

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 460**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2017** **E 23155047 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 4212628**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.04.2025

73 Titular/es:

MGI TECH CO., LTD. (100.00%)
Main Building and Second Floor of No. 11
Building, Beishan Industrial Zone ,Yantian
District
Shenzhen, Guangdong 518083, CN

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:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 3 014 460 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

5 **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 usando un protocolo de reacción por contacto.

10 **Antecedentes de la técnica**

La tecnología de secuenciación de segunda generación se desarrolla basándose en la tecnología de secuenciación de Sanger de primera generación, y tiene características de bajo coste, alto rendimiento, y automatización, y similares. Ha promovido en gran medida el desarrollo de la industria de la secuenciación génica. Recientemente, la tecnología de secuenciación de segunda generación se ha usado ampliamente en la secuenciación del genoma completo, 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 tales como cánceres y autismo y similares, y para llevar a cabo diagnósticos *in vitro*, etc., y promueve 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 tecnología de SBS (secuenciación mediante síntesis) de Illumina, tecnología de secuenciación con semiconductores de Life Technologies y tecnología de síntesis mediante sonda-anclaje combinatoria (cPAS) de BGI. En la tecnología de SBS, se usan dNTP (es decir, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) con dos restos modificados (marcador fluorescente y grupo de bloqueo), en donde cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP porta diferentes marcadores fluorescentes. Debido a la presencia de un grupo de bloqueo, sólo 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 portado por el dNTP. El grupo de bloqueo reversible y el marcador fluorescente pueden retirarse posteriormente mediante reactivos (conocidos como reacción de regeneración) para 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 provocado por el pirofosfato liberado por el dNTP polimerizado durante la extensión de la cadena molde, y ese cambio lo detectan 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.), usa el método de SBL (secuenciación mediante ligamiento) para una secuenciación de alto rendimiento. El método de SBL de SOLiD usa una mezcla de una ligasa y sondas fluorescentes monocatenarias de 8 bases, que pueden combinarse con el ligamiento 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-anclaje combinatoria (cPAS) usa un anclaje molecular de ADN y una sonda fluorescente para realizar la polimerización sobre nanoesferas de ADN (DNB), y, luego, un sistema de obtención de imágenes de alta resolución recoge las señales ópticas, y la secuencia que va a someterse a prueba puede obtenerse 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 puede encontrarse en el documento WO 2007/123744, que usa un sustrato sólido que incluye una celda de flujo, en donde la celda de flujo incluye uno o más canales de fluido a los cuales se une 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 usa 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 realiza lo suficientemente en un periodo 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 coste 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 adicionalmente el coste de la secuenciación. Las plataformas de secuenciación de segunda generación existentes, tales 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).

Por tanto, existe la necesidad urgente en la técnica de nuevos métodos de secuenciación de segunda generación de

alto rendimiento y bajo coste.

El documento WO 2007/121489 A2 se refiere a reactivos, métodos, y bibliotecas para la secuenciación basada en perlas libre de gel.

El documento WO 2007/120208 A2 se refiere a sistemas y dispositivos para secuenciar mediante análisis de síntesis.

Joaquin Nunez *et al.* (2007) se refieren a un enfoque rentable para secuenciar cientos de genomas mitocondriales completos.

Descripción de la invención

La invención es tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Teniendo como objetivo los problemas en los métodos de secuenciación de segunda generación existentes, la presente divulgación proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico usando un protocolo de reacción por inmersión, en donde el protocolo de reacción por 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 ácidos nucleicos. El término "protocolo de reacción por inmersión", tal como se usa en el presente documento, se menciona con respecto al sistema de canales de flujo usado en la técnica anterior, lo que significa que, durante la secuenciación de ácidos nucleicos, el ácido nucleico que va a secuenciarse 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 por inmersión tiene al menos las siguientes ventajas: 1) reutilización de los reactivos bioquímicos; 2) buena capacidad de ampliación a escala, uso flexible, y capacidad para aumentar considerablemente el rendimiento; 3) sin requisito de 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 el presente documento, la secuenciación de ácidos nucleicos puede realizarse usando una variedad de métodos de secuenciación. Los ejemplos de los métodos de secuenciación incluyen, pero no se limitan a, métodos de electroforesis, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante ligamiento, secuenciación mediante síntesis de sonda-ancraje 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 puede incorporarse cualquier procedimiento de secuenciación al método descrito en el presente documento. Además, debe entenderse que otros procedimientos de secuenciación conocidos pueden implementarse y usarse sin dificultad en el método descrito en el presente documento.

Por tanto, se da a conocer en el presente documento un método para secuenciar un ácido nucleico usando un protocolo de reacción por inmersión, en donde el protocolo de reacción por inmersión comprende las siguientes etapas:

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

b) sumergir el primer lote de soportes sólidos en una o más disoluciones 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 una o más disoluciones 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 disoluciones de reacción, lavar el primer lote de soportes sólidos para retirar la disolución de reacción que permanece 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 disolución 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 disolución de regeneración, y lavar el primer lote de soportes sólidos para retirar la disolución de regeneración que permanece 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.

El lavado puede realizarse sumergiendo el soporte sólido en un recipiente de reacción que contiene una disolución de lavado.

5 Tal como se usa en el presente 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 disolución en el recipiente de reacción. El soporte sólido puede sumergirse parcial o totalmente en el recipiente de reacción, por ejemplo, de manera 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.

10 Tal como se usa en el presente documento, la "molécula de ácido nucleico" que va a secuenciarse 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 este término puede usarse de manera intercambiable con "polinucleótido". El ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario o contener secuencias tanto monocatenarias como bicatenarias. La molécula de ácido nucleico puede derivar de una forma de ADN bicatenario (ADNbc) (por ejemplo, ADN genómico, PCR, productos de amplificación, etc.) o puede derivar de una forma monocatenaria tal como ADN (ADNmc) o ARN y puede convertirse en una forma de ADNbc, y viceversa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que va a secuenciarse 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 (por ejemplo, una nanoesfera de ADN, etc.), puede amplificarse (por ejemplo, amplificarse para dar un concatémero, amplificarse para dar 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. Los ejemplos ilustrativos de ácidos nucleicos son tal como sigue: genes o fragmentos génicos (por ejemplo, sondas, cebadores, etiquetas EST o SAGE), ADN genómico, fragmentos de ADN genómico, exones, intrones, un ARN mensajero (ARNm), ARN de tránsito, un ARN ribosómico, una ribozima, ADNc, una biblioteca 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.

30 El ácido nucleico puede comprender nucleótidos o análogos de nucleótidos. El nucleótido habitualmente comprende una ribosa, una nucleobase, y al menos un grupo fosfato. El nucleótido puede estar libre 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 de sacarido de fosfato modificada, y mezclas de los mismos. Los 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 pueden usarse en el método descrito en el presente documento. Ya sea teniendo una estructura principal natural o una estructura similar, las nucleobases modificadas a modo de ejemplo que pueden estar comprendidas en un polinucleótido incluyen, por ejemplo, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, 2-aminopurina, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, 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 como se conoce en la técnica, determinados análogos de nucleótidos, por ejemplo, análogos de nucleótidos, tales como 5'-fosforilsulfato de adenosina, no pueden incorporarse en un polinucleótido.

60 La molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse en realizaciones específicas de la invención puede tener cualquier longitud. En general, las longitudes a modo de ejemplo 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, 1.000, 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 a modo de ejemplo anteriores. Por tanto, el ácido nucleico que puede secuenciarse usando el método descrito en el presente documento, por ejemplo, puede estar dentro del alcance de polinucleótidos cortos, fragmentos, ADNc, genes, y fragmentos genómicos.

El número de moléculas de ácido nucleico que va a secuenciarse en una realización específica de la presente invención puede ser cualquier número, 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. El número de moléculas de ácido nucleico que va a secuenciarse también puede ser, por ejemplo, de 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. El número de moléculas de ácido nucleico que va a secuenciarse también puede incluir todos los números enteros entre los números a modo de ejemplo anteriores.

Los ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de cualquier fuente. Por ejemplo, el ácido nucleico puede prepararse 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 (por ejemplo, bacterias); o eucariotas, tales como hongos (por ejemplo, levadura), plantas, protozoos, y otros parásitos, y animales (incluyendo insectos, nematodos), y mamíferos (por ejemplo, rata, ratón, mono, primate no humano, y humano); o la molécula de ácido nucleico puede derivar de un virus.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede obtenerse a partir de una fuente biológica particular. En una realización preferida, el ácido nucleico es un ácido nucleico humano obtenido a partir de un 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 puede obtenerse a partir de una muestra metagenómica. En otras realizaciones, el ácido nucleico puede obtenerse a partir de una fuente ambiental que ya no contiene un organismo vivo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmovilizado" significa una unión directa o indirecta a un soporte sólido a través de un enlace covalente o no covalente. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, puede usarse una unión covalente, pero lo que se requiere generalmente es sólo que el ácido nucleico esté inmovilizado o unido de manera estable 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 va a usarse 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 producirse mediante una hibridación con un oligonucleótido unido a la superficie, en cuyo caso el oligonucleótido o polinucleótido inmovilizado puede estar en dirección 3'-5'. Otra forma de unión no covalente puede ser unir una proteína de unión a ácido nucleico a un soporte sólido mediante una modificación amino y capturar la molécula de ácido nucleico a través de la proteína de unión a ácido nucleico. Alternativamente, la inmovilización puede producirse por medios distintos a la hibridación mediante apareamiento de bases, tal como la unión covalente descrita anteriormente. Los ejemplos no limitativos del método para la unión del ácido nucleico al soporte sólido incluyen la hibridación de ácidos nucleicos, la unión con biotina y estreptavidina, la unión con tiol, la unión por fotoactivación, la unión covalente, anticuerpo-antígeno, confinamientos físicos mediante hidrogel u otros polímeros porosos, etc. Pueden encontrarse diversos métodos a modo de ejemplo 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; las patentes o solicitudes estadounidenses US5639603, US5641658, US2010/248991; solicitudes de patentes internacionales WO 2001/062982, WO 2001/012862, WO 2007/111937, y WO 00/06770; para todos los propósitos, especialmente para todas las enseñanzas relevantes de la preparación de soportes sólidos con ácidos nucleicos inmovilizados sobre los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato o matriz insoluble al cual puede unirse el ácido nucleico, tal como, por ejemplo, perlas de látex, perlas de dextrano, superficies de poliestireno, superficies de polipropileno, geles de polipropilenamida, 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. Según la invención, el soporte sólido no es un soporte sólido que se instala dentro de una celda de flujo para permitir la interacción con una disolución de reactivos múltiples.

En determinadas 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 unirse directa o indirectamente al soporte sólido mediante un enlace covalente o no covalente. Como ejemplo no limitativo de unión no covalente a un soporte sólido, este tipo de soporte puede comprender una capa de hidrogel de poli(acrilamida) sobre un sustrato inerte tal como el vidrio. En tales realizaciones, el polinucleótido puede unirse de manera covalente, directamente a una capa intermedia (por ejemplo, un hidrogel), pero la propia capa intermedia puede unirse de manera no covalente a otra capa de sustrato o matriz (por ejemplo, un sustrato de vidrio).

Tal como se usa en el presente documento, el término “recipiente de reacción” se refiere a cualquier dispositivo capaz de contener una disolución de reacción, incluyendo, pero sin limitarse a, tanque, canal, pocillo, tubo de ensayo, taza, placa, 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 disolución de reacción que va a alojarse, 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 disolución de reacción, 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 disolución de reacción. El recipiente de reacción puede estar elaborado 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 disolución de reacción.

Tal como se usa en el presente documento, el término “disolución de reacción” se refiere a reactivos usados en cualquier método de secuenciación adecuado para su uso en el protocolo de reacción por contacto descrito en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, tales métodos de secuenciación pueden incluir, pero sin limitarse a, métodos de secuenciación mediante electroforesis, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante ligamiento, secuenciación mediante síntesis de sonda-anclaje combinatoria, secuenciación mediante hibridación, secuenciación de una sola molécula, y secuenciación en tiempo real. Por tanto, la una o más disoluciones de reacción usadas en la etapa b) y la disolución de regeneración usada en la etapa d) del protocolo de reacción por contacto de la presente invención dependen del método de secuenciación usado. Está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica el determinar la una o más disoluciones de reacción usadas en la etapa b) y la disolución de regeneración usada en la etapa d) del protocolo de reacción por contacto de la presente invención, según el método de secuenciación.

También se divulga en el presente documento un método para la secuenciación mediante ligamiento de una molécula de ácido nucleico, usando el protocolo de reacción por inmersión tal como se describe en el presente documento. La una o más disoluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender un reactivo para generar un producto de ligamiento sobre la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse y generar una señal que representa una secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse en la secuenciación mediante ligamiento, y la disolución de regeneración de la etapa d) comprende un reactivo para eliminar la señal de la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse y permitir el inicio de la siguiente reacción de secuenciación mediante ligamiento.

La secuenciación mediante ligamiento tal como se usa en el presente documento puede ser cualquiera de una variedad de métodos de secuenciación mediante ligamiento bien conocidos en la técnica. Básicamente, la secuenciación mediante ligamiento implica la hibridación y el ligamiento de una sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, 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 apareamiento 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 en el molde de ácido nucleico) y proporciona un sitio para el ligamiento inicial. Después del ligamiento, se obtienen imágenes del molde y se identifican una o dos bases conocidas en la sonda de secuenciación. Después de que el complejo de sonda de anclaje-sonda de secuenciación se ha retirado por completo o el marcador (tal como un fluoróforo) se ha retirado mediante escisión y el sitio de ligamiento se ha regenerado, comienza el siguiente ciclo de secuenciación mediante ligamiento.

Por tanto, en la secuenciación mediante ligamiento de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción por inmersión descrito en el presente documento, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender una disolución que contiene una sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, marcada con fluorescencia), 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 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 manera complementaria a la misma molécula de ácido nucleico. En la secuenciación mediante ligamiento de la molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción por inmersión descrito en el presente documento, antes de la etapa b), puede permitirse 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 disoluciones de reacción de la etapa b) comprenden una

disolución que contiene una sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, marcada con fluorescencia), una ligasa, o una mezcla de las mismas, siempre que el soporte sólido esté en contacto con cualquiera de 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 manera complementaria a la misma molécula de ácido nucleico.

La composición específica de la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) varía dependiendo del método específico de secuenciación mediante ligamiento que se use. Por ejemplo, cuando se usa una sola sonda de anclaje, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender sólo una disolución de reacción, en donde la disolución de reacción comprende una ligasa y una sonda de secuenciación marcada, opcionalmente, también comprende una sonda de anclaje; alternatively, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) también pueden comprender dos disoluciones de reacción, en donde una de las disoluciones de reacción comprende una sonda de anclaje y la otra disolución de reacción comprende una sonda de secuenciación marcada, y al menos una de estas dos disoluciones de reacción comprende una ligasa y, por tanto, en este caso, la etapa b) comprende el siguiente procedimiento: sumergir el soporte sólido en la disolución de reacción que contiene la sonda de anclaje, lavar, y luego sumergir en la disolución de reacción que contiene la sonda de secuenciación marcada, y lavar. Alternativamente, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender además tres disoluciones de reacción, cada una de las cuales comprende una sonda de anclaje, una sonda de secuenciación marcada, y una ligasa, respectivamente; y en tal caso, la etapa b) comprende el siguiente procedimiento: sumergir el soporte sólido en la disolución de reacción que contiene la sonda de anclaje y lavar, luego sumergir en la disolución de reacción que contiene la sonda de secuenciación marcada y lavar, y luego sumergir en la disolución de reacción que contiene la ligasa y lavar. De manera similar, en el caso de usar sondas de anclaje dobles, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) pueden comprender sólo una disolución 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 disoluciones 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 ligamiento, especialmente de las sondas de anclaje y las sondas de secuenciación, puede hacerse referencia a los documentos WO 2013/066975, patentes estadounidenses n.ºs 60/992.485, 61/026.337, 61/035.914 y 61/061.134. La descripción detallada de la secuenciación mediante ligamiento también puede encontrarse, por ejemplo, en Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. y Hood, L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241, 1077-1080 (1988), la patente estadounidense n.º 6.969.488, patente estadounidense n.º 6.172.218, y patente estadounidense n.º 6.306.597. En una realización preferida, la secuenciación mediante ligamiento comprende una secuenciación mediante ligamiento de sonda-anclaje combinatoria (cPAL) (véase la descripción del documento WO 2013/066975).

Tal como se usa en el presente 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 puede obtenerse a partir de fuentes recombinantes o naturales. Pueden usarse una o más ligasas de temperatura baja (por ejemplo, temperatura ambiente o inferior) (por ejemplo, ADN ligasa T3, ADN ligasa T4, ADN ligasa T7, y/o ADN ligasa de *E. coli*). La ligasa también puede ser una ligasa termoestable. Pueden usarse ligasas termoestables de termófilos. Los ejemplos de ADN ligasa termoestable incluyen, pero no se limitan a: ADN ligasa Tth (de *Thermus thermophilus*, que está disponible, por ejemplo, de Eurogentec y GeneCraft); ADN ligasa Pfu (una ligasa hipertermófila procedente de *Pyrococcus furiosus*); ligasa Taq (de *Thermus aquaticus*), y cualquier otra ligasa termoestable adecuada, o cualquier combinación de las mismas.

También se divulga en el presente documento un método de secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico, usando el protocolo de reacción por inmersión descrito en el presente documento. En tal método, la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) comprenden un reactivo para llevar a cabo una reacción de polimerización usando una molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse 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 disolución de regeneración de la etapa d) contiene un reactivo para eliminar la señal de la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse y permitir el inicio de la siguiente reacción de secuenciación mediante síntesis.

La secuenciación mediante síntesis tal como se usa en el presente documento puede ser cualquiera de 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 va a secuenciarse con cebadores de secuenciación, y luego polimerizar un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia) en el extremo 3' de los cebadores de secuenciación con la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse como molde, en presencia de una polimerasa. Después de la polimerización, el nucleótido marcado se identifica mediante la detección del marcador. Después de retirar 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 va a secuenciarse se inmoviliza sobre un soporte sólido, hibridando con cebadores de secuenciación inmovilizados sobre el soporte sólido. En otra realización, en el protocolo de reacción por contacto 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.

5 Por tanto, en una realización para realizar una secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción por contacto descrito en el presente documento, la una o más disoluciones 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 cualquiera de 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, siendo la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido el molde. En tal realización, la disolución de regeneración de la etapa d) contiene un reactivo para retirar el marcador del nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia). En una realización preferida para realizar una secuenciación mediante síntesis de una molécula de ácido nucleico usando el protocolo de reacción por contacto descrito en el presente documento, en la etapa b), el soporte sólido se sumerge en una disolución de reacción, en donde la disolución de reacción comprende una polimerasa y un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia).

20 El nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia) y el reactivo para retirar el marcador del nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia) adecuados para su uso en la secuenciación mediante síntesis se conocen bien en la técnica, y ejemplos no limitativos de tal nucleótido y reactivo pueden ser los nucleótidos y los reactivos para retirar marcadores de nucleótidos marcados, tal como se encuentran, por ejemplo, en los documentos WO 2004/018497, WO 2004/018493, patente estadounidense n.º 7.427.673 y patente estadounidense n.º 7.057.026.

25 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 retira junto con el marcador en la etapa d). Los grupos de bloqueo en 3' y los reactivos adecuados para retirar los grupos de bloqueo en 3' de los nucleótidos se conocen bien en la técnica, y pueden encontrarse 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. Guillian; Metzker *et al.* (Nucleic Acids Research, 22 (20): 4259-4267, 1994); documentos WO 91/06678, WO 2002/029003, WO 2014/139596, WO 2004/018497.

35 En una realización preferida, el propio marcador sobre el nucleótido marcado puede usarse como grupo de bloqueo en 3'. Sin limitarse a ninguna teoría, por ejemplo, tal 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 determinadas 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 retirarse del nucleótido por los mismos medios. En tal caso, el reactivo de regeneración de la etapa d) descrito en el presente documento puede comprender un reactivo que puede retirar simultáneamente el marcador y el grupo de bloqueo en 3' del nucleótido marcado. En otras realizaciones, la etapa d) descrita en el presente documento puede comprender sumergir el soporte sólido respectivamente en un reactivo capaz de retirar el marcador del nucleótido marcado y un reactivo capaz de retirar el grupo de bloqueo en 3' del nucleótido marcado.

45 Tal como se usa en el presente 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 usada en el presente documento es una ADN polimerasa. Una polimerasa que puede usarse es Sequenase™ (una enzima derivada de la ADN polimerasa del fago 7 que se modifica para mejorar sus propiedades de secuenciación, véase Tabor y Richardson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 4767-4771 (1987), disponible, por ejemplo, de United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio). Otras polimerasas que pueden usarse 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 pueden encontrarse descripciones adicionales sobre polimerasas útiles en los métodos de la invención en los documentos WO 2005/024010 y WO 2006/120433.

55 Las condiciones para la polimerización comúnmente usadas son las de estas enzimas conocidas en la técnica. En el caso de Sequenase™, las condiciones de la polimerización comprenden: una temperatura en el intervalo de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 45 °C; una disolución tampón con pH 7 a 8, preferiblemente 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, ditiotritol 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, ditiotritol 0,010 M.

Debe entenderse que esas condiciones son sólo a modo de ejemplo. Cuando se usan otras polimerasas, deben usarse 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 dNTP modificados, puede ser ventajoso usar un exceso significativo (más que una cantidad estequiométrica) de dNTP o modificar otras condiciones tales como la concentración de sales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "complementario" o "sustancialmente complementario" se refiere a una hibridación o apareamiento 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 realizan 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 apareados, estas dos moléculas de ARN o ADN monocatenarias se consideran sustancialmente complementarias.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se refiere a una unión por enlace de hidrógeno suficiente entre nucleótidos complementarios o bases nucleotídicas, que puede ser, por ejemplo, una unión por 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 según condiciones estrictas, incluyendo 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 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 se conocen 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 (editado por B.D. Hames & S.J. Higgins, IRL Press 1985).

Tal como se usa en el presente documento, el término " T_m " tal como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una temperatura a la que la mitad de las moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocian en cadenas sencillas. La fórmula para calcular la T_m de un ácido nucleico se conoce bien en la técnica. Tal como se menciona en las referencias convencionales, cuando el ácido nucleico está en una disolución 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 apareadas erróneamente (véase, por ejemplo, Sambrook J. *et al.* (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press). Otras referencias divulgan 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 tanto, en una realización específica de la presente invención, puede usarse un dispositivo de control de la temperatura adecuado para ajustar la temperatura en cada recipiente de reacción hasta la temperatura requerida para la reacción de la disolución de reacción o para el lavado con la disolución 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 la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) descritas en el presente 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, puede usarse 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, pueden usarse 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 puede usarse en el método de la presente invención está disponible fácilmente, por ejemplo, diversos dispositivos de control de la temperatura disponibles comercialmente, tal 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 manera 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 más. En algunos casos, pueden requerirse temperaturas inferiores a 0 °C.

Tal como se usa en el presente documento, el término "señal" se refiere a cualquier señal que pueda detectarse, incluyendo, pero sin limitarse a, señales ópticas, señales eléctricas, señales electromagnéticas, señales de radiación, y similares. El término "señal que representa una secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico" significa que la señal porta información sobre la secuencia de nucleótidos y puede descodificarse en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse. Por ejemplo, en el caso de que se use una sonda de secuenciación marcada (por ejemplo, marcada con fluorescencia), la señal generada por el marcador porta 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 va a secuenciarse en la posición complementaria a la sonda de secuenciación. Como otro ejemplo, en el caso de que se use un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia), la señal generada por el marcador porta la información de identidad del nucleótido, y la señal puede usarse para obtener la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que va a secuenciarse 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 se conocen bien en la técnica. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante un dispositivo que detecta la longitud de onda de la fluorescencia. Tales dispositivos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un dispositivo de este tipo puede ser un microscopio de barrido confocal que barre 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 va a secuenciarse. Además, cada una de las señales generadas puede observarse, por ejemplo, con un detector 2-D sensible, tal como un detector de carga acoplada (CCD). También pueden usarse, por ejemplo, otras técnicas tales 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 puede sumergirse en un recipiente de reacción que contiene el reactivo protector. El agente protector tal como se usa en el presente 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. Tales agentes protectores incluyen, pero no se limitan a, p-fenilendiamina (PPD), galato de propilo (NPG), 1,4-diazobicio-octano (DABCO), ácido ascórbico (vitamina C), Vectashield, SlowFade, SlowFade Light, etc.

La disolución de lavado tal como se usa en el presente documento puede ser cualquier disolución que sea capaz de eliminar por lavado una sustancia unida de manera inespecífica al soporte sólido y que no afecta negativamente a las reacciones posteriores. De manera adecuada, 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 retirar una molécula unida inespecíficamente del soporte sólido. Los reactivos de lavado a modo de ejemplo 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. Según requisitos prácticos, la disolución de lavado usada en cada etapa del protocolo de reacción por contacto descrito en el presente documento puede ser igual o diferente, y puede ajustarse y seleccionarse de manera adaptativa según el método de secuenciación en uso, y tales ajustes y selecciones están todos dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

En los métodos de la invención, los reactivos para la secuenciación de ácidos nucleicos pueden reutilizarse o no. Por ejemplo, la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) y/o la disolución de regeneración en la etapa d) pueden reutilizarse 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 tanto, el método divulgado en el presente documento puede comprender además, durante una repetición opcional de las etapas b) a e) en la etapa f), la posibilidad de reemplazar o no reemplazar la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y/o la disolución de regeneración de la etapa d).

Generalmente, el número de veces que se reutilizan las disoluciones de reacción se refiere al grado de debilitamiento de la señal de secuenciación. Es decir, si la señal de secuenciación se debilita significativamente después de reutilizar las disoluciones de reacción, de modo que el resultado de la secuenciación es inexacto, tal reutilización es inapropiada y, por tanto, las disoluciones de reacción deben reemplazarse con disoluciones de reacción recién preparadas. En una realización preferida, la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) pueden reutilizarse al menos 10 veces sin afectar significativamente a la fuerza de la señal de secuenciación. En una realización preferida, la disolución de regeneración en la etapa d) puede reutilizarse al menos 20 veces sin afectar significativamente a la fuerza de la señal de secuenciación.

Alternativamente, el tiempo para reemplazar la disolución de reacción puede determinarse según el tiempo de reacción entre la disolución de reacción y el soporte sólido durante cada procedimiento de reacción. El tiempo de

reacción entre la disolución de reacción y el soporte sólido durante cada reacción de secuenciación depende de la reacción que va a realizarse 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 usada (tal como ligasa o 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. Tal temperatura pueden determinarla fácilmente los expertos en la técnica basándose en la enzima de secuenciación usada. El tiempo de cada reacción de secuenciación puede ser el tiempo requerido por la enzima de secuenciación usada para incorporar la sonda o el nucleótido marcados en la cadena de ácido nucleico molde, y tal tiempo pueden determinarlo fácilmente los expertos en la técnica, 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. Como otro ejemplo, en el caso de la reacción para retirar el marcador de la sonda o el nucleótido marcados (por ejemplo, en el recipiente de reacción de la etapa d)), la temperatura de reacción puede ser una temperatura adecuada para la reacción que va a realizarse, 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 temperatura pueden determinarla fácilmente los expertos en la técnica basándose en el método o el reactivo usados para retirar el marcador de la sonda o el nucleótido marcados. El tiempo para tal reacción pueden determinarlo fácilmente los expertos en la técnica, 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 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 más, 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 horas o más, 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 disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 55 °C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 8 horas, preferiblemente de aproximadamente 4 horas. En una realización preferida, cuando la temperatura de reacción de la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 45 °C, el intervalo de tiempo para reemplazar la una o más disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 24 horas, preferiblemente de aproximadamente 10 horas.

En comparación con el protocolo de reacción del canal de flujo adoptado por la actual tecnología de secuenciación de segunda generación, el protocolo de reacción por contacto 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 de ese modo 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. Tales más de un soporte sólido que se sumergen simultáneamente se denominan en el presente documento lote de soportes sólidos. Sin embargo, debe entenderse que ese lote de soportes sólidos también puede consistir en sólo un soporte sólido.

Más específicamente, el protocolo de reacción por inmersión de la presente invención permite un procesamiento por lotes anidados de soportes sólidos. El procesamiento por lotes anidados comprende, durante un procedimiento para realizar una secuenciación de ácidos nucleicos sobre un primer lote de soportes sólidos usando el protocolo de inmersión, 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 (N-1)^{ésimo} lote de soportes sólidos, la secuenciación de ácidos nucleicos en un N lote de soportes sólidos puede comenzar, siempre que $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{limitación de velocidad}}$, en donde N es un valor entero, t_{ciclo} es el tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa e) (se denomina en el presente documento el tiempo total de un ciclo de secuenciación, de modo que cada "ciclo de secuenciación" tal como se usa en el presente documento, comienza sumergiendo los soportes sólidos en una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y termina con el lavado de los soportes sólidos en la etapa e) en el protocolo de reacción por inmersión de la presente invención), $t_{\text{limitación de velocidad}}$ 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) (a continuación en el presente documento, denominado tiempo de procedimiento de limitación de la velocidad). Por 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 basándose la ecuación anterior, $N \leq 120\text{s}/40\text{s} = 3$, de modo que como máximo pueden realizarse N = 3 lotes de soportes sólidos en la forma de procesamiento por lotes anidados en un solo ciclo de secuenciación. Como 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 basándose en la ecuación anterior, $N \leq 120\text{s}/35\text{s} = 3,4$, de modo que como máximo pueden realizarse N = 3 lotes de soportes sólidos en una manera de procesamiento por lotes anidados en un solo ciclo de secuenciación. En la realización de la presente invención, pueden realizarse 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 una manera de procesamiento por lotes anidados en un solo ciclo de secuenciación. Preferiblemente, el tiempo de otros procedimientos en un ciclo de secuenciación puede ajustarse basándose en el 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 tanto, el protocolo de reacción por inmersión tal como se describe en el presente documento puede comprender además: después de sumergir un primer lote de soportes sólidos en una o más disoluciones 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 los mismos en la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), y luego actuar sobre el segundo lote de soportes sólidos según las etapas b) a f); opcionalmente repetir iterativamente este procedimiento durante N-1 veces, en donde $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{limitación de velocidad}}$, en donde N es un valor entero, t_{ciclo} es el tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa e), y $t_{\text{limitación de velocidad}}$ 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 como se usa en el presente documento, "repetir iterativamente" significa que después de sumergir un primer lote de soportes sólidos en la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa e), opcionalmente se sumerge un segundo lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre el mismo en la una o más disoluciones 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 disoluciones 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 disoluciones de reacción de la etapa b), y luego, después de que el tercer lote de soportes sólidos se ha sumergido en la una o más disoluciones 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 disoluciones de reacción de la etapa b), y así sucesivamente, hasta que el (N+1)^{ésimo} lote de soportes sólidos se somete iterativa y repetidamente a este procedimiento, en donde $1 \leq N \leq t_{\text{ciclo}}/t_{\text{limitación de velocidad}}$, y N es un valor entero.

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

$$t_N \geq t_{\text{limitación de velocidad}}, \text{ y } \sum_{N=1}^N t_N \leq t_{\text{ciclo}} - t_{\text{limitación de velocidad}}.$$

En una realización, el método de la presente invención permite que se usen 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 un ciclo de secuenciación. Por tanto, en comparación con la tecnología de secuenciación de segunda generación existente, el protocolo de reacción por contacto 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 reacción por contacto proporcionado por la presente invención comprende además: añadir una cantidad apropiada de un humectante a la una o más disoluciones de reacción en la etapa b), las disoluciones de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado de la etapa e). En una realización preferida, se añade una cantidad apropiada de un humectante a una primera disolución de reacción. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la adición de un humectante de este tipo puede ayudar a evitar el secado de la superficie de los soportes sólidos que puede estar provocado por evaporación e hidrofobia cuando los soportes sólidos se

retiran de la disolución de reacción y/o la disolución de lavado para exponerlos al aire. Tales humectantes incluyen, pero no se limitan a, alcoholes polivalentes tales como glicerol, propilenglicol, 1,3-butanodiol, sorbitol, polietilenglicol, y similares. Debe entenderse que la adición de un humectante de este tipo no debe provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción y/o la disolución de lavado, los soportes sólidos, y las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, y no debe provocar un aumento significativo de la cantidad de reactivos que portan los soportes sólidos. En una realización preferida, se añade una cantidad apropiada de glicerol a la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), la disolución de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado en la etapa e). La cantidad del humectante añadido puede ser cualquier cantidad eficaz capaz de mantener húmeda la superficie del soporte sólido. Debe entenderse que una cantidad de este tipo no debe provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción y/o la disolución de lavado, el soporte sólido, y las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, y no debe provocar un aumento significativo de la cantidad de reactivos que portan los soportes sólidos. La cantidad de humectante añadido puede ser, por ejemplo, basándose en el volumen de la disolución de reacción y/o la disolución 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 disoluciones de reacción en la etapa b), las disolución de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado de la etapa e).

En una realización, el protocolo de reacción por contacto proporcionado por la presente invención comprende además: añadir en la una o más disoluciones de reacción en la etapa b), la disolución de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado en la etapa e), una cantidad apropiada de un reactivo para retener la disolución de reacción y/o la disolución de lavado que permanecen sobre el soporte sólido sobre el mismo, cuando el soporte sólido se retira de la disolución de reacción y/o la disolución de lavado. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la adición de tal reactivo puede ayudar a evitar el secado provocado por la separación de la disolución de reacción y/o la disolución de lavado que permanecen sobre el soporte sólido desde el extremo superior del soporte sólido debido a la gravedad cuando se retira el soporte sólido de la disolución de reacción y/o la disolución de lavado. Tal como se usa en el presente documento, el extremo superior del soporte sólido se refiere a un extremo que se expone al aire primero cuando se retira el soporte sólido de la disolución. En una realización preferida, un reactivo de este tipo puede ser, por ejemplo, un tensioactivo. Tal tensioactivo puede incluir, pero no se limita 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 tal reactivo, tal como un tensioactivo, no debe provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción y/o la disolución de lavado, los soportes sólidos, y las moléculas de ácido nucleico que portan los soportes sólidos, y no debe provocar un aumento significativo de la cantidad de reactivos que portan los soportes sólidos. En una realización preferida, se añade una cantidad apropiada de Tween-20 a la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), la disolución de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado de la etapa e). Un reactivo de este tipo, por ejemplo, un tensioactivo, puede añadirse en cualquier cantidad eficaz capaz de retener la disolución de reacción y/o la disolución de lavado que permanecen sobre el soporte sólido cuando se retira el soporte sólido de la disolución de reacción y/o la disolución de lavado. Debe entenderse que una cantidad de este tipo no debe provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción y/o la disolución de lavado, los soportes sólidos, y las moléculas de ácido nucleico que portan los soportes sólidos, y no debe provocar ningún aumento significativo de la cantidad de reactivos que portan los soportes sólidos. La cantidad de tal 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 disolución de reacción y/o la disolución de lavado. En una realización preferida, se añade aproximadamente del 0,05 % al 1 % de Tween-20 (v/v) a la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), la disolución de regeneración de la etapa d) y/o la disolución de lavado de la etapa e).

En una realización, el protocolo de reacción por contacto proporcionado por la presente invención comprende además: optimizar la velocidad de movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción para minimizar el tiempo que el soporte sólido está expuesto al aire. Debe entenderse que tal optimización de velocidad de movimiento no debe provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción, el soporte sólido, y las moléculas de ácido nucleico que porta el soporte sólido.

Por tanto, en una realización específica, optimizar la velocidad de movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción comprende optimizar la velocidad a la que se retira el soporte sólido de la disolución o del reactivo en el recipiente de reacción, de modo que el soporte sólido se retira de la disolución o del reactivo lo más rápido posible, sin provocar ningún efecto adverso sobre la disolución de reacción, el soporte sólido, y las moléculas de ácido nucleico que porta el soporte sólido, debido a una retirada más rápida. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que una retirada más rápida del soporte sólido de la disolución o del reactivo puede ayudar a evitar el secado de la superficie del mismo debido a evaporación e hidrofobia, y también puede ayudar a reducir la cantidad de disolución o de reactivo que porta la superficie del mismo, reduciendo de ese modo 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 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 disolución de reacción o el reactivo. En una realización, la velocidad a la que se retira el soporte sólido de la disolución o del reactivo en el recipiente de reacción puede ser de, por ejemplo, pero sin limitarse 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 disolución o del reactivo en el recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse 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 disolución o del reactivo en el recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 mm/s.

En una realización específica, optimizar la velocidad de movimiento del soporte sólido entre los recipientes de reacción comprende optimizar la velocidad de movimiento del soporte sólido después de retirarlo de la disolución o del reactivo en el recipiente de reacción para minimizar el tiempo que el soporte sólido está expuesto al aire. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que mover el soporte sólido lo más rápido posible después de retirarlo de la disolución o del reactivo en el recipiente de reacción ayuda a evitar el secado de la superficie del mismo lo que puede deberse a evaporación e hidrofobia. En una realización, la velocidad de movimiento del soporte sólido después de retirarse de la disolución o del reactivo en el recipiente de reacción se optimiza de modo 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.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas 1-14.

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 usan sólo para ilustrar la presente invención, en lugar de limitar el alcance de la presente invención. Diversos objetos y aspectos ventajosos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica 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 a modo de ejemplo del protocolo de reacción por inmersión de la presente invención, una de las cuales usa un reactivo protector que protege el ácido nucleico y el marcador durante la detección.

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

La figura 3 muestra los resultados de secuenciación del protocolo de reacción por inmersión mejorado de la presente invención.

La figura 4 muestra la mejora del secado del extremo superior del chip añadiendo una determinada 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 glicerol a del 5 % al 10 % (v/v) en la primera disolución de reacción + mover rápidamente el chip; condición 2: añadir glicerol al 10 % (v/v) en la primera disolución de reacción + mover rápidamente el chip + añadir Tween-20 a del 0,05 % al 1 % (v/v) en la primera disolución 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 técnica comprenderán que los siguientes ejemplos sólo se usan para ilustrar la presente invención y no deben considerarse limitativos del alcance de la presente invención. Si las condiciones

específicas no se indican en los ejemplos, se usan las condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por el fabricante. Si los reactivos o los instrumentos usados no están especificados por el fabricante, son todos productos convencionales disponibles comercialmente.

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

Según las instrucciones del fabricante, se usó un kit de preparación de bibliotecas de ADN MGleasy™ (Shenzhen Huada Zhizao Technology Co., Ltd.) para extraer ADN de una cepa de *E. coli* convencional como materia prima para preparar una biblioteca para la secuenciación, que se cargó sobre un chip de secuenciación. Según 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 se siguió el diagrama de flujo de la figura 1A (una realización a modo de ejemplo del protocolo de reacción por inmersión descrito en el presente documento) para realizar 10 ciclos de secuenciación de la molécula de ácido nucleico en el chip obtenido, en donde se sumergieron 3 chips simultáneamente.

Los datos de secuenciación obtenidos se cargaron en BGI Online (véase <https://www.bgionline.cn/>) para su 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, tal como se muestra en la figura 2.

Se usó el kit de preparación de bibliotecas de ADN MGleasy™ para extraer ADN de una cepa de *E. coli* convencional como materia prima para preparar una biblioteca para la secuenciación, que se cargó sobre 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 aparición de un error en 1000 bases secuenciadas, en donde cuanto mayor era el número, mejor era la calidad de secuenciación; ESR era un indicador de la secuenciación del secuenciador BGISEQ-500 y se refería a la razón eficaz de nanoesferas de ADN, en donde cuanto mayor era el número, mejor era la calidad de la secuenciación; tasa de mapeo se refería a la tasa de comparación de los datos de secuenciación en relación con el genoma de referencia, en donde cuanto mayor era el número, mejor era la calidad de la secuenciación; tasa de división del código de barras se refería a la tasa de división del código de barras, en donde cuanto mayor era el número, mejor era la calidad de la secuenciación.

En comparación con el grupo de control que usaba el secuenciador BGISEQ-500 para secuenciar el mismo chip, la calidad de los datos de secuenciación obtenidos con el protocolo de reacción por 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 %, tasa de división del código de barras era mejor que la del secuenciador BGISEQ-500).

Ejemplo 2: Comparación de diferentes protocolos de reacción por inmersión

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

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

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

Protocolo de inmersión 2: basándose en el protocolo de inmersión 1, se añadió glicerol al 5-10 % (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 usando 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 estos tres tipos de procedimientos de secuenciación, respectivamente. Los resultados se mostraron en la figura 3, en donde A representó la señal de fluorescencia para detectar la base A; C representó la señal de fluorescencia para detectar la base C; G representó la señal de fluorescencia para detectar la base G; T representó la señal de fluorescencia para detectar la base T; AVG representó 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 levantamiento del chip hasta 20 mm/s, la tasa de disminución de la señal de fluorescencia del 15º ciclo en relación con la del 5º ciclo disminuyó hasta aproximadamente un 10 %, lo que mostró 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 glicerol a del 5 % al 10 % (v/v) + mover rápidamente el chip (condición 1), se añadió

además Tween-20 a del 0,05 % al 1 % (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 las calidades de los datos en el extremo superior del chip y las otras regiones del chip no eran significativamente diferentes (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 determinada cantidad de Tween-20, el valor de la señal en el extremo superior del chip no era significativamente diferente de los de otras regiones, lo que indicaba que la uniformidad era mejor) (tal como se muestra en la figura 4).

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

Según una realización del protocolo de reacción por inmersión de la presente invención, se aplicó un procesamiento por lotes anidados de chips en el procedimiento experimental del ejemplo 1. Cuando se realizó la detección del marcaje 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 disolución 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 completos de secuenciación. Por 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 aumentarse adicionalmente y el coste podía reducirse adicionalmente 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 secuenciación se analizaron tal como se describió en el ejemplo 1 y se compararon con los reactivos sin usar. Los resultados de la comparación se mostraron en la tabla 1 a continuación, que muestra que los reactivos usados podían realizar la secuenciación con normalidad.

Tabla 1: Comparación de los reactivos usados y sin usar:

Condiciones	Reactivos de secuenciación después de 60 ciclos de secuenciación	Reactivos de secuenciación sin usar
Número de ciclos	50	50
Número total de lecturas (M)	185,14	185,98
Número de lecturas en alineación (M)	184,17	184,75
Q30 %	92,17	91,35
Tasa de lecturas efectiva, %	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 usados en el protocolo de reacción por inmersión de la presente invención

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.

Luego los reactivos tratados térmicamente se usaron para realizar la secuenciación de ácidos nucleicos en un secuenciador BGISEQ-500, y las calidades de los datos de secuenciación se compararon usando el programa

informático proporcionado por el secuenciador BGISEQ-500 para determinar la estabilidad del reactivo.

Los resultados del análisis de las calidades de los datos de secuenciación se mostraron en la tabla 2. Pudo observarse que los reactivos de secuenciación todavía eran estables después de tratarse a 55 °C durante 4 horas o a 45 °C durante 8 horas, y las calidades de la secuenciación eran esencialmente similares a la del grupo de control que usaba los reactivos que no se habían sometidos al tratamiento térmico. Por tanto, basándose en este resultado, podía determinarse que el ciclo de reemplazo de los reactivos de secuenciación en el protocolo de reacción por inmersión era de 4 horas a 55 °C, o de 10 horas a 45 °C.

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

Reactivos de secuenciación tratados térmicamente a 45 °C				
	Q30 %	ESR %	Tasa de mapeo %	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 mapeo %	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. Método para secuenciar un ácido nucleico usando un protocolo de reacción por contacto, comprendiendo el protocolo de reacción por contacto las siguientes etapas:
 - a) proporcionar un primer lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos,
 - b) poner en contacto las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los soportes sólidos con una o más disoluciones de reacción para generar una señal que representa uno o más nucleótidos que se unen a las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, en donde cada una de la una o más disoluciones de reacción se coloca en un recipiente de reacción separado,
 - en donde, después de retirar el contacto entre los soportes sólidos y las disoluciones de reacción, poner en contacto los soportes sólidos con una o más disoluciones de lavado para retirar las disoluciones de reacción que permanecen sobre los soportes sólidos,
 - c) detectar la señal sobre los soportes sólidos, y
 - f) repetir las etapas b) a c),
 - en donde el soporte sólido no se instala dentro de una celda de flujo para permitir la interacción con una disolución de múltiples reactivos,
 - en donde el primer lote de soportes sólidos consiste en uno o más soportes sólidos.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el método comprende además las siguientes etapas después de la etapa c) y antes de la etapa f):
 - d) poner en contacto los soportes sólidos con una o más disoluciones de regeneración cada una colocada en un recipiente de reacción separado para eliminar la señal sobre los soportes sólidos, y
 - e) retirar el contacto entre los soportes sólidos y las disoluciones de regeneración, y poner en contacto los soportes sólidos con una o más disoluciones de lavado para retirar las disoluciones de regeneración que permanecen sobre los soportes sólidos,
 - y en donde en la etapa f), opcionalmente, repetir las etapas b) a e) o las etapas b) a c).
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en donde los soportes sólidos pueden seleccionarse de perlas, chips, vidrios, sensores, electrodos, u obleas de silicio.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además: después de poner en contacto el primer lote de soportes sólidos con la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y antes del final de la etapa c) o e), poner en contacto un segundo lote de soportes sólidos que tienen moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos con la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), y luego actuar sobre el segundo lote de soportes sólidos según las etapas b) a f);

opcionalmente repetir iterativamente este procedimiento N-1 veces,

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

en donde, t_{ciclo} es un tiempo total desde la etapa b) hasta la etapa c) o desde la etapa b) hasta la etapa e), y $t_{\text{limitación de velocidad}}$ es el tiempo del procedimiento más largo en cada puesta en contacto y lavado en la etapa b), detección en la etapa c), puesta en contacto en la etapa d), y lavado en la etapa e).
5. Método según la reivindicación 4, en donde el intervalo de tiempo, t_N , entre la puesta en contacto de un $N^{\text{ésimo}}$ lote de soportes sólidos con la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y la puesta en contacto de un $(N+1)^{\text{ésimo}}$ lote de soportes sólidos con la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), cumplen las siguientes condiciones:

$$t_N \geq t_{\text{limitación de velocidad}}, \text{ y } \sum_{N=1}^N t_N \leq t_{\text{ciclo}} - t_{\text{limitación de velocidad}}.$$
6. Método según la reivindicación 5, en donde cada lote de soportes sólidos del $(N+1)^{\text{ésimo}}$ lote de soportes sólidos consiste en uno o más soportes sólidos.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuenciación comprende secuenciación mediante ligamiento, secuenciación mediante síntesis o secuenciación mediante síntesis de sonda-anclaje combinatoria (cPAS).
8. Método según la reivindicación 7, en donde la secuenciación es una secuenciación mediante ligamiento, y en donde la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) comprenden una disolución que contiene sondas de anclaje, sondas de secuenciación marcadas, una ligasa, o una mezcla de las mismas, siempre que los soportes sólidos estén en contacto con cada una de las sondas de anclaje, las sondas de secuenciación marcadas (por ejemplo, marcadas con fluorescencia) y la ligasa, y en donde la señal sobre los soportes sólidos está generada por las sondas de secuenciación marcadas que se unen de manera complementaria a las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos, las sondas de secuenciación marcadas se unen a través de la ligasa a las sondas de anclaje que se unen de manera complementaria a las mismas moléculas de ácido nucleico, preferiblemente, las disoluciones de regeneración de la etapa d) comprenden reactivos que son capaces de retirar marcadores de las sondas de secuenciación marcadas (por ejemplo, marcadas con fluorescencia) o reactivos que son capaces de retirar las sondas de secuenciación marcadas (por ejemplo, marcadas con fluorescencia) de la molécula de ácido nucleico.
9. Método según la reivindicación 7, en donde la secuenciación es secuenciación mediante ligamiento, que comprende además: antes de la etapa b), poner en contacto los soportes sólidos que tienen las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos con la sonda de anclaje, de modo que las sondas de anclaje se hibriden con las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos.
10. Método según la reivindicación 7, en donde la secuenciación es secuenciación mediante síntesis, y en donde la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) comprenden una disolución que contiene una polimerasa, cebadores de secuenciación, un nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia), o una mezcla de los mismos, siempre que los soportes sólidos estén en contacto con cada una de la polimerasa, los cebadores de secuenciación, y el nucleótido marcado, y en donde la señal sobre los soportes sólidos está generada por el nucleótido marcado que se une de manera complementaria a las moléculas de ácido nucleico sobre el soporte sólido, el nucleótido marcado se polimeriza en un extremo 3' del cebador de secuenciación a través de la polimerasa usando la molécula de ácido nucleico sobre el soporte sólido como molde, preferiblemente, las disoluciones de regeneración de la etapa d) contienen reactivos capaces de retirar un marcador del nucleótido marcado (por ejemplo, marcado con fluorescencia), por ejemplo, el nucleótido marcado comprende además un grupo de bloqueo en 3'.
11. Método según la reivindicación 7, en donde la secuenciación es secuenciación mediante síntesis, y en donde las moléculas de ácido nucleico se inmovilizan sobre los soportes sólidos mediante hibridación de los cebadores de secuenciación inmovilizados sobre los soportes sólidos.
12. Método según la reivindicación 7, en donde la secuenciación es secuenciación mediante síntesis, que comprende además: antes de la etapa b), poner en contacto los soportes sólidos que tienen las moléculas de ácido nucleico inmovilizadas sobre los mismos con los cebadores de secuenciación, de modo que los cebadores de secuenciación se hibridan con las moléculas de ácido nucleico sobre los soportes sólidos.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además: añadir humectantes, tales como glicerol, a la una o más disoluciones de reacción de la etapa b), las disoluciones de regeneración de la etapa d) y/o las disoluciones de lavado de la etapa e), y/o añadir reactivos, tal como tensioactivos, tales como Tween-20, a la una o más disoluciones de reacción en la etapa b), las disoluciones de regeneración en la etapa d) y/o las disoluciones de lavado en la etapa e), para retener las disoluciones de reacción y/o las disoluciones de lavado que permanecen sobre los soportes sólidos cuando se retira el contacto entre los soportes sólidos y las disoluciones de reacción y/o las disoluciones de lavado.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde durante la repetición opcional de las etapas b) a c) o las etapas b) a e), la una o más disoluciones de reacción de la etapa b) y/o las disoluciones de regeneración de la etapa d) se reemplazan o no en cada repetición, por ejemplo, cuando la una o más disoluciones 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

disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 8 horas,

por ejemplo, cuando la una o más disoluciones 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 disoluciones de reacción en la etapa b) es inferior a aproximadamente 24 horas.

5

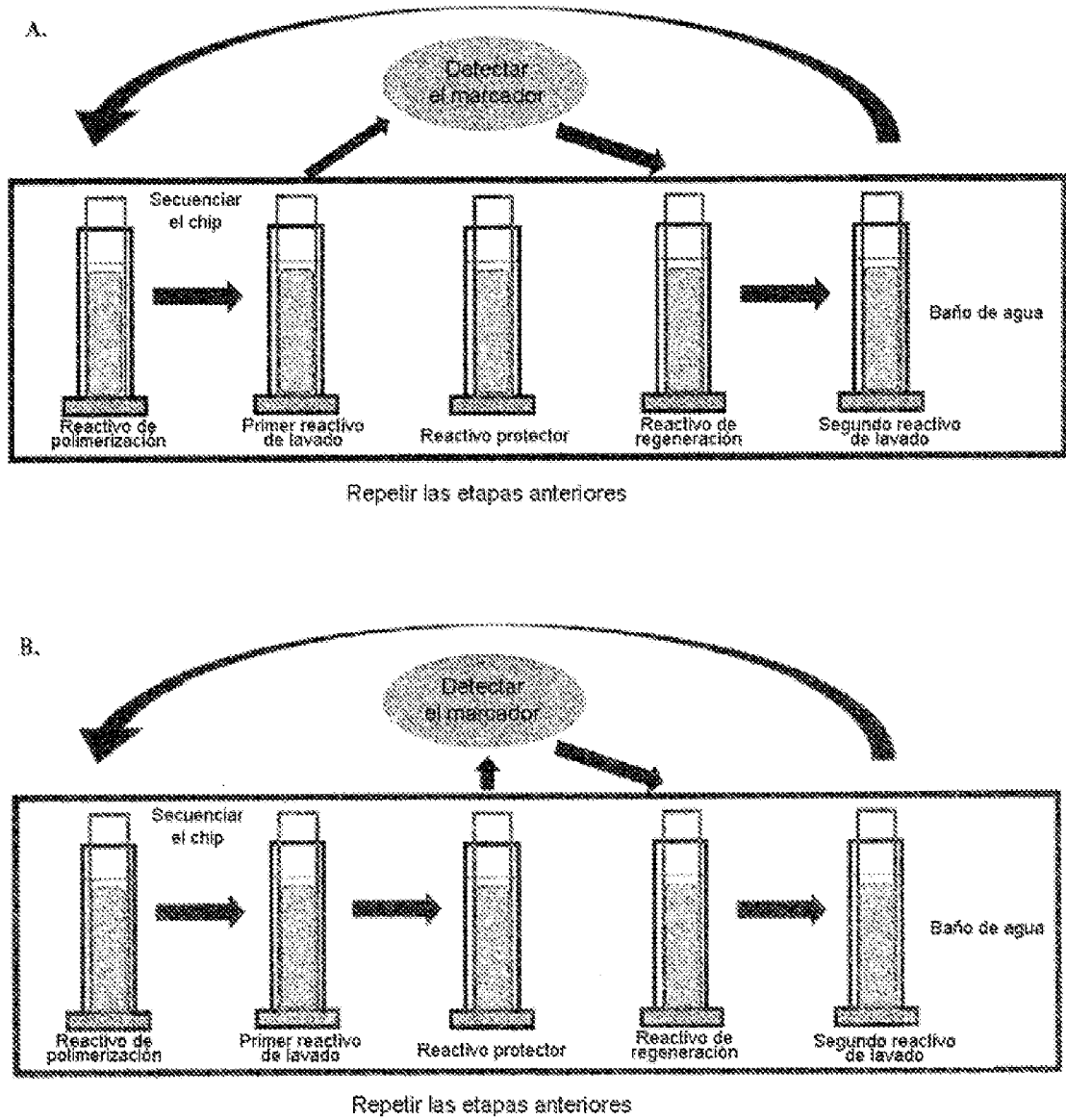


Figura 1

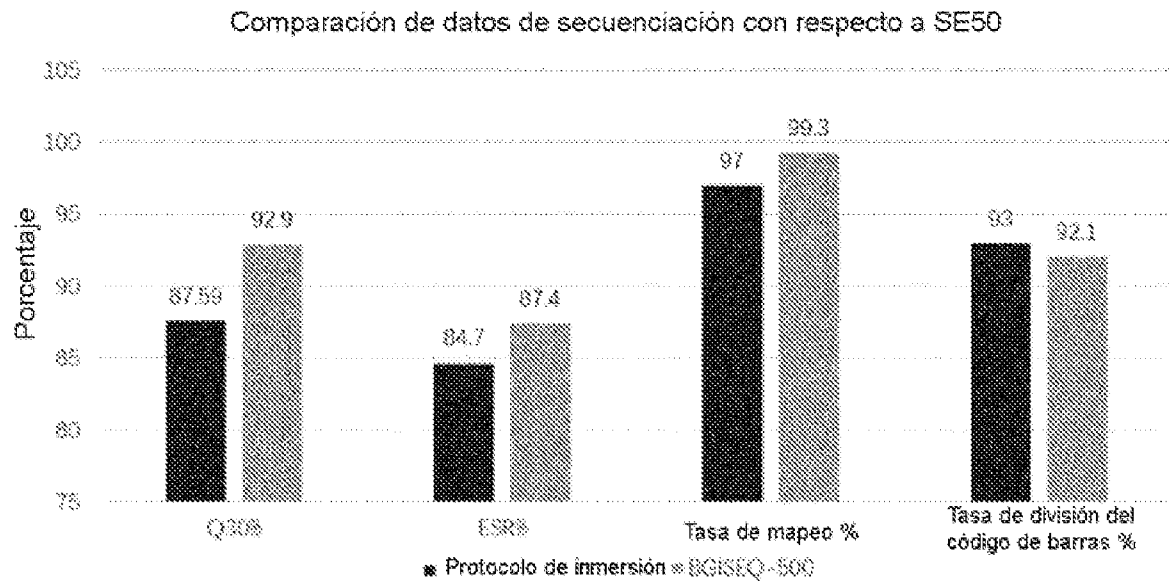


Figura 2

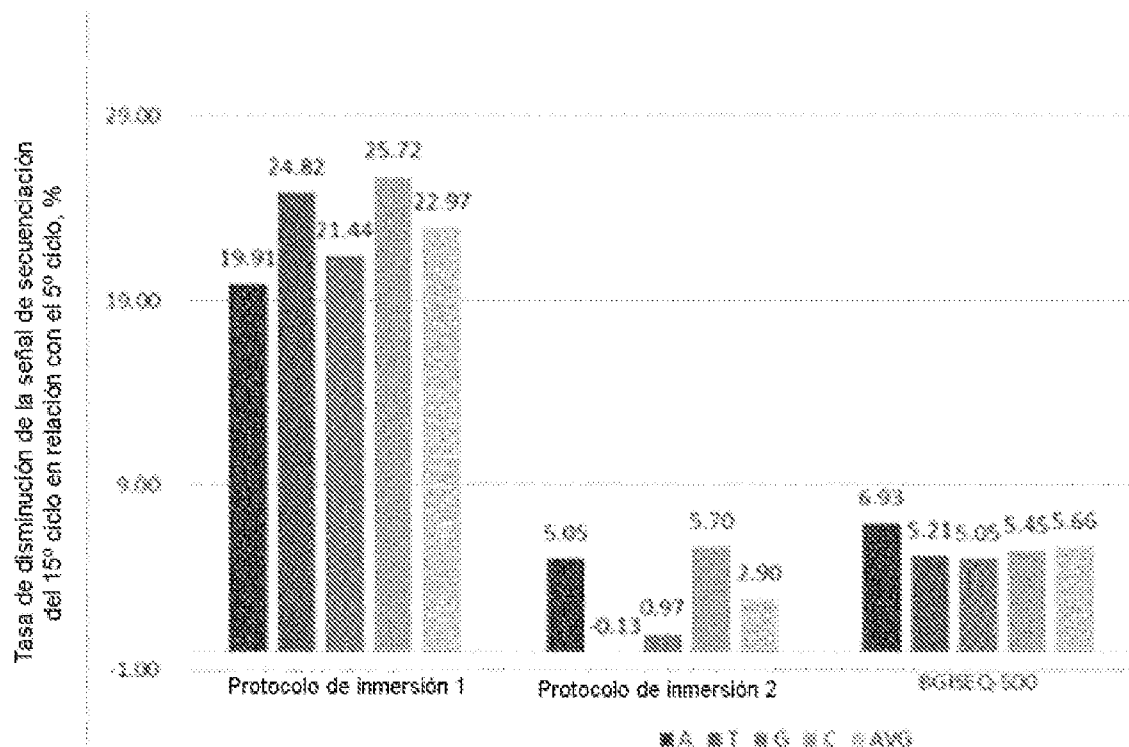


Figura 3

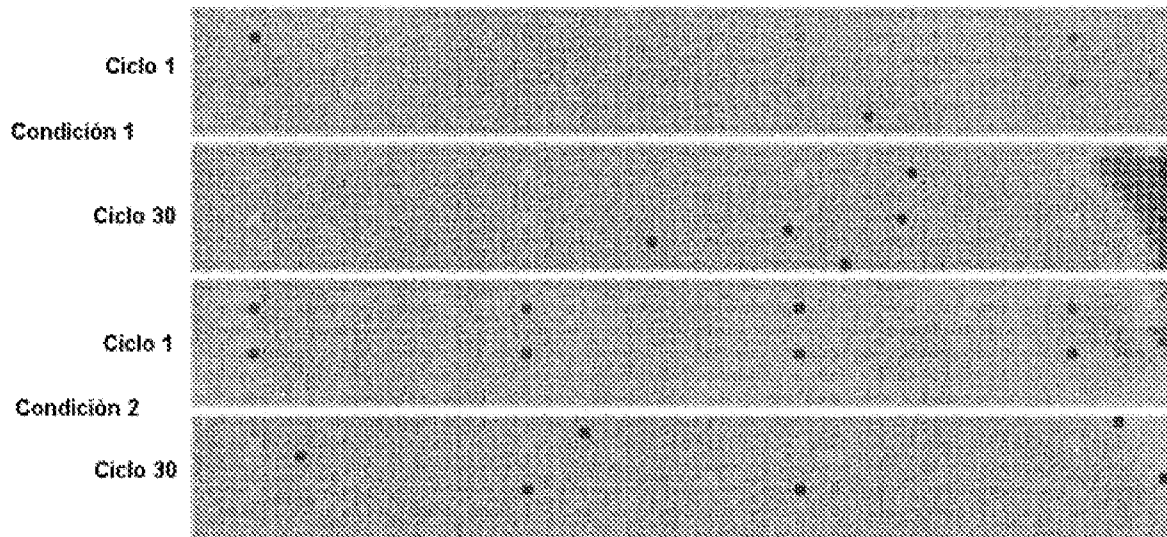


Figura 4