizar diagnósticos *in vitro*, etc., y favorece una comprensión adicional de las ciencias de la vida y el desarrollo de la industria sanitaria.

Las tecnologías de secuenciación de segunda generación existentes incluyen principalmente la tecnología SBS (secuenciación mediante síntesis) procedente de Illumina, la tecnología de secuenciación con semiconductores procedente de Life Technologies y la tecnología de síntesis mediante sonda-ancla combinatoria (cPAS) procedente de BGI. En la tecnología SBS, se utilizan dNTPs (es decir, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con dos restos modificados (marcador fluorescente y grupo de bloqueo), en donde cada uno de los dATP, dCTP, dGTP y dTTP es portador de diferentes marcadores fluorescentes. Debido a la presencia de un grupo de bloqueo, solo se añade un dNTP complementario a cada molde de ácido nucleico durante la reacción de polimerización. Por tanto, la identidad del dNTP complementario añadido puede determinarse detectando el marcador fluorescente transportado por el dNTP. El grupo de bloqueo reversible y el marcador fluorescente se pueden eliminar posteriormente mediante reactivos (conocidos como reacción de regeneración) para luego realizar la siguiente reacción de polimerización (P085, Genomics, primera edición, 2016, editado por Yang Huanming). En la tecnología de secuenciación con semiconductores, se usa el cambio en el pH causado por el pirofosfato liberado por el dNTP polimerizado durante la extensión de la cadena molde, y ese cambio es detectado por sensores en la parte inferior del chip para obtener información de la secuencia de la cadena de ADN (P083, Genomics, primera edición, 2016, editado por Yang Huanming). El protocolo de la tecnología de secuenciación de segunda generación SOLiD, desarrollada por la empresa ABI (EE. UU.) utiliza el método SBL (secuenciación mediante ligación) para una secuenciación de alto rendimiento. El método SBL de SOLiD utiliza una mezcla de una ligasa y sondas fluorescentes monocatenarias de 8 bases, que se pueden combinar con la ligación circular de diferentes cebadores para lograr una longitud de lectura de entre 35 y 70 nt, y su ventaja es la alta precisión (P093, Genomics, primera edición, 2016, editado por Yang Huanming). La síntesis mediante sonda-ancla combinatoria (cPAS) utiliza un anclaje molecular de ADN y una sonda fluorescente para realizar la polimerización sobre nanoesferas de ADN (DNB), y, a continuación, un sistema de formación de imágenes de alta resolución recoge las señales ópticas, y la secuencia que se va a analizar se puede obtener después de un procesamiento digital de las señales ópticas; en donde la DNB mejora la señal mediante una amplificación lineal, de modo que se reduce la tasa de error de una copia única (véase la plataforma de secuenciación BGISEQ-500).

La parte de reacción bioquímica de la tecnología de secuenciación de segunda generación existente se lleva a cabo principalmente mediante el uso de un sistema de canales de flujo. Un sistema de canales de flujo típico se puede encontrar en el documento WO2007123744, que utiliza un sustrato sólido que incluye una celda de flujo, en donde la celda de flujo incluye uno o más canales de fluido a los que se fija un polinucleótido, y un reactivo marcado con fluorescencia puede controlarse mediante un sistema de guía de flujo para que fluya a través del canal de fluido y entre en contacto con el polinucleótido. Por ejemplo, la plataforma HiSeq 2500 de Illumina utiliza una celda de flujo, los reactivos de la reacción de secuenciación se bombean desde un dispositivo de refrigeración hasta la celda de flujo en una posición y un tiempo específicos y fluyen a través de un chip de secuenciación bajo el control de un conjunto complejo de equipos de control de fluidos y con ayuda de una instalación sofisticada de control de la temperatura, de modo que se garantiza que la reacción bioquímica se ejecuta adecuadamente en un período de tiempo lo más corto posible (HiSeq® 2500 System Guide, Illumina, 2015).

Los métodos de secuenciación de segunda generación existentes requieren un control preciso de la temperatura y del fluido, tienen un costo más alto y son propensos a que se produzcan reacciones no uniformes. Los reactivos son desechables y tienen una tasa de utilización baja, lo que aumenta aún más el costo de la secuenciación. Las plataformas de secuenciación de segunda generación existentes, como HiSeq 2500 y similares, que usan el protocolo de canales de flujo, todavía tienen un bajo rendimiento, es decir, el rendimiento de cada unidad es inferior a 1 WGS/día (haciendo referencia a https://www.illumina.com.cn/systems/hiseq_2500_1500/performance_specifications.html).

Nunez et al. ("A Cost-Effective Approach to Sequence Hundreds of Complete Mitochondrial Genomes", PLOS ONE, vol. 11, nº 8, 2016) describen un enfoque rentable para secuenciar cientos de genomas mitocondriales completos.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de nuevos métodos de secuenciación de segunda generación de alto rendimiento y bajo coste.

5 Descripción de la invención

Teniendo como objetivo los problemas en los métodos de secuenciación de segunda generación existentes, la presente invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico utilizando un protocolo de reacción con inmersión, en donde el protocolo de reacción con inmersión comprende sumergir secuencialmente un soporte sólido que tiene moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo, en diferentes recipientes de reacción para realizar la secuenciación de los ácidos nucleicos. La expresión "protocolo de reacción con inmersión", tal como se utiliza en el presente documento, se menciona con respecto al sistema de canales de flujo utilizado en la técnica anterior, lo que significa que, durante la secuenciación de ácidos nucleicos, el ácido nucleico que se va a secuenciar se mueve para entrar en contacto con cada reactivo de reacción, en lugar de mover el reactivo de reacción a través de un canal de flujo, para ponerlo en contacto con el ácido nucleico. El protocolo de reacción con inmersión tiene al menos las siguientes ventajas: 1) reutilización de los reactivos bioquímicos; 2) buena capacidad de ampliación, uso flexible y capacidad de aumentar considerablemente el rendimiento; 3) no se requiere un sistema complicado para controlar la temperatura y el fluido, y mejor uniformidad de la reacción; y 4) reducción significativa en el coste de la secuenciación génica.

En el método descrito en este documento, la secuenciación de ácidos nucleicos se puede realizar usando una variedad de métodos de secuenciación. Ejemplos de los métodos de secuenciación incluyen, pero no se limitan a, métodos de electroforesis, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante ligación, secuenciación mediante síntesis de sonda-ancla combinatoria, secuenciación mediante hibridación, secuenciación de una sola molécula y secuenciación en tiempo real. En algunas realizaciones, el procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana puede ser un procedimiento automatizado.

Debe entenderse que se puede incorporar cualquier procedimiento de secuenciación al método descrito en este documento. Además, debe entenderse que otros procedimientos de secuenciación conocidos pueden implementarse y usarse sin dificultad en el método descrito en este documento.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico utilizando un protocolo de reacción con inmersión, en donde el protocolo de reacción con inmersión comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un primer lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre ellos,
- b) sumergir el primer lote de soportes sólidos en una o más soluciones de reacción para generar una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, en donde cada una de la solución o más soluciones de reacción se coloca en un recipiente de reacción separado, en donde, después de retirar el primer lote de soportes sólidos de cada una de las soluciones de reacción, lavar el primer lote de soportes sólidos para eliminar la solución de reacción restante sobre los soportes sólidos,
- c) detectar la señal sobre el primer lote de soportes sólidos,
- d) sumergir el primer lote de soportes sólidos en una solución de regeneración situada en otro recipiente de reacción para eliminar la señal sobre los soportes sólidos,
- e) retirar el primer lote de soportes sólidos de la solución de regeneración y lavar el primer lote de soportes sólidos para eliminar la solución de regeneración restante sobre los soportes sólidos, y
- f) opcionalmente, repetir las etapas b) a e) o las etapas b) a c).

En una realización, las etapas b) a e) pueden repetirse una o más veces, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más veces.

En determinadas realizaciones, el lavado se realiza sumergiendo el soporte sólido en un recipiente de reacción que contiene una solución de lavado.

Tal y como se usa en este documento, la inmersión comprende cualquier medio de poner en contacto todas las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el soporte sólido con los reactivos o la solución en el recipiente de reacción. El soporte sólido puede sumergirse parcial o totalmente en el recipiente de reacción, por ejemplo, de forma vertical, inclinada u horizontal, siempre que todas las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el soporte sólido estén en contacto con los reactivos del recipiente de reacción.

Tal y como se usa en este documento, la "molécula de ácido nucleico" que se va a secuenciar puede ser cualquier tipo de ácido nucleico, por ejemplo, el ácido nucleico puede ser ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o un análogo de ADN o ARN elaborado a partir de un análogo de nucleótido, y ese término puede usarse

indistintamente con "polinucleótido". El ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario o contener secuencias tanto monocatenarias como bicatenarias. La molécula de ácido nucleico se puede obtener a partir de una forma de ADN bicatenaria (ADNs) (por ejemplo, ADN genómico, PCR, productos de amplificación, etc.) o se puede obtener a partir de una forma monocatenaria tal como ADN (ADNs) o ARN y se puede convertir en una forma de ADNs, y viceversa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que se va a secuenciar puede estar en forma de una sola molécula (que puede ser una molécula natural, una molécula modificada tal como una molécula marcada o un ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido), un concatémero de secuencia (p. ej., una nanoesfera de ADN, etc.), puede amplificarse (p. ej., amplificar en un concatémero, amplificar en una pluralidad de moléculas individuales que tienen secuencias iguales o similares, etc.) y/o puede estar en cualquier otra forma. La secuencia exacta de la molécula de ácido nucleico puede ser conocida o desconocida. Ejemplos ilustrativos de ácidos nucleicos son los siguientes: genes o fragmentos génicos (p. ej., sondas, cebadores, marcadores EST o SAGE), ADN genómico, fragmentos de ADN genómico, exones, intrones, un ARN mensajero (ARNm), ARN de tránsito, un ARN ribosómico, una ribozima, ADNc, un banco de ácidos nucleicos, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos sintéticos, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, un ADN aislado de cualquier secuencia, un ARN aislado de cualquier secuencia y sondas de ácidos nucleicos, cebadores o copias amplificadas de cualquiera de las secuencias anteriores.

El ácido nucleico puede comprender nucleótidos o análogos de nucleótidos. El nucleótido generalmente comprende una ribosa, una nucleobase y al menos un grupo fosfato. El nucleótido puede estar exento de base (es decir, ausencia de nucleobase). Los nucleótidos comprenden desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, nucleótidos peptídicos, nucleótidos peptídicos modificados, nucleósidos con la estructura principal del sacárido de fosfato modificada y mezclas de los mismos. Ejemplos de nucleótidos incluyen, por ejemplo, monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), monofosfato de timidina (TMP), difosfato de timidina (TDP), trifosfato de timidina (TTP), monofosfato de citidina (CMP), difosfato de citidina (CDP), trifosfato de citidina (CTP), monofosfato de guanosina (GMP), difosfato de guanosina (GDP), trifosfato de guanosina (GTP), monofosfato de uridina (UMP), difosfato de uridina (UDP), trifosfato de uridina (UTP), monofosfato de desoxiadenosina (dAMP), difosfato de desoxiadenosina (dADP), trifosfato de desoxiadenosina (dATP), monofosfato de desoxitimidina (dTMP), difosfato de desoxitimidina (dTDP), trifosfato de desoxitimidina (dTTP), difosfato de desoxicitidina (dCDP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), monofosfato de desoxiguanosina (dGMP), difosfato de desoxiguanosina (dGDP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), monofosfato de desoxiuridina (dUMP), difosfato de desoxiuridina (dUDP) y trifosfato de desoxiuridina (dUTP). Los análogos de nucleótidos que comprenden nucleobases modificadas también se pueden usar en el método descrito en el presente documento. Ya sea teniendo una estructura principal natural o una estructura similar, las nucleobases modificadas ejemplares que pueden estar comprendidas en un polinucleótido incluyen, por ejemplo, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, 2-aminopurina, 5-metilcitosina, 5-hidroxi-metilcitosina, 2-aminoadenina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, 2-propilguanina, 2-propiladenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 15-halouracilo, 15-halocitosina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 6-azouracilo, 6-azocitosina, 6-azotimina, 5-uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina o guanina, 8-amino adenina o guanina, 8-tio adenina o guanina, 8-tioalquil adenina o guanina, 8-hidroxi adenina o guanina, uracilo o citosina sustituidos con halógeno en 5, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina, 3-desazaadenina y similares. Tal y como se conoce en la técnica, ciertos análogos de nucleótidos, por ejemplo, análogos de nucleótidos, tales como 5'-fosforilsulfato de adenosina, no pueden incorporarse en un polinucleótido.

La molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar en realizaciones específicas de la invención puede tener cualquier longitud. En general, ejemplos de longitudes de ácidos nucleicos útiles incluyen, por ejemplo, al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 5.000 o 10.000, 100.000 nucleótidos o más. Alternativa o adicionalmente, la longitud puede no ser superior a 1.000.000, 100.000, 10.000, 1.000, 100 nucleótidos o menos. La longitud de la molécula de ácido nucleico también puede incluir todos los números enteros entre los números de los ejemplos anteriores. Por lo tanto, el ácido nucleico que se puede secuenciar usando el método descrito en este documento, por ejemplo, puede estar dentro del alcance de polinucleótidos cortos, fragmentos, ADNc, genes y fragmentos genómicos.

La cantidad de moléculas de ácido nucleico que se va a secuenciar en una realización específica de la presente invención puede ser cualquier cantidad, por ejemplo, puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más moléculas de ácido nucleico idénticas o diferentes. La cantidad de moléculas de ácido nucleico que se va a secuenciar también puede ser, por ejemplo, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 o 1×10^7 o más moléculas de ácido nucleico idénticas o diferentes. La cantidad de moléculas de ácido nucleico que se va a secuenciar también puede incluir todos los números enteros entre los números de los ejemplos anteriores.

Los ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de cualquier fuente. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede preparar a partir de una molécula de ácido nucleico obtenida de un organismo, o a partir de una población de moléculas de ácido nucleico obtenidas a partir de una fuente natural que incluye uno o más organismos. Las fuentes de moléculas de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, orgánulos, células, tejidos, órganos u organismos. Las células que pueden usarse como fuente de moléculas de ácido nucleico pueden ser procariotas (p. ej., bacterias); o eucariotas, tales como hongos (p. ej., levadura), plantas, protozoos y otros parásitos, y animales (incluyendo insectos, nematodos) y mamíferos (p. ej., rata, ratón, mono, primate no humano y humano); o la molécula de ácido nucleico se puede obtener a partir de un virus.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico se puede obtener a partir de una fuente biológica particular. En una realización preferida, el ácido nucleico es un ácido nucleico humano obtenido a partir de un ser humano, por ejemplo, una muestra de tejido humano. En otra realización preferida, el ácido nucleico es un ácido nucleico mitocondrial humano. En otra realización preferida, el ácido nucleico se puede obtener a partir de una muestra metagenómica. En otras realizaciones, el ácido nucleico se puede obtener a partir de una fuente ambiental que ya no contiene un organismo vivo.

Tal y como se usa en este documento, el término "inmovilizado" significa una fijación directa o indirecta a un soporte sólido a través de un enlace covalente o no covalente. En ciertas realizaciones de la presente descripción, se puede usar una fijación covalente, pero lo que se requiere generalmente es solo que el ácido nucleico esté inmovilizado de manera estable o fijado a un soporte sólido en un estado deseable para usar un soporte sólido (por ejemplo, en una aplicación que requiere una amplificación y/o secuenciación de ácidos nucleicos). Generalmente, un oligonucleótido que se va a utilizar como cebador de captura o cebador de amplificación (por ejemplo, un cebador que tiene una estructura parcialmente de doble cadena de la presente invención) se inmoviliza de manera que el extremo 3' esté disponible para una extensión enzimática y al menos una porción de la secuencia del cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico complementaria. La inmovilización puede ocurrir a través de una hibridación con un oligonucleótido fijado a la superficie, en cuyo caso el oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado puede estar en dirección 3'-5'. Otra forma de fijación no covalente puede ser unir una proteína que se une a ácido nucleico a un soporte sólido mediante una modificación amino y capturar la molécula de ácido nucleico a través de la proteína que se une a ácido nucleico. Alternativamente, la inmovilización puede ocurrir por medios distintos a la hibridación mediante apareamiento de bases, como una fijación covalente descrita anteriormente. Ejemplos no limitativos del método para la fijación del ácido nucleico al soporte sólido, incluyen la hibridación de ácidos nucleicos, la unión con biotina y estreptavidina, la unión con tior, la unión por fotoactivación, la unión covalente, anticuerpo-antígeno, confinamientos físicos a través de hidrogel u otros polímeros porosos, etc. Se pueden encontrar varios ejemplos de métodos para inmovilizar el ácido nucleico sobre el soporte sólido, por ejemplo, en G. Steinberg-Tatman et al., *Bioconjugate Chemistry* 2006, 17, 841-848; Xu X. et al. *Journal of American Chemical Society* 128 (2006) 9286-9287; los documentos de patentes o solicitudes de EE. UU. US5639603, US5641658, US2010248991; los documentos de solicitudes de patentes internacionales WO2001062982, WO2001012862, WO2007111937 y WO0006770; para todos los efectos, especialmente para todas las enseñanzas relevantes de la preparación de soportes sólidos con ácidos nucleicos inmovilizados sobre los mismos.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato o matriz insoluble a la que se puede fijar el ácido nucleico, como, por ejemplo, perlas de látex, perlas de dextrano, superficies de poliestireno, superficies de polipropileno, geles de polipropilenoamida, superficies de oro, superficies de vidrio, chips, sensores, electrodos y obleas de silicio. La superficie del soporte sólido puede tener cualquier forma deseada, y la forma incluye, por ejemplo, una forma plana, esférica o porosa adecuada para una aplicación particular. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una superficie de vidrio plana. El soporte sólido también se puede instalar dentro de una celda de flujo para permitir la interacción con una solución de reactivos múltiples.

En ciertas realizaciones, el soporte sólido puede incluir un sustrato o matriz inerte, y el sustrato o matriz inerte se ha funcionalizado químicamente, por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o recubrimiento de material intermedio, y el material intermedio tiene grupos reactivos que permiten la unión covalente a un polinucleótido. El material intermedio puede fijarse directa o indirectamente al soporte sólido a través de un enlace covalente o no covalente. A modo de ejemplo no limitativo de fijación no covalente a un soporte sólido, ese tipo de soporte puede comprender una capa de hidrogel de poliácridamida sobre un sustrato inerte como el vidrio. En tales realizaciones, el polinucleótido se puede fijar covalentemente, directamente a una capa intermedia (p. ej., un hidrogel), pero la propia capa intermedia se puede fijar de forma no covalente a otra capa de sustrato o matriz (p. ej., un sustrato de vidrio).

Tal y como se usa en este documento, la expresión "recipiente de reacción" se refiere a cualquier dispositivo capaz de contener una solución de reacción, incluyendo, pero sin limitarse a, tanque, canal, pocillo, tubo de ensayo, taza, bandeja y similares. El recipiente de reacción puede tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, el recipiente de reacción puede tener forma cuadrada, esférica, cónica, cilíndrica, irregular, etc. El recipiente de reacción puede tener cualquier tamaño adecuado, por ejemplo, su tamaño puede ajustarse arbitrariamente según el volumen de la solución de reacción que se va a alojar, por ejemplo, puede tener un tamaño capaz de alojar al menos 1 μ L, al menos 5 μ L, al menos 10 μ L, al menos 20 μ L, al menos 50 μ L, al menos 100 μ L, al menos 1 mL, al menos 5 mL, al menos 10 mL, al menos 20 mL, al menos 50 mL, al menos 100 mL, al menos 200 mL, al menos 500 mL, al menos 1 L o más de la reacción solución, o un tamaño capaz de alojar como máximo 1 μ L, como máximo 5 μ L, como máximo 10 μ L, como máximo 20 μ L, como máximo 50 μ L, como máximo 100 μ L, como máximo 1 mL, como máximo 5 mL, como máximo 10 mL, como máximo 20 mL, como máximo 50 mL, como máximo 100 mL, como máximo 200 mL, como máximo 500 mL, como máximo 1 L o más de la solución de reacción. El recipiente de reacción puede estar hecho a base de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, metal tal como acero inoxidable, material polimérico tal como plástico y similares. Debe entenderse que el material del recipiente de reacción no debe afectar negativamente a la reactividad de la solución de reacción.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "solución de reacción" se refiere a los reactivos usados en cualquier método de secuenciación adecuado para uso en el protocolo de la reacción con inmersión descrito en este documento. Tal y como se describe en el presente documento, esos métodos de secuenciación pueden incluir, pero sin limitarse a, métodos de secuenciación mediante electroforesis, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante

ligación, secuenciación mediante síntesis de sonda-ancla combinatoria, secuenciación mediante hibridación, secuenciación mediante molécula única y secuenciación en tiempo real. Por lo tanto, la una o más soluciones de reacción utilizadas en la etapa b) y la solución de regeneración utilizada en la etapa d) del protocolo de reacción con inmersión de la presente invención, dependen del método de secuenciación utilizado. Está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica el poder determinar la una o más soluciones de reacción utilizadas en la etapa b) y la solución de regeneración utilizada en la etapa d) del protocolo de reacción con inmersión de la presente invención, de acuerdo con el método de secuenciación.

Por consiguiente, en una realización específica, la presente invención se refiere a un método para la secuenciación mediante ligación de una molécula de ácido nucleico, usando el protocolo de reacción con inmersión tal y como se describe en este documento. En esa realización, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden un reactivo para generar un producto de ligación sobre la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar y generar una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar en la secuenciación mediante ligación, y la solución de regeneración de la etapa d) comprende un reactivo para eliminar la señal procedente de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar y permitir el inicio de la siguiente reacción de secuenciación mediante ligación.

La secuenciación mediante ligación tal y como se usa en este documento, puede ser cualquiera entre una variedad de métodos de secuenciación mediante ligación bien conocidos en la técnica. Básicamente, la secuenciación mediante ligación implica la hibridación y la ligación de una sonda de secuenciación marcada (p. ej., marcada con fluorescencia) y una sonda de anclaje (también conocida como "cebador" en la secuenciación SOLiD) con una hebra de ADN. La sonda de secuenciación comprende una o dos bases de secuenciación intrínsecamente conocidas (sondas de secuenciación de base única o sondas de secuenciación de dos bases) y una serie de bases degeneradas o universales, que permiten un emparejamiento complementario entre la sonda de secuenciación y el molde de ácido nucleico. La secuencia de la sonda de anclaje es una secuencia conocida que es complementaria a una secuencia adaptadora sobre un molde de ácido nucleico (la secuencia adaptadora significa un oligonucleótido cuya secuencia se conoce sobre el molde de ácido nucleico) y proporciona un sitio para la ligación inicial. Después de la ligación, se obtienen imágenes del molde y se identifican una o dos bases conocidas en la sonda de secuenciación. Una vez que el complejo de sonda de anclaje-sonda de secuenciación se ha eliminado por completo o el marcador (tal como un fluoróforo) se ha eliminado por escisión y el sitio de ligación se ha regenerado, comienza el siguiente ciclo de secuenciación mediante ligación.

Por lo tanto, en una realización de la secuenciación mediante ligación de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de la reacción con inmersión descrito en el presente documento, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden una solución que contiene una sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, marcada fluorescentemente), una ligasa o una mezcla de las mismas, siempre que el soporte sólido esté en contacto con cada una de la sonda de anclaje, la sonda de secuenciación marcada y la ligasa, en donde la señal sobre el soporte sólido es generada por la sonda de secuenciación marcada que se une de forma complementaria a la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido, la sonda de secuenciación marcada se une a través de la ligasa a la sonda de anclaje que se une de forma complementaria a la misma molécula de ácido nucleico. En otra realización de la secuenciación mediante ligación de moléculas de ácido nucleico utilizando el protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento, antes de la etapa b), se permite que el soporte sólido con moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo, entre en contacto con la sonda de anclaje (también conocida como "cebador" en la secuenciación SOLiD), de modo que la sonda de anclaje se hibrida con la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido, y la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden una solución que contiene una sonda de secuenciación marcada (p. ej., marcada con fluorescencia), una ligasa o una mezcla de las mismas, siempre que el soporte sólido esté en contacto con la sonda de secuenciación marcada y la ligasa, y en donde la señal sobre el soporte sólido está generada por la sonda de secuenciación marcada que se une de manera complementaria a la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido, la sonda de secuenciación marcada se une a través de la ligasa a la sonda de anclaje que se une de forma complementaria a la misma molécula de ácido nucleico.

La composición específica de la una o más soluciones de reacción en la etapa b) varía según el método específico de secuenciación mediante ligación que se use. Por ejemplo, cuando se usa una sola sonda de anclaje, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender solo una solución de reacción, en donde la solución de reacción comprende una ligasa y una sonda de secuenciación marcada, opcionalmente, también comprende una sonda de anclaje; alternativamente, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) también pueden comprender dos soluciones de reacción, en donde una de las soluciones de reacción comprende una sonda de anclaje y la otra solución de reacción comprende una sonda de secuenciación marcada, y al menos una de esas dos soluciones de reacción comprende una ligasa, y así, en ese caso, la etapa b) comprende el siguiente procedimiento: sumergir el soporte sólido en la solución de reacción que contiene la sonda de anclaje, lavar y luego sumergir en la solución de reacción que contiene la sonda de secuenciación marcada y lavar. Alternativamente, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender además tres soluciones de reacción, cada una de las cuales comprende una sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada y una ligasa, respectivamente; y en ese caso, la etapa b) comprende el siguiente procedimiento: sumergir el soporte sólido en la solución de reacción que contiene la sonda de anclaje y lavar, luego sumergir en la solución de reacción que contiene la sonda de secuenciación marcada y lavar, y luego sumergir en la solución de reacción que contiene la ligasa y lavar. De manera similar, en el caso de usar sondas de anclaje dobles, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender solo una solución de reacción que contiene simultáneamente una ligasa, una primera sonda de anclaje, una segunda sonda de anclaje

y una sonda de secuenciación marcada, o una pluralidad de soluciones de reacción, cada una de las cuales contiene una ligasa, una primera sonda de anclaje, una segunda sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada o una mezcla de las mismas.

Para la descripción de la secuenciación mediante ligación, especialmente de las sondas de anclaje y las sondas de secuenciación, se puede hacer referencia a los documentos WO2013066975, patentes de EE. UU. nº 60/992.485, 61/026.337, 61/035.914 y 61/061.134. La descripción detallada de la secuenciación mediante ligación también se puede encontrar, por ejemplo, en Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241, 1077-1080 (1988), patente de EE. UU. nº 6.969.488, patente de EE. UU. nº 6.172.218 y patente de EE. UU. nº 6.306.597. En una realización preferida, la secuenciación mediante ligación comprende una secuenciación mediante ligación de sonda-ancla combinatoria (cPAL) (véase la descripción del documento WO2013066975).

Tal y como se usa en este documento, el término "ligasa" se refiere a una enzima modificadora de ácido nucleico que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster intramoleculares e intermoleculares entre los extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo de la cadena de ácido nucleico. La ligasa se puede obtener a partir de fuentes recombinantes o naturales. Se pueden usar una o más ligasas de temperatura baja (p. ej., temperatura ambiente o inferior) (p. ej., ADN ligasa T3, ADN ligasa T4, ADN ligasa T7 y/o ADN ligasa de *E. coli*). La ligasa también puede ser una ligasa termoestable. Se pueden usar ligasas termoestables procedentes de termófilos. Ejemplos de ligasa de ADN termoestable incluyen, pero no se limitan a: ligasa de ADN Tth (procedente de *Thermus thermophilus*, que está disponible, por ejemplo, en Eurogentec y GeneCraft); ADN ligasa Pfu (una ligasa hipertermófila procedente de *Pyrococcus furiosus*); ligasa Taq (procedente de *Thermus aquaticus*), y cualquier otra ligasa termoestable adecuada, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización específica, la presente invención se refiere a un método de secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico, utilizando el protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento. En esa realización, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden un reactivo para llevar a cabo una reacción de polimerización utilizando una molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar como molde en la secuenciación mediante síntesis y generando una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico, y la solución de regeneración de la etapa d) contiene un reactivo para eliminar la señal de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar y permitir el inicio de la siguiente reacción de secuenciación mediante síntesis.

La secuenciación mediante síntesis tal y como se usa en este documento puede ser cualquiera entre una variedad de métodos de secuenciación mediante síntesis bien conocidos en la técnica. Básicamente, la secuenciación mediante síntesis implica en primer lugar hibridar una molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar con cebadores de secuenciación y luego polimerizar un nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia) en el extremo 3' de los cebadores de secuenciación con la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar como molde, en presencia de una polimerasa. Después de la polimerización, el nucleótido marcado se identifica mediante la detección del marcador. Después de eliminar el marcador (tal como un fluoróforo) del nucleótido marcado, comienza el siguiente ciclo de secuenciación mediante síntesis. En una realización, la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar se inmoviliza sobre un soporte sólido, hibridando con cebadores de secuenciación inmovilizados sobre el soporte sólido. En otra realización, en el protocolo de reacción con inmersión de la presente invención, el soporte sólido que tiene moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo se pone en contacto con los cebadores de secuenciación antes de la etapa b), de modo que los cebadores de secuenciación se hibridan con la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido.

Por lo tanto, en una realización para llevar a cabo una secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento, la una o más soluciones de reacción de la etapa b) contienen una polimerasa, un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia) o una mezcla de los mismos, siempre que el soporte sólido esté en contacto con la polimerasa y el nucleótido marcado, y en donde la señal sobre el soporte sólido esté generada por el nucleótido marcado del ácido nucleico que se une complementariamente al soporte sólido, y el nucleótido marcado se polimeriza en un extremo 3' de los cebadores de secuenciación a través de la polimerasa, con la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido como molde. En esa realización, la solución de regeneración de la etapa d) contiene un reactivo para eliminar el marcador del nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia). En una realización preferida de llevar a cabo una secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento, en la etapa b), el soporte sólido se sumerge en una solución de reacción, en donde la solución de reacción comprende una polimerasa y un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia).

El nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia) y el reactivo para eliminar el marcador del nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia) adecuados para uso en la secuenciación mediante síntesis, son bien conocidos en la técnica, y ejemplos no limitantes de ese nucleótido y ese reactivo pueden ser los nucleótidos y los reactivos para eliminar marcadores de nucleótidos marcados, tal y como se encuentran, por ejemplo, en los documentos WO04018497, WO04018493, patente de EE. UU. nº 7.427.673 y patente de EE. UU. nº 7.057.026.

En determinadas realizaciones, el nucleótido marcado puede comprender además un grupo de bloqueo en 3'. El grupo de bloqueo en 3' impide la incorporación de otros nucleótidos cuando el nucleótido marcado se polimeriza formando una cadena de nucleótidos en crecimiento. Preferiblemente, el grupo de bloqueo en 3' se elimina junto con el marcador

en la etapa d). Los grupos de bloqueo en 3' y los reactivos adecuados para eliminar los grupos de bloqueo en 3' de los nucleótidos son bien conocidos en la técnica, y se pueden encontrar ejemplos no limitativos de tales grupos de bloqueo en 3' y reactivos, por ejemplo, en: Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons. Guiller; Metzker et al. (*Nucleic Acids Research*, 22 (20): 4259-4267, 1994); documentos WO91/06678, WO2002/029003, WO2014139596, WO2004/018497.

En una realización preferida, el propio marcador sobre el nucleótido marcado se puede utilizar como grupo de bloqueo en 3'. Sin estar ligado a ninguna teoría, por ejemplo, ese marcador puede tener un tamaño o una estructura suficiente para bloquear la incorporación de otros nucleótidos en la cadena de polinucleótidos. El bloqueo puede deberse a un impedimento estérico o puede deberse a una combinación de tamaño, carga y estructura. En ciertas realizaciones, el marcador y el grupo de bloqueo sobre el nucleótido marcado pueden ser diferentes, pero preferiblemente el marcador y el grupo de bloqueo pueden eliminarse del nucleótido por los mismos medios. En ese caso, el reactivo de regeneración de la etapa d) descrito en este documento, puede comprender un reactivo que puede eliminar simultáneamente el marcador y el grupo de bloqueo en 3' desde el nucleótido marcado. En otras realizaciones, la etapa d) descrita en este documento puede comprender sumergir el soporte sólido respectivamente en un reactivo capaz de eliminar el marcador del nucleótido marcado y un reactivo capaz de eliminar el grupo de bloqueo en 3' del nucleótido marcado.

Tal y como se usa en este documento, el término "polimerasa" se refiere a una enzima para sintetizar una cadena de ácido nucleico o un polímero, incluyendo las ADN polimerasas y las ARN polimerasas. Preferiblemente, la polimerasa utilizada en este documento es una ADN polimerasa. Una polimerasa que se puede utilizar es Sequenase™ (una enzima obtenida a partir de la ADN polimerasa del fago 7 que se modifica para mejorar sus propiedades de secuenciación, véase Tabor y Richarson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 4767-4771 (1987), disponible, por ejemplo, en United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio). Otras polimerasas que se pueden usar en lugar de Sequenase™ incluyen, pero no se limitan a, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la transcriptasa inversa de AMV y la polimerasa Taq. También se pueden encontrar descripciones adicionales sobre polimerasas útiles en los métodos de la invención en los documentos WO05024010 y WO06120433.

Las condiciones para la polimerización comúnmente utilizadas son las de esas enzimas conocidas en la técnica. En el caso de la Sequenase™, las condiciones de la polimerización comprenden: una temperatura en el intervalo de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 45°C; una solución tampón con pH 7 a 8, preferentemente pH 7,3 a 7,7; una concentración de enzima de aproximadamente 0,01 unidades/μL a aproximadamente 1 unidad/μL, un tiempo de reacción de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 minutos, preferiblemente de 1 a 5 minutos. Un tampón típico para la Sequenase™ consiste en: Tris HCl 0,040 M (pH 7,5), cloruro de sodio 0,050 M, cloruro de magnesio 0,010 M, ditiotreitól 0,010 M. En el caso del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la condición típica comprende: temperaturas en el intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 45°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C; un tampón con pH 6,8 a 7,4, preferiblemente pH 7,0 a 7,4; una concentración de enzima de aproximadamente 0,01 unidades/μL a aproximadamente 1 unidad/μL, preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,15 unidades/μL y un tiempo de reacción de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 minutos. Un tampón típico para el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I consiste en: cloruro de trihidroximetil aminometano 0,05 M, pH 7,5, cloruro de magnesio 0,05 M, cloruro de sodio 0,05 M, ditiotreitól 0,010 M.

Debe entenderse que esas condiciones son solo ejemplares. Cuando se usan otras polimerasas, se deben usar las condiciones que sean más adecuadas para ellas, ya que frecuentemente es deseable llevar a cabo la reacción de polimerización lo más rápido posible. Por esa razón, normalmente se requiere una temperatura de 42°C para la transcriptasa inversa; 24°C para la polimerasa Klenow; 37°C para la Sequenase™; y 72°C para la polimerasa Taq. Además, para mejorar la reacción, especialmente en presencia de dNTPs modificados, puede ser ventajoso usar un exceso significativo (más que una cantidad estequiométrica) de dNTPs o modificar otras condiciones como la concentración de sales.

Tal y como se usa en este documento, el término "complementario" o la expresión "sustancialmente complementario" se refiere a una hibridación o emparejamiento de bases o formación de dúplex entre nucleótidos o ácidos nucleicos. Si un nucleótido de un ácido nucleico puede formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido de otro ácido nucleico en una posición dada, los dos ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esa posición. Los nucleótidos complementarios suelen ser A y T (o A y U) o C y G. Cuando se realiza una alineación y una comparación óptimas y se introducen inserciones o deleciones de nucleótidos de manera adecuada, si al menos aproximadamente el 80%, generalmente al menos de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95%, incluso de aproximadamente el 98% al 100%, de los nucleótidos de una hebra y la otra están emparejados, esas dos moléculas de ARN o ADN monocatenarias se consideran sustancialmente complementarias.

Tal y como se usa en este documento, el término "hibridación" se refiere a un enlace de hidrógeno suficiente entre nucleótidos complementarios o bases de nucleótidos, que puede ser, por ejemplo, un enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, y que permite una unión estable y específica entre las cadenas de ácido nucleico. La capacidad de hibridación se determina de acuerdo con condiciones estrictas, incluidas la temperatura y la concentración de un tampón apropiadas, lo que permite una hibridación específica de un ácido nucleico diana con una región total o parcialmente complementaria. Por lo tanto, no todos los nucleótidos de un ácido nucleico tienen que

ser complementarios. Además, una hebra de ácido nucleico es "sustancialmente complementaria" cuando se hibrida con todo, una porción o una región superpuesta de un ácido nucleico diana. Las consideraciones cualitativas y cuantitativas para establecer unas condiciones de hibridación estrictas para diseñar los oligonucleótidos o cebadores de la invención, son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (4ª ed., John Wiley & Sons 1999); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001)); *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* (B.D. Hames & S.J. Higgins compiladores, IRL Press 1985).

Tal y como se usa en este documento, el término " T_m " tal y como se usa en este documento, generalmente se refiere a una temperatura a la que la mitad de las moléculas de ácido nucleico de cadena doble se disocian en cadenas sencillas. La fórmula para calcular la T_m de un ácido nucleico es bien conocida en la técnica. Tal y como se menciona en las referencias convencionales, cuando el ácido nucleico está en una solución acuosa con una concentración de cationes de 0,5 M o menor, la fórmula $T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) - 0,41 (\% [\text{G}+\text{C}]) - 675/n - 1,0m$ puede usarse simplemente para estimar el valor de T_m , en donde el contenido en (G+C) está entre el 30% y el 70%, n es el número de bases y m es el porcentaje de pares de bases no apareadas (véase, por ejemplo, Sambrook J. et al. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press)). Otras referencias describen métodos de cálculo más complejos que tienen en cuenta las características estructurales y de secuencia al calcular la T_m (véase también, Anderson y Young (1985), *Quantitative Filter Hybridization*, *Nucleic Acid Hybridization*, y Allawi y Santa Lucia (1997), *Biochemistry* 36: 10581-94).

Por lo tanto, en una realización específica de la presente invención, se puede usar un dispositivo de control de la temperatura adecuado para ajustar la temperatura en cada recipiente de reacción a la temperatura requerida para la reacción de la solución de reacción o para el lavado con la solución de lavado en el mismo. En una realización, la temperatura requerida para cada recipiente de reacción puede ser diferente. En otra realización, la temperatura requerida para cada recipiente de reacción puede ser parcialmente la misma. En otra realización, la temperatura requerida para cada recipiente de reacción puede ser la misma. Por ejemplo, las temperaturas de los recipientes de reacción que contienen respectivamente una o más soluciones de reacción en la etapa b) descritas en este documento, pueden ser iguales o diferentes entre sí, y pueden ser iguales o diferentes de la temperatura del recipiente de reacción en la etapa d). En una realización, se puede usar un dispositivo de control de la temperatura para controlar las temperaturas de todos los recipientes de reacción. En otra realización, especialmente cuando las temperaturas requeridas para cada uno de los recipientes de reacción no son las mismas, se pueden usar diferentes dispositivos de control de la temperatura para controlar las temperaturas de los recipientes de reacción por separado. El dispositivo de control de la temperatura adecuado que se puede usar en el método de la presente invención está disponible de manera sencilla, por ejemplo, diversos dispositivos de control de la temperatura disponibles comercialmente, como un baño de agua. Al realizar la secuenciación de ácidos nucleicos, la temperatura de cada recipiente de reacción puede depender del método de secuenciación y determinarse de forma rutinaria en función de la reacción realizada en el recipiente de reacción, y la temperatura de cada recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a: al menos aproximadamente 0°C, al menos aproximadamente 5°C, al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 15°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 25°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 35°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 45°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 55°C, al menos aproximadamente 60°C o superior. En algunos casos, pueden ser necesarias temperaturas inferiores a 0°C.

Tal y como se usa en este documento, el término "señal" se refiere a cualquier señal que pueda detectarse, incluyendo, pero sin estar limitadas a, señales ópticas, señales eléctricas, señales electromagnéticas, señales de radiación y similares. La expresión "señal que representa una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico" significa que la señal es portadora de información sobre la secuencia de nucleótidos y puede descodificarse en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar. Por ejemplo, en el caso de que se use una sonda de secuenciación marcada (p. ej., marcada con fluorescencia), la señal generada por el marcador es portadora de información de la secuencia de nucleótidos de la sonda de secuenciación, y la señal puede usarse para obtener la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar en la posición complementaria a la sonda de secuenciación. A modo de otro ejemplo, en el caso de que se utilice un nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia), la señal generada por el marcador es portadora de información de la identidad del nucleótido, y la señal se puede utilizar para obtener la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar en la posición complementaria al nucleótido. En una realización preferida, la señal es una señal fluorescente. En una realización preferida, el marcador es un marcador fluorescente. Los métodos para detectar el marcador o la señal fluorescente son bien conocidos en la técnica. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante un dispositivo que detecta la longitud de onda de la fluorescencia. Esos dispositivos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un dispositivo de ese tipo puede ser un microscopio de exploración confocal que explora la superficie de un soporte sólido con un láser para obtener imágenes de un fluoróforo que se une directamente a una molécula de ácido nucleico que se va a secuenciar. Además, cada una de las señales generadas se puede observar, por ejemplo, con un detector 2-D sensible, tal como un detector de carga acoplada (CCD). También se pueden utilizar, por ejemplo, otras técnicas como la microscopía óptica de barrido de campo cercano (SNOM).

En una realización, antes de la etapa c), es decir, antes de detectar la señal sobre el soporte sólido, el soporte sólido se pone en contacto con un reactivo protector para proteger la molécula de ácido nucleico, la sonda marcada y/o el nucleótido marcado durante la detección; por ejemplo, el soporte sólido se puede sumergir en un recipiente de reacción

que contiene el reactivo protector. El agente protector tal y como se usa en este documento, puede ser, por ejemplo, un agente que evita la deshidratación o la degradación de ácidos nucleicos, un agente que evita la extinción de la fluorescencia y similares. Esos agentes protectores incluyen, pero no se limitan a, p-fenilendiamina (PPD), galato de propilo (NPG), 1,4-diazobis(ciclo-octano) (DABCO), ácido ascórbico (vitamina C), Vectashield, SlowFade, SlowFade Light, etc.

La solución de lavado, tal y como se usa en este documento, puede ser cualquier solución que sea capaz de eliminar por lavado una sustancia unida de forma no específica al soporte sólido y que no afecta negativamente a las reacciones posteriores. Convenientemente, el reactivo de lavado contiene un tampón, tal como una sal orgánica, para mantener un pH estable de aproximadamente pH 6 a pH 9, y también puede contener un catión monovalente o divalente para eliminar una molécula unida no específicamente desde el soporte sólido. Ejemplos de reactivos de lavado pueden incluir, por ejemplo, tampón Tris-HCl 100 mM a pH 6,5, tampón TE (Tris-HCl pH 8, 10 mM y EDTA, 1 mM) y similares. De acuerdo con requisitos prácticos, la solución de lavado utilizada en cada etapa del protocolo de reacción con inmersión descrito en este documento, puede igual o diferente, y puede ajustarse y seleccionarse de manera adaptativa según el método de secuenciación en uso, y esos ajustes y selecciones están todos dentro de las capacidades de los expertos en la materia.

En los métodos de la invención, los reactivos para la secuenciación de ácidos nucleicos pueden reutilizarse o no. Por ejemplo, la una o más soluciones de reacción en la etapa b) y/o la solución de regeneración en la etapa d) se pueden reutilizar al menos una vez, tal como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o más veces. Por lo tanto, en una realización del protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento, el método comprende además, durante una repetición opcional de las etapas b) a e) en la etapa f), la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y/o la solución de regeneración de la etapa d) se puede reemplazar o no.

Generalmente, el número de veces que se reutilizan las soluciones de reacción está relacionado con el grado de debilitamiento de la señal de secuenciación. Es decir, si la señal de secuenciación se debilita significativamente después de reutilizar las soluciones de reacción, de modo que el resultado de la secuenciación es inexacto, esa reutilización es inapropiada y, por lo tanto, las soluciones de reacción deben reemplazarse con soluciones de reacción de nuevo aporte. En una realización preferida, la una o más soluciones de reacción en la etapa b) se pueden reutilizar al menos 10 veces sin afectar significativamente a la fuerza de la señal de secuenciación. En una realización preferida, la solución de regeneración en la etapa d) se puede reutilizar al menos 20 veces sin afectar significativamente a la fuerza de la señal de secuenciación.

Alternativamente, el tiempo para reemplazar la solución de reacción se puede determinar según el tiempo de reacción entre la solución de reacción y el soporte sólido durante cada procedimiento de reacción. El tiempo de reacción entre la solución de reacción y el soporte sólido durante cada reacción de secuenciación depende de la reacción que se va a realizar y de la temperatura de reacción. Por ejemplo, en el caso de la reacción de secuenciación (por ejemplo, en el recipiente de reacción de la etapa b)), la temperatura de reacción puede ser una temperatura adecuada para ejercer la función de la enzima de secuenciación utilizada (como la ligasa o la polimerasa), y por ejemplo, puede ser de al menos aproximadamente 5°C, al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 15°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 25°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 35°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 45°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 55°C, al menos aproximadamente 60°C o más, tal como una temperatura en el intervalo de aproximadamente 10°C a aproximadamente 45°C, preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C. Esa temperatura puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica basándose en la enzima de secuenciación utilizada. El tiempo de cada reacción de secuenciación puede ser el tiempo requerido por la enzima de secuenciación utilizada para incorporar la sonda o el nucleótido marcado en la cadena de ácido nucleico molde, y los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente ese tiempo, por ejemplo, puede ser de al menos 1 s, al menos 5 s, al menos 10 s, al menos 15 s, al menos 20 s, al menos 25 s, al menos 30 s, al menos 40 s, al menos 50 s, al menos 1 minuto, al menos 1,5 minutos, al menos 2 minutos, al menos 2,5 minutos, al menos 3 minutos, al menos 3,5 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos o más. A modo de otro ejemplo, en el caso de la reacción para eliminar el marcador de la sonda o el nucleótido marcado (por ejemplo, en el recipiente de reacción de la etapa d)), la temperatura de reacción puede ser una temperatura adecuada para que se realice la reacción, por ejemplo, puede ser de al menos aproximadamente 5°C, al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 15°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 25°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 35°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 45°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 55°C, al menos aproximadamente 60°C o más, esa temperatura puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia en función del método o el reactivo utilizado para eliminar el marcador de la sonda o el nucleótido marcados. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el tiempo para esa reacción, por ejemplo, puede ser de al menos 1 s, al menos 5 s, al menos 10 s, al menos 15 s, al menos 20 s, al menos 25 s, al menos 30 s, al menos 40 s, al menos 50 s, al menos 1 minuto, al menos 1,5 minutos, al menos 2 minutos, al menos 2,5 minutos, al menos 3 minutos, al menos 3,5 minutos, al menos 4 minutos, al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos o más.

Por lo tanto, en una realización en donde la reacción de secuenciación en la etapa b) se realiza a una temperatura de al menos aproximadamente 5°C, al menos aproximadamente 10°C, al menos aproximadamente 15°C, al menos aproximadamente 20°C, al menos aproximadamente 25°C, al menos aproximadamente 30°C, al menos aproximadamente 35°C, al menos aproximadamente 40°C, al menos aproximadamente 45°C, al menos aproximadamente 50°C, al menos aproximadamente 55°C, al menos aproximadamente 60°C o superior, los reactivos para la reacción de secuenciación pueden reemplazarse en un intervalo de tiempo inferior o igual a aproximadamente 1 hora, inferior o igual a aproximadamente 2 horas, inferior o igual a aproximadamente 3 horas, inferior o igual a aproximadamente 4 horas, inferior o igual a aproximadamente 5 horas, inferior o igual a aproximadamente 6 horas, inferior o igual a aproximadamente 7 horas, inferior o igual a aproximadamente 8 horas, inferior o igual a aproximadamente 9 horas, inferior o igual a aproximadamente 10 horas, inferior o igual a aproximadamente 12 horas, inferior o igual a aproximadamente 15 horas, inferior o igual a aproximadamente 18 horas, inferior o igual a aproximadamente 20 horas, inferior o igual a aproximadamente 22 horas, inferior o igual a aproximadamente 24 o más horas, preferiblemente inferior o igual a aproximadamente 4 horas o 10 horas. En una realización preferida, cuando la temperatura de reacción de la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 55°C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 8 horas, preferiblemente aproximadamente 4 horas. En una realización preferida, cuando la temperatura de reacción de la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 45°C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 24 horas., preferiblemente aproximadamente 10 horas.

Comparado con el protocolo de reacción del canal de flujo adoptado por la actual tecnología de secuenciación de segunda generación, el protocolo de reacción con inmersión de la presente invención es al menos diferente en que el método de la presente invención permite sumergir simultáneamente más de un soporte sólido, mejorando así en gran medida el rendimiento de la secuenciación. Por ejemplo, el método de la presente invención permite sumergir simultáneamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más soportes sólidos. Esos más de un soporte sólido que se sumergen simultáneamente, se denominan en este documento un lote de soportes sólidos. Sin embargo, debe entenderse que ese lote de soportes sólidos también puede consistir en un solo soporte sólido.

Más específicamente, el protocolo de la reacción con inmersión de la presente invención permite un procesamiento por lotes anidado de soportes sólidos. El procesamiento por lotes anidados comprende, durante un procedimiento para llevar a cabo una secuenciación de ácidos nucleicos sobre un primer lote de soportes sólidos, utilizando el protocolo de inmersión de la presente invención, la secuenciación de ácidos nucleicos sobre otro lote de soportes sólidos (es decir, un segundo lote de soportes sólidos) comienza antes de que se complete el primer ciclo de secuenciación, y después de que comience la secuenciación de ácidos nucleicos en el segundo lote de soportes sólidos, también puede comenzar la secuenciación de ácidos nucleicos en un tercer lote de soportes sólidos; de manera similar, después de que comienza la secuenciación de ácidos nucleicos en un lote (N-1)^o de soportes sólidos, la secuenciación de ácidos nucleicos en un lote N de soportes sólidos puede comenzar, siempre que $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}$, en donde N es un valor entero, t_{ciclo} es el tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa e) (se denomina en este documento el tiempo total de un ciclo de secuenciación, de modo que cada "ciclo de secuenciación" tal y como se usa en este documento, comienza sumergiendo los soportes sólidos en una o más soluciones de reacción de la etapa b) y termina con el lavado de los soportes sólidos en la etapa e) en el protocolo de reacción con inmersión de la presente invención), $t_{\text{velocidad-límite}}$ es el tiempo del procedimiento más largo en cada inmersión y lavado en la etapa b), detección en la etapa c), inmersión en la etapa d) y lavado en la etapa e) (en lo sucesivo, referido al tiempo de procedimiento de limitación de la velocidad). Por lo tanto, por ejemplo, si el tiempo total de un ciclo de secuenciación es de 120 segundos, y el procedimiento de limitación de la velocidad en el ciclo de secuenciación es el procedimiento de detección de la etapa c), que requiere 40 segundos, entonces según la ecuación anterior, $N \leq 120\text{s}/40\text{s} = 3$, de modo que como máximo se pueden realizar N = 3 lotes de soportes sólidos en la forma de procesamiento por lotes anidados, en un solo ciclo de secuenciación. A modo de otro ejemplo, si el tiempo total de un ciclo de secuenciación es de 120 segundos, y el procedimiento de limitación de la velocidad en el ciclo de secuenciación es el procedimiento de detección de la etapa c), que requiere 35 segundos, entonces según la ecuación anterior, $N \leq 120\text{s}/35\text{s} = 3,4$, de modo que como máximo se pueden realizar N = 3 lotes de soportes sólidos en forma de procesamiento por lotes anidados, en un solo ciclo de secuenciación. En la realización de la presente invención, se pueden realizar como máximo N = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más lotes de soportes sólidos en forma de procesamiento por lotes anidados en un solo ciclo de secuenciación. En una realización preferida, el tiempo de otros procedimientos en un ciclo de secuenciación se puede ajustar en función del tiempo requerido por el procedimiento de limitación de la velocidad, de modo que el tiempo total del ciclo de secuenciación sea exactamente un múltiplo entero del tiempo requerido por el procedimiento de limitación de la velocidad.

Por lo tanto, en una realización, el protocolo de la reacción con inmersión tal y como se describe en este documento, comprende además: después de sumergir un primer lote de soportes sólidos en una o más soluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa e), sumergir un segundo lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre ellos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), y luego tratar el segundo lote de soportes sólidos de acuerdo con las etapas b) a f); opcionalmente repetir iterativamente este procedimiento durante N-1 veces, en donde $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}$, en donde N es un valor entero, t_{ciclo} es el tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa e) y $t_{\text{velocidad-límite}}$ es el tiempo del procedimiento más largo en cada inmersión y lavado en la etapa b), detección en la etapa c), inmersión en la etapa d) y lavado en la etapa e). Tal y como se usa en este

documento, "repetir iterativamente" significa que después de sumergir un primer lote de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa e), opcionalmente un segundo lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo, se sumerge en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y luego, después de que el segundo lote de soportes sólidos se ha sumergido en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa e), opcionalmente, se sumerge un tercer lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), y a continuación, después de que el tercer lote de soportes sólidos se ha sumergido en la una o más soluciones de reacción en la etapa b) y antes del final de la etapa e), opcionalmente se sumerge un cuarto lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), y así sucesivamente, hasta que el lote (N+1)^o de soportes sólidos se somete iterativa y repetidamente a este procedimiento, en donde $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}$ y N es un valor entero.

En la práctica, el intervalo de tiempo entre sumergir un lote N^o de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y sumergir un lote (N+1)^o de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), cumple las siguientes condiciones:

$$t_N \geq t_{\text{velocidad-límite}} \text{ y } \sum_{N=1}^N t_N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}$$

En una realización, el método de la presente invención permite N = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más lotes de soportes sólidos para uso en un ciclo de secuenciación. Por lo tanto, en comparación con la tecnología de secuenciación de segunda generación existente, el protocolo de la reacción con inmersión de la presente invención mejora en gran medida el rendimiento de la secuenciación y es capaz de secuenciar más ácidos nucleicos en una unidad de tiempo.

En una realización, el protocolo de la reacción con inmersión proporcionado por la presente invención comprende además: añadir una cantidad adecuada de un agente humectante a la una o más soluciones de reacción en la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado en la etapa d). En una realización preferida, se añade una cantidad adecuada de un agente humectante a una primera solución de reacción. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la adición de ese humectante puede ayudar a evitar el secado de la superficie de los soportes sólidos que puede estar causado por evaporación e hidrofobicidad, cuando los soportes sólidos se retiran de la solución de reacción y/o la solución de lavado para exponerlos al aire. Esos humectantes incluyen, pero no se limitan a, alcoholes polihídricos tales como glicerol, propilenglicol, 1,3-butanodiol, sorbitol, polietilenglicol y similares. Debe entenderse que la adición de tal humectante no debe causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción y/o la solución de lavado, los soportes sólidos y las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, y no debe causar un aumento significativo de la cantidad de reactivos transportados sobre los soportes sólidos. En una realización preferida, se añade una cantidad apropiada de glicerol a la una o más soluciones de reacción de la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado en la etapa d). La cantidad del humectante añadida puede ser cualquier cantidad eficaz capaz de mantener húmeda la superficie del soporte sólido. Debe entenderse que esa cantidad no debe causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción y/o la solución de lavado, el soporte sólido y las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, y no debe causar un aumento significativo de la cantidad de reactivos transportados sobre los soportes sólidos. La cantidad de humectante añadido puede ser, por ejemplo, basándose en el volumen de la solución de reacción y/o la solución de lavado, una cantidad de al menos aproximadamente el 0,05%, al menos aproximadamente el 0,1%, al menos aproximadamente el 0,5%, al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 2%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 5%, al menos aproximadamente el 6%, al menos aproximadamente el 7%, al menos aproximadamente el 8%, al menos aproximadamente el 9%, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 11%, al menos aproximadamente el 12%, al menos aproximadamente el 13%, al menos aproximadamente el 14%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20% o más. En una realización preferida, se añade aproximadamente del 5% al 10% de glicerol (v/v) a la una o más soluciones de reacción en la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado en la etapa d).

En una realización, el protocolo de la reacción con inmersión proporcionado por la presente invención, comprende además: añadir a la una o más soluciones de reacción en la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado en la etapa d), una cantidad apropiada de un reactivo para retener la solución de reacción y/o la solución de lavado que queda sobre el soporte sólido, cuando el soporte sólido se retira de la solución de reacción y/o la solución de lavado. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la adición de ese reactivo puede ayudar a evitar el secado causado por la separación de la solución de reacción y/o la solución de lavado restante sobre el soporte sólido desde el extremo superior del soporte sólido, debido a la gravedad cuando se extrae el soporte sólido de la solución de reacción y/o de la solución de lavado. Tal y como se usa en este documento, el extremo superior del soporte sólido se refiere a un extremo que primero se expone al aire cuando se retira el soporte sólido de la solución. En una realización preferida, ese reactivo puede ser, por ejemplo, un tensioactivo. Ese tensioactivo puede incluir, pero sin estar limitado a, Tween-20, ácido esteárico, ácido láurico, laurilsulfato de sodio, dioctilsuccinato sulfonato de sodio (Aerosol-OT), dodecylbencenosulfonato de sodio, glicocolato de sodio, cloruro de benzalconio, bromuro de benzalconio, lecitina, ácidos grasos glicéridos y similares. Debe entenderse que la adición de ese reactivo, tal como un tensioactivo, no

debe causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción y/o la solución de lavado, los soportes sólidos y las moléculas de ácido nucleico transportadas sobre los soportes sólidos, y no debe provocar un aumento significativo de la cantidad de reactivos transportados sobre los soportes sólidos. En una realización preferida, se añade una cantidad apropiada de Tween-20 a la una o más soluciones de reacción de la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado de la etapa d). Ese reactivo, por ejemplo, un tensioactivo, puede añadirse en cualquier cantidad eficaz capaz de retener la solución de reacción y/o la solución de lavado que queda sobre el soporte sólido cuando se extrae el soporte sólido de la solución de reacción y/o la solución de lavado. Debe entenderse que esa cantidad no debe causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción y/o la solución de lavado, los soportes sólidos y las moléculas de ácido nucleico transportadas sobre los soportes sólidos, y no debe causar ningún aumento significativo de la cantidad de reactivos transportados sobre los soportes sólidos. La cantidad de ese reactivo añadido, tal como un tensioactivo, puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 0,001%, al menos aproximadamente el 0,005%, al menos aproximadamente el 0,01%, al menos aproximadamente el 0,02%, al menos aproximadamente el 0,03%, al menos aproximadamente el 0,04%, al menos aproximadamente el 0,05%, al menos aproximadamente el 0,06%, al menos aproximadamente el 0,07%, al menos aproximadamente el 0,08%, al menos aproximadamente el 0,09%, al menos aproximadamente el 0,1%, al menos aproximadamente el 0,2%, al menos aproximadamente el 0,3%, al menos aproximadamente el 0,4%, al menos aproximadamente el 0,5%, al menos aproximadamente el 0,6%, al menos aproximadamente el 0,7%, al menos aproximadamente el 0,8%, al menos aproximadamente el 0,9%, al menos aproximadamente el 1%, al menos aproximadamente el 2%, al menos aproximadamente el 3%, al menos aproximadamente el 4%, al menos aproximadamente el 5% o más, basándose en el volumen de la solución de reacción y/o la solución de lavado. En una realización preferida, se añade aproximadamente del 0,05% a 1% de Tween-20 (v/v) a la una o más soluciones de reacción de la etapa b), la solución de regeneración y/o la solución de lavado de la etapa d).

En una realización, el protocolo de reacción con inmersión proporcionado por la presente invención comprende además: optimizar la velocidad del movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción, de modo que se minimiza el tiempo que el soporte sólido está expuesto al aire. Debe entenderse que esa optimización de la velocidad de movimiento no debe causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción, el soporte sólido y las moléculas de ácido nucleico transportadas en el soporte sólido.

Por lo tanto, en una realización específica, optimizar la velocidad del movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción comprende optimizar la velocidad a la que se extrae el soporte sólido de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción, de modo que el soporte sólido se extrae de la solución o del reactivo lo más rápido posible, sin causar ningún efecto adverso sobre la solución de reacción, el soporte sólido y las moléculas de ácido nucleico transportadas sobre el soporte sólido, debido a una retirada más rápida. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que una retirada más rápida del soporte sólido de la solución o del reactivo puede ayudar a evitar el secado de la superficie del mismo debido a evaporación e hidrofobicidad, y también puede ayudar a reducir la cantidad de solución o de reactivo transportada sobre la superficie del mismo, reduciendo así la contaminación para los procedimientos posteriores. Sin embargo, una velocidad de retirada demasiado rápida puede dañar el soporte sólido y las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo, y afectar a la calidad de la secuenciación. Por lo tanto, la velocidad de retirada puede optimizarse dependiendo del soporte sólido específico que se use, las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo y la solución de reacción o el reactivo. En una realización, la velocidad a la que se retira el soporte sólido de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción, puede ser de, por ejemplo, pero sin estar limitada a, al menos 1 mm/s, al menos 5 mm/s, al menos 10 mm/s, al menos 15 mm/s, al menos 20 mm/s, al menos 25 mm/s, al menos 30 mm/s, al menos 40 mm/s, al menos 50 mm/s o más. En otra realización, la velocidad a la que se retira el soporte sólido de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, pero sin estar limitada a, no superior a 50 mm/s, no superior a 40 mm/s, no superior a 30 mm/s, no superior a 20 mm/s, no superior a 10 mm/s o inferior. En una realización preferida, la velocidad a la que se retira el soporte sólido de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 mm/s.

En una realización específica, optimizar la velocidad del movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción comprende optimizar la velocidad de movimiento del soporte sólido después de retirarlo de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción, para minimizar el tiempo que el soporte sólido está expuesto al aire. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que mover el soporte sólido lo más rápido posible después de sacarlo de la solución o el reactivo en el recipiente de reacción, ayuda a evitar el secado de la superficie del mismo lo que puede estar debido a evaporación e hidrofobicidad. En una realización, la velocidad del movimiento del soporte sólido después de ser retirado de la solución o del reactivo en el recipiente de reacción, se optimiza para que el soporte sólido se exponga al aire durante un tiempo menor o igual a 100 ms, menor o igual a 200 ms, menor o igual a 500 ms, menor o igual a 1 s, menor o igual a 1,5 s, menor o igual a 2 s, menor o igual a 2,5 s, menor o igual a 3 s, menor o igual a 3,5 s, menor o igual a 4 s, menor o igual a 4,5 s, menor o igual a 5 s, menor o igual a 5,5 s, menor o igual a 6 s, menor o igual a 6,5 s, menor o igual a 7 s, menor o igual a 7,5 s, menor o igual a 8 s, menor o igual a 8,5 s, menor o igual a 9 s, menor o igual a 9,5 s, menor o igual a 10 s, menor o igual a 15 s, menor o igual a 20 s, menor o igual a 30 s, menor o igual a 1 min, menor o igual a 2 min, menor o igual a 5 min o menor o igual a 10 min.

Las realizaciones de la presente invención se describirán en detalle a continuación haciendo referencia a los dibujos y los ejemplos. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que los siguientes dibujos y ejemplos se utilizan únicamente para ilustrar la presente invención, en lugar de limitar el alcance de la presente invención. Varios objetos y aspectos ventajosos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de los

dibujos adjuntos y la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo (que muestra un ciclo de secuenciación) de dos realizaciones ejemplares del protocolo de reacción con inmersión de la presente invención, en donde una de las cuales utiliza un reactivo protector que protege el ácido nucleico y el marcador durante la detección.

La Figura 2 muestra una comparación de los datos de una secuenciación entre el protocolo de reacción con inmersión de la presente invención y BGISEQ-500 SE50.

La Figura 3 muestra los resultados de una secuenciación del protocolo de reacción con inmersión mejorado de la presente invención.

La Figura 4 muestra la mejora del secado del extremo superior del chip al añadir una cierta cantidad de tensioactivo al reactivo de polimerización. El lado izquierdo de la figura muestra el extremo inferior del chip y el lado derecho de la figura muestra el extremo superior del chip. Condición 1: añadir de 5% a 10% de glicerol (v/v) a la primera solución de reacción + chip con movimiento rápido; Condición 2: añadir 10% de glicerol (v/v) a la primera solución de reacción + chip con movimiento rápido + añadir de 0,05% a 1% de Tween-20 (v/v) a la primera solución de reacción.

Ejemplos

Las realizaciones de la presente invención se describirán con detalle a continuación, haciendo referencia a los ejemplos, pero los expertos en la materia comprenderán que los siguientes ejemplos solo se utilizan para ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitantes del alcance de la presente invención. Si las condiciones específicas no se indican en los ejemplos, se utilizan las condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por el fabricante. Si los reactivos o los instrumentos utilizados no están especificados por el fabricante, son todos productos convencionales disponibles comercialmente.

Ejemplo 1: Secuenciación de ácidos nucleicos con el protocolo de reacción con inmersión

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se usó un kit de preparación de bancos de ADN MGleasy™ (Shenzhen Huada Zhizao Technology Co., Ltd.) para extraer el ADN de una cepa de *E. coli* convencional como materia prima para preparar un banco para la secuenciación, que se cargó en un chip de secuenciación. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se usaron los reactivos del kit de alto rendimiento BGISEQ-500 (SE50 V3.0, Shenzhen Huada Zhizao Technology Co., Ltd., número de artículo: PF-UM-PEV30) y el diagrama de flujo de la Figura 1A (una realización ejemplar del protocolo de reacción con inmersión descrito en el presente documento) para realizar 10 ciclos de secuenciación de la molécula de ácido nucleico en el chip obtenido, en los que se sumergieron 3 chips simultáneamente.

Los datos de la secuenciación obtenidos se cargaron en BGI Online (véase <https://www.bgionline.cn/>) para análisis, o se usó el programa informático del secuenciador BGISEQ-500 para analizar la calidad de los datos de secuenciación y se generó un informe visual, como se muestra en la Figura 2.

El kit de preparación de bancos de ADN MGleasy™ se utilizó para extraer ADN desde una cepa de *E. coli* convencional como materia prima para preparar un banco para la secuenciación, que se cargó en un chip de secuenciación y se usaron los reactivos de secuenciación en el kit de alto rendimiento BGISEQ-500 (SE50 V3.0), para realizar una reacción de secuenciación como control en un secuenciador BGISEQ-500.

En la Figura 2, Q30 se refería a la ocurrencia de un error en 1000 bases secuenciadas, en donde cuanto mayor era la cantidad, mejor era la calidad de secuenciación; ESR era un indicador de la secuenciación del secuenciador BGISEQ-500 y se refería a la proporción eficaz de nanoesferas de ADN, en donde cuanto mayor era la cantidad, mejor era la calidad de la secuenciación; tasa de cartografiado (del inglés, MappingRate) se refería a la tasa de comparación de los datos de la secuenciación en relación con el genoma de referencia, en donde cuanto mayor era la cantidad, mejor era la calidad de la secuenciación; BarcodeSplitRate se refería a la tasa de división del código de barras, en la que cuanto mayor era la cantidad, mejor era la calidad de la secuenciación.

En comparación con el grupo de control que empleaba el secuenciador BGISEQ-500 para secuenciar el mismo chip, la calidad de los datos de la secuenciación obtenidos con el protocolo de la reacción con inmersión de la presente invención era básicamente similar a la calidad de los obtenidos con el secuenciador BGISEQ-500 (la diferencia estaba dentro del 5%, y la tasa de división del código de barras era mejor que la del secuenciador BGISEQ-500).

Ejemplo 2: Comparación de diferentes protocolos de reacción con inmersión

Usando un procedimiento experimental similar al del Ejemplo 1, el chip se sometió a 15 ciclos de secuenciación usando diferentes protocolos de la reacción con inmersión.

En primer lugar, el chip se secuenció utilizando el siguiente protocolo de inmersión:

Protocolo de inmersión 1: se realizó el mismo procedimiento experimental que en el Ejemplo 1 sobre el chip durante 15 ciclos de secuenciación;

Protocolo de inmersión 2: basándose en el protocolo de inmersión 1, se añadió 5-10% de glicerol (v/v) al reactivo de la reacción de polimerización y el chip se movió rápidamente a una velocidad de 20 mm/s durante el experimento;

Como control, el chip se secuenció utilizando un secuenciador BGISEQ-500.

Se calculó la tasa de disminución de la intensidad de la señal de fluorescencia detectada en el 15º ciclo de secuenciación con respecto a la intensidad de la señal de fluorescencia detectada en el 5º ciclo de secuenciación, para esos tres tipos de procedimientos de secuenciación, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 3, en donde A representa la señal de fluorescencia para detectar la base A; C representa la señal de fluorescencia para detectar la base C; G representa la señal de fluorescencia para detectar la base G; T representa la señal de fluorescencia para detectar la base T; AVG representa el valor promedio de las señales de fluorescencia para detectar las cuatro bases.

Se descubrió que después de añadir glicerol y aumentar la velocidad de izado del chip a 20 mm/s, la tasa de disminución de la señal de fluorescencia del ciclo 15º en relación con la del ciclo 5º, se reducía a aproximadamente un 10%, lo que mostraba una mejora notable en comparación con la tasa de disminución de más del 20% para el protocolo de inmersión 1 (véase la Figura 3).

Además, basándose en un 5% a 10% de glicerol (v/v) + chip de movimiento rápido (Condición 1), se añadió más de un 0,05% a un 1% de Tween-20 (v/v, Condición 2) al reactivo de secuenciación. Usando el mismo procedimiento experimental que en el Ejemplo 1, después de realizar una pluralidad de ciclos de secuenciación en el chip, se usó el programa informático de análisis del secuenciador BGISEQ-500 para obtener un mapa térmico de los valores de la señal de secuenciación en el chip. Los resultados se muestran en la Figura 4. Se encontró que, en comparación con el chip secuenciado en la Condición 1, el fenómeno de secado en el extremo superior del chip secuenciado con la Condición 2 mejoraba significativamente y la calidad de los datos en el extremo superior del chip y las otras regiones del chip no era significativamente diferente (si no se añadía el tensioactivo, el valor de la señal en el extremo superior del chip disminuía significativamente después de 30 ciclos; mientras que después de añadir una cierta cantidad de Tween-20, el valor de la señal en el extremo superior del chip no era significativamente diferente del de otras regiones, lo que indicaba que la uniformidad era mejor) (tal y como se muestra en la Figura 4).

Ejemplo 3: Procesamiento por lotes anidado del protocolo de reacción con inmersión de la presente invención

De acuerdo con una realización del protocolo de reacción con inmersión de la presente invención, se aplicó un procesamiento por lotes anidado de chips en el procedimiento experimental del Ejemplo 1. Cuando se realizó la detección del marcado por fluorescencia después de completar la reacción de polimerización de los tres chips del primer grupo, los otros tres chips del segundo grupo se sumergieron en un reactivo de reacción de secuenciación (es decir, una primera solución de reacción) para iniciar la reacción de secuenciación. En el experimento, el reactivo de polimerización se reemplazó cada 10 ciclos de secuenciación y el reactivo de regeneración se reemplazó cada 20 ciclos de secuenciación. En comparación, el coste era un 25% del del mismo tipo de secuenciación del secuenciador BGISEQ-500. Finalmente, se finalizó un total de 60 ciclos completos de secuenciación para todos de los dos grupos de chips en 2 horas. Por el contrario, en el secuenciador BGISEQ-500 actual o en la plataforma Illumina HiSeq-2500, se necesitaron más de 10 horas para finalizar 60 ciclos de secuenciación completos. Por lo tanto, con el mismo tiempo de secuenciación, el rendimiento de la secuenciación de la presente invención era más de cinco veces superior que el del secuenciador BGISEQ-500 o la plataforma HiSeq-2500, y el rendimiento podía incrementarse aún más y el coste podía reducirse aún más, aumentando el número de lotes para el procesamiento por lotes anidados.

Ejemplo 4: La reutilización de los reactivos de secuenciación no afectaba a la calidad de la secuenciación

Los reactivos de secuenciación que se habían usado en el Ejemplo 1 se usaron nuevamente para realizar el procedimiento de secuenciación descrito en el Ejemplo 1, y los datos de la secuenciación se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se compararon con los reactivos no utilizados. Los resultados de la comparación se muestran en la Tabla 1 a continuación, lo que muestra que los reactivos usados podían realizar la secuenciación con normalidad.

Tabla 1: Comparación de los reactivos usados y no usados:

Condiciones	Reactivos de secuenciación después de 60 ciclos de secuenciación	Reactivos de secuenciación no utilizados
Número de ciclos	50	50
Número total de lecturas (M)	185,14	185,98
Número de lecturas en alineación (M)	184,17	184,75
Q 30%	92,17	91,35

Condiciones	Reactivos de secuenciación después de 60 ciclos de secuenciación	Reactivos de secuenciación no utilizados
Tasa de lecturas efectivas, %	84,39	84,33
Tasa de comparación, %	99,47	99,34
Tasa de error de secuenciación, %	0,1	0,17

Ejemplo 5: Estudio sobre la estabilidad de los reactivos utilizados en el protocolo de reacción con inmersión de la presente invención

5 Los reactivos de secuenciación (los reactivos de secuenciación mencionados en el Ejemplo 1, incluyendo el reactivo de polimerización, el reactivo de lavado 1, el reactivo de lavado 2 y el reactivo de regeneración) se colocaron por separado en baños de agua a 45°C y 55°C, y se procesaron durante diferentes tiempos, incluyendo 4 horas, 8 horas y 24 horas.

10 A continuación, los reactivos tratados térmicamente se usaron para realizar la secuenciación de ácidos nucleicos en un secuenciador BGISEQ-500, y la calidad de los datos de secuenciación se comparó usando el programa informático proporcionado por el secuenciador BGISEQ-500 para determinar la estabilidad del reactivo.

15 Los resultados del análisis de la calidad de los datos de secuenciación se muestran en la Tabla 2. Se pudo observar que los reactivos de secuenciación aún eran estables después de tratarlos a 55°C durante 4 horas o a 45°C durante 8 horas, y la calidad de la secuenciación era esencialmente similar a la del grupo control que empleaba los reactivos que no se habían sometidos al tratamiento térmico. Por lo tanto, basándose en este resultado, se podía determinar que el ciclo de reemplazo de los reactivos de secuenciación en el protocolo de la reacción con inmersión es de 4 horas a 55°C o de 10 horas a 45°C.

Tabla 2: Análisis de la estabilidad de los reactivos de secuenciación en el protocolo de la reacción con inmersión:

Reactivos de secuenciación tratados térmicamente a 45°C				
	Q30 %	ESR %	Tasa de cartografiado %	Tasa de error de secuenciación %
Control	92	78,6	98,4	0,41
Tratamiento térmico, 4 h	89,2	78	90,2	0,59
Tratamiento térmico, 8 h	90,1	92,3	98,3	0,43
Tratamiento térmico, 24 h	85,5	80,1	96,8	0,68
Reactivos de secuenciación tratados térmicamente a 55°C				
	Q30 %	ESR %	Tasa de cartografiado %	Tasa de error de secuenciación %
Control	92,2	78,4	97,8	0,41
Tratamiento térmico, 4 h	92,1	79,6	95,2	0,39
Tratamiento térmico, 8 h	89,8	77,5	91,5	0,66
Tratamiento térmico, 24 h	79,7	79,2	79,3	1,39

REIVINDICACIONES

1. Un método para secuenciar un ácido nucleico usando un protocolo de reacción con inmersión, comprendiendo el protocolo de reacción con inmersión las siguientes etapas:

a) proporcionar un primer lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo,

b) sumergir el primer lote de soportes sólidos en una o más soluciones de reacción para generar una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, en donde cada una de las soluciones de reacción se coloca en un recipiente de reacción separado,

en donde, después de retirar el primer lote de soportes sólidos de cada una de las soluciones de reacción, lavar el primer lote de soportes sólidos para eliminar la solución de reacción restante sobre los soportes sólidos,

c) detectar la señal sobre el primer lote de soportes sólidos,

d) sumergir el primer lote de soportes sólidos en una solución de regeneración colocada en otro recipiente de reacción para eliminar la señal sobre los soportes sólidos,

e) retirar el primer lote de soportes sólidos de la solución de regeneración y lavar el primer lote de soportes sólidos para eliminar la solución de regeneración restante sobre los soportes sólidos, y

f) opcionalmente, repetir las etapas b) a e) o las etapas b) a c).

2. El método según la reivindicación 1, que comprende además: después de sumergir el primer lote de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa e), sumergir un segundo lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácidos nucleicos inmovilizadas sobre los mismos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), y a continuación manejar el segundo lote de soportes sólidos de acuerdo con las etapas b) a f);

opcionalmente repetir iterativamente este procedimiento N-1 veces,

en donde, $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}$, y N es un valor entero,

en donde, t_{ciclo} es un tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa e) y $t_{\text{velocidad-límite}}$ es el tiempo del proceso más largo en cada inmersión y lavar en la etapa b), detectar en la etapa c), sumergir en la etapa d) y lavar en la etapa e).

3. El método según la reivindicación 2, en el que el intervalo de tiempo, t_N , entre sumergir un lote N° de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y sumergir un lote (N+1)° de soportes sólidos en la una o más soluciones de reacción de la etapa b), cumple las siguientes condiciones:

$$t_N \geq t_{\text{velocidad-límite}} \text{ y } \sum_{N=1}^N t_N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{velocidad-límite}}.$$

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada lote de soportes sólidos consiste en uno o más soportes sólidos.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante ligación, una secuenciación mediante síntesis o una secuenciación mediante síntesis de sonda-ancla combinatoria (cPAS).

6. El método según la reivindicación 5, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante ligación, y en el que la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden una solución que contiene una sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada, una ligasa o una mezcla de las mismas, siempre que el soporte sólido esté en contacto con cada una entre la sonda de anclaje, la sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, marcada con fluorescencia) y la ligasa, y en donde la señal sobre el soporte sólido está generada por la sonda de secuenciación marcada que se une de forma complementaria a la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido, la sonda de secuenciación marcada se une a través de la ligasa a la sonda de anclaje que se une de forma complementaria a la misma molécula de ácido nucleico,

preferiblemente, la solución de regeneración de la etapa d) comprende un reactivo que es capaz de eliminar un marcador de la sonda de secuenciación marcada (p. ej., marcada con fluorescencia) o un reactivo que es capaz de eliminar la sonda de secuenciación marcada (p. ej., marcada con fluorescencia) de la molécula de ácido nucleico.

7. El método según la reivindicación 5, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante ligación, que comprende además: antes de la etapa b), poner en contacto los soportes sólidos que tienen las moléculas de

ácido nucleico inmovilizadas sobre ellos con la sonda de anclaje, de modo que la sonda de anclaje se hibrida con la molécula de ácido nucleico sobre los soportes sólidos.

8. El método según la reivindicación 5, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante síntesis, y en el que la una o más soluciones de reacción de la etapa b) comprenden una solución que contiene una polimerasa, cebadores de la secuenciación, un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia) o una mezcla de los mismos, siempre que el soporte sólido esté en contacto con cada una entre la polimerasa, los cebadores de la secuenciación y el nucleótido marcado, y en donde la señal sobre los soportes sólidos está generada por los nucleótidos marcados que se unen de forma complementaria a las moléculas de ácido nucleico sobre el soporte sólido, el nucleótido marcado se polimeriza en un extremo 3' de los cebadores de secuenciación a través de la polimerasa utilizando la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido como molde,

preferiblemente, la solución de regeneración de la etapa d) contiene un reactivo capaz de eliminar un marcador del nucleótido marcado (p. ej., marcado con fluorescencia),

por ejemplo, el nucleótido marcado comprende además un grupo de bloqueo en 3'.

9. El método según la reivindicación 5, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante síntesis, y en el que la molécula de ácido nucleico se inmoviliza sobre el soporte sólido mediante hibridación de los cebadores de secuenciación inmovilizados sobre el soporte sólido.

10. El método según la reivindicación 5, en el que la secuenciación comprende una secuenciación mediante síntesis, que comprende además: antes de la etapa b), poner en contacto el soporte sólido que tiene las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo con los cebadores de la secuenciación, de modo que los cebadores de la secuenciación se hibridan con la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el lavado se realiza sumergiendo los soportes sólidos en un recipiente de reacción que contiene una solución de lavado.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además: añadir un agente humectante, tal como glicerol, a la una o más soluciones de reacción de la etapa b), la solución de regeneración de la etapa d) y/o la solución de lavado de la etapa e) y/o añadir un reactivo, tal como un tensioactivo, como Tween-20, a la una o más soluciones de reacción en la etapa b), la solución de regeneración en la etapa d) y/o la solución de lavado en la etapa e), de modo que se retiene la solución de reacción y/o la solución de lavado restante sobre los soportes sólidos, cuando los soportes sólidos se retiran de la solución de reacción y/o de la solución de lavado.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además: optimizar una velocidad de movimiento de los soportes sólidos entre los recipientes de reacción para minimizar el tiempo que los soportes sólidos están expuestos al aire.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que durante la repetición opcional de las etapas b) a e) en el procedimiento de la etapa f), la una o más soluciones de reacción de la etapa b) y/o la solución de regeneración de la etapa d) se reemplazan o no en cada repetición,

por ejemplo, cuando la una o más soluciones de reacción en la etapa b) tienen una temperatura de reacción por debajo de aproximadamente 55°C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 8 horas,

por ejemplo, cuando la una o más soluciones de reacción en la etapa b) tienen una temperatura de reacción por debajo de aproximadamente 45°C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más soluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 24 horas.

15. Un aparato para secuenciar una molécula de ácido nucleico utilizando el protocolo de reacción con inmersión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo el aparato:

a) uno o más recipientes de reacción, en donde cada uno de los cuales contiene una solución de reacción para poner en contacto una molécula de ácido nucleico para generar una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico;

b) uno o más recipientes de reacción que contienen un reactivo de lavado;

c) un recipiente de reacción que contiene una solución de reacción para eliminar la señal de los soportes sólidos;

d) un medio para detectar la señal; y

e) un dispositivo de control de la temperatura (tal como un baño de agua) para controlar la temperatura del recipiente de reacción en a) a c) anteriores.

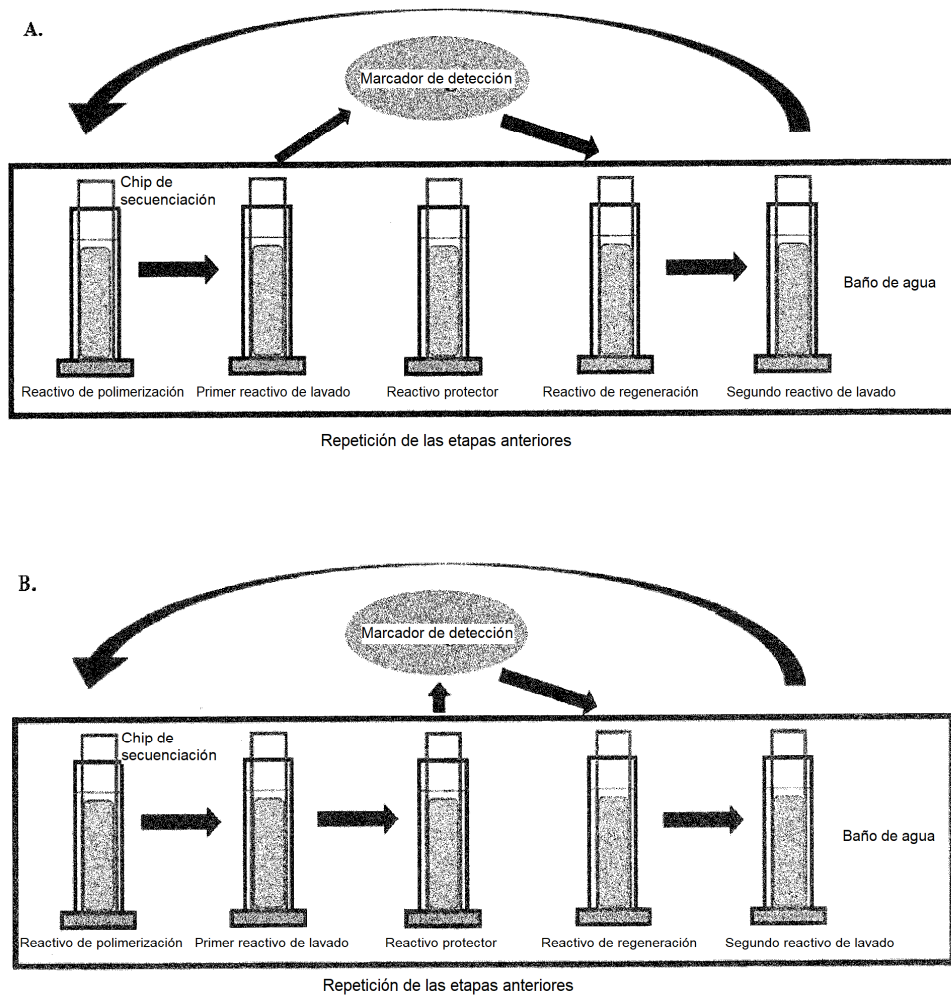


Figura 1

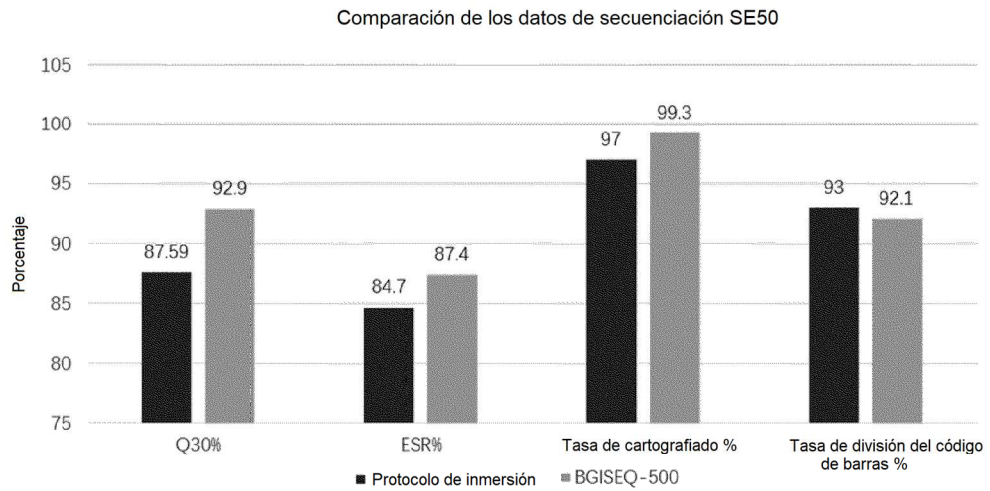


Figura 2

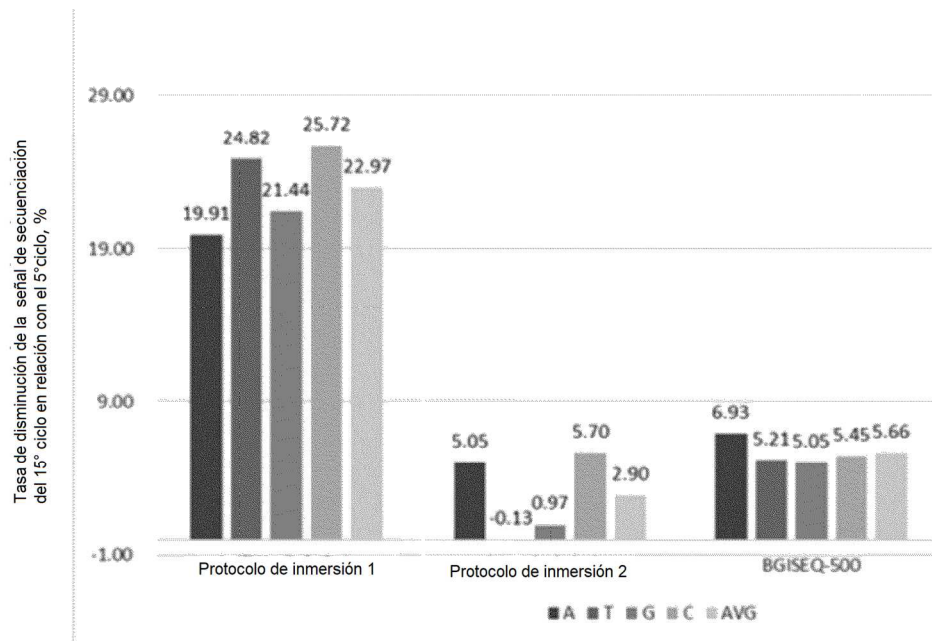


Figura 3

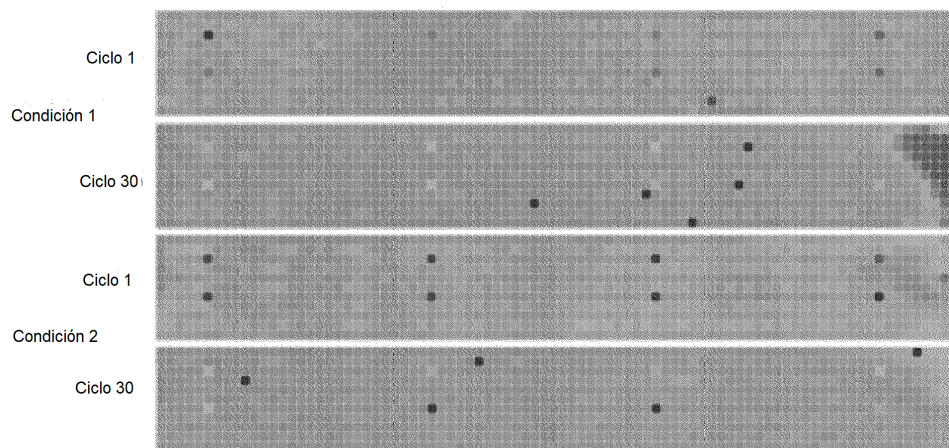


Figura 4