

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 077**

51 Int. Cl.:

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/77 (2006.01)

G02B 6/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06740860 .9**

96 Fecha de presentación: **07.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1875214**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Dispositivos en forma de matriz de micropocillos recubiertos con películas delgadas**

30 Prioridad:

07.04.2005 US 102075

30.08.2005 US 215458

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73 Titular/es:

**454 LIFE SCIENCES CORPORATION (100.0%)
20 COMMERCIAL STREET
BRANFORD CT 06405, US**

72 Inventor/es:

**KIM, JONG-BUM;
LEFKOWITZ, STEVEN MARTIN;
NOBILE, JOHN;
ROTH, GEORGE THOMAS y
YU, PENGQUANG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 077 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

Dispositivos en forma de matriz de micropocillos recubiertos con películas delgadas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un dispositivo en forma de matriz de microcubetas o micropocillos en el que las microcubetas están recubiertas con uno o más recubrimientos de película delgada.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad de realizar microanálisis paralelos sobre cantidades mínimas de muestra es importante para el avance de la química, de la biología, del descubrimiento de medicamentos y de la medicina. Hoy en día, la placa de microvaloración tradicional de 1536 pocillos ha sido superada por dispositivos en forma de matriz de microcubetas que tienen un número incluso mayor de cámaras de reacción y que usan cantidades de reactivos menores, debido a los esfuerzos enfocados en maximizar las eficiencias en coste y en tiempo. Aunque están disponibles varios tipos de matrices de microcubetas, muchos materiales de las microcubetas resultan ser incompatibles con los componentes de bioensayos y reacciones químicas, lo que da como resultado problemas como baja sensibilidad, alta señal de fondo y falta de reproducibilidad. En consecuencia, se sigue necesitando desarrollar matrices de microcubetas mejoradas.

15 Una solución al problema de los materiales incompatibles es aplicar un recubrimiento en forma de película delgada de un material compatible a la matriz de microcubetas para mejorar su función y sus propiedades superficiales. Patil *et al.*, en el documento de la patente de Estados Unidos número 6.395.483 han descrito un método para recubrir sustratos poliméricos con capas de máscaras que comprenden sustancias metálicas y óxidos metálicos para su uso en aplicaciones de matrices de alta densidad. Yon-Hin *et al.*, en el documento de la patente de Estados Unidos número 6.440.645, han descrito un proceso para usar una película delgada fotorepresentable sobre un sustrato polimérico para formar microcubetas o canales. Heller *et al* describen en el documento de la patente de Estados Unidos número 5.632.957 la deposición de recubrimientos de metal, aislante y de pasivación sobre sustratos, para formar matrices de microelectrodos y para formar microcubetas sobre los microelectrodos considerados individualmente. Walt *et al* han descrito, en el documento de la patente de Estados Unidos 6.377.721, el recubrimiento de las superficies interiores de las microcubetas sobre dispositivos en forma de matriz de fibra óptica con una película delgada o una capa de un material biológicamente compatible.

20 Para crear matrices se han usado ciertos haces o paquetes de fibra óptica. Se conocen en la técnica varios métodos para unir grupos funcionales (y para detectar los grupos funcionales ligados) a las cámaras de reacción grabadas en los extremos de los haces de fibra óptica. Véanse, por ejemplo, Michael *et al.*, *Anal. Chem.* 70: 1242-1248 (1998), Ferguson *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 1681-1684 (1996); Healey and Malt, *Anal. Chem.* 69: 2213-2216 (1997). En la cámara de reacción se puede crear también un patrón de grupos funcionales reactivos, utilizando técnicas fotolitográficas similares a las usadas en la generación de un patrón de tabletas reactivas sobre un soporte plano. Véase: Haley *et al.*, *Science* 269: 1078-1080 (1995); Munkholm and Walt, *Anal. Chem.* 58: 1427-1430 (1986) y Bronk *et al.*, *Anal. Chem.* 67: 2750-2757 (1995).

25 Se puede construir una matriz de grupos funcionales sobre un sustrato utilizando técnicas litográficas de uso común en la construcción de circuitos electrónicos integrados, como se describe, por ejemplo, en las técnicas de unión descritas en los documentos de las patentes de Estados Unidos números 5.143.854, 5.445.934, 5.744.305 y 5.800.992 o en los artículos: Chee *et al.*, *Science* 274: 610-614 (1996); Fodor *et al.*, *Nature* 364: 555-556 (1993); Fodor *et al.*, *Science* 251: 767-773 (1991); Gushin *et al.*, *Anal. Biochem.* 250: 203-211 (1997); Kinosita *et al.*, *Cell* 93: 1117-1124 (1998); Kato-Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 19375-19377 (1998) y Yasuda *et al.*, *Cell* 93: 1117-1124 (1998). La fotolitografía y la litografía de haces de electrones sensibilizan el sustrato con un grupo funcional que permite la unión de un reactivo (por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos). Véase, por ejemplo, Service, *Science* 283: 27-28 (1999); Rai-Choudhury, *Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication*, volume I: Microlithography, volume PM39, SPIE Press (1997). De manera alternativa, se puede generar una matriz o disposición de grupos funcionales utilizando tecnología de películas delgadas como se describe en Zasadzinski *et al.* *Science* 263: 1726-1733 (1994).

30 Una desventaja importante de este tipo de matriz de fibra óptica es la limitación de los materiales que incluye el haz de fibra óptica. Para que actúe como una guía de ondas eficaz, cada elemento de la fibra debería incluir un núcleo de alto índice de refracción rodeado de un revestimiento de índice de refracción bajo. Estos materiales de la fibra óptica son a menudo incompatibles con muchas condiciones de reacción, en particular con las de bioensayos que se llevan a cabo a menudo en disoluciones acuosas y contienen reactivos enzimáticos sensibles. Dos fuentes muy importantes de incompatibilidad son la disolución del sustrato de la fibra óptica en la solución contenida en la cámara de reacción y la reacción química real del sustrato de fibra óptica con componentes contenidos en la cámara. Por ejemplo, componentes del núcleo, como óxidos de bario y lantano, pueden formar hidróxidos que son solubles en agua, en particular a temperaturas elevadas. Los metales pesados multivalentes, como el bario y el lantano, pueden interaccionar de manera desfavorable con enzimas, en especial con aquellas enzimas con cofactores iones metálicos. Las superficies de óxidos de metales pesados tienden a estar cargadas positivamente en la interface de la

disolución y tienden a enlazarse de manera no específica a especies cargadas negativamente como los ácidos nucleicos. Todos estos efectos tienden a degradar el rendimiento de los ensayos y de las reacciones que se llevan a cabo en las cámaras de reacción de fibra óptica. Asimismo, la miniaturización creciente tiende a empeorar estos efectos desfavorables.

5 El hecho de que el sustrato de fibra óptica comprenda dos materiales (el núcleo y el revestimiento) puede limitar también la eficacia de cualquier modificación superficial de las cámaras de reacción con una monocapa (por ejemplo, grupos funcionales). Por ejemplo, una superficie cargada por separado se modifica enlazando a la superficie cargada polielectrolitos funcionalizados que contienen una carga opuesta. Los materiales del núcleo y del revestimiento del sustrato de fibra óptica tienen, cada uno de ellos, diferentes tipos de cargas. De este modo, cualquier modificación del sustrato de fibra óptica con un único polielectrolito es imposible ya que el sustrato no contiene una única carga uniforme.

15 También están limitadas las propiedades ópticas de un sustrato de fibra óptica. Durante una reacción fotoquímica llevada a cabo en la cámara de reacción de una placa de fibra óptica, se generan fotones que se mueven a través del núcleo de la fibra y que llegan, eventualmente, hasta el otro extremo de la fibra. Al mismo tiempo, los fotones pueden atravesar el material del recubrimiento y viajar hasta que son atrapados por otra fibra de una cámara de reacción contigua. Estos fotones que viajan a través del recubrimiento transparente se denominan con frecuencia dispersión óptica y dan como resultado problemas como el drenaje óptica o interferencias físicas (por ejemplo, informaciones cruzadas) entre cámaras de reacción vecinas.

20 Claramente se necesitan matrices de microcubetas que sean compatibles con cualquier bioensayo o condición de reacción y que tengan propiedades ópticas superiores.

El documento de la patente WO 02/077287 se refiere a matrices o disposiciones (por ejemplo a matrices de sustrato de fibra óptica) para su uso en la determinación de las secuencias de ácidos nucleicos.

El documento de la patente WO 01/18524 se refiere a métodos para mejorar la detección de la señal.

25 El documento de la patente de Estados Unidos US 2004/191924 se refiere a métodos para cargar numerosas muestras de líquidos en una matriz de agujeros pasantes.

El documento de la patente WO 2004/011912 se refiere a un recipiente bioquímico que es muy resistente a disolventes orgánicos, que puede ser producido fácilmente y que permite llevar a cabo determinaciones de espectrometría UV.

30 El documento de la patente de Estados Unidos US 2004/106130 se refiere a un equipo para reacciones en pastillas de biomatrices ("bioarray chip") y a su fabricación.

Compendio de la invención

Una manera de mitigar los problemas asociados con el uso de placas de fibra óptica para reacciones químicas o bioensayos es recubrir el sustrato de la matriz con uno o más recubrimientos de películas delgadas utilizando los métodos que se describen en este documento. En general, la discusión en este documento se centra en los sustratos de fibra óptica, aunque se pueden usar otros sustratos como se describe más adelante, en cualquier realización aquí descrita.

De acuerdo con la invención, se proporciona una matriz o disposición que comprende:

40 un sustrato de placa de fibra óptica que comprende una superficie superior plana que comprende una gran cantidad de cámaras de reacción grabadas y una superficie inferior opuesta plana ópticamente conductora pulida;

en el que cada cámara de reacción comprende una superficie de fondo interior y una superficie interior de las paredes laterales;

45 en el que al menos la superficie interior de las paredes laterales de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior están recubiertas con una capa de una película delgada transparente, que es ópticamente transparente, que tiene un espesor de 0,1 a 5 micrómetros y que es impermeable al agua,

caracterizada porque:

50 la superficie superior y la superficie interior de las caras laterales de sustancialmente todas las cámaras de reacción están recubiertas con una capa de película delgada no transparente y porque la superficie interior del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción no tiene un recubrimiento no transparente, en el que el recubrimiento no transparente es opaco y

en el que el recubrimiento no transparente se sitúa debajo del recubrimiento transparente.

En una realización, la capa transparente es dióxido de silicio. En una realización adicional, el espesor del recubrimiento transparente es no uniforme y es de aproximadamente 200-400 nm en la superficie superior de la matriz, 50-100 nm en las paredes laterales y, cuando existe, 100-300 nm sobre el fondo.

5 En una realización, el espesor de la capa no transparente, cuando existe, es de aproximadamente 200-300 nm sobre la superficie superior de la matriz, de 60-120 nm sobre las paredes laterales y no menos de 50 nm sobre el área de la esquina, entendiéndose por área de la esquina la comprendida en la unión formada entre el fondo y las paredes laterales de la cámara de reacción.

10 El recubrimiento no transparente se escoge entre un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y un óxido de un no metal. En una realización, el compuesto inorgánico es un metal. En otra realización, la capa no transparente es de un material que se escoge entre cromo, oro, plata, titanio, platino y aluminio. En una realización, la capa no transparente es conductora. En otra realización, la capa no transparente es dieléctrica.

En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con una capa transparente. En una realización, las paredes laterales y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz se recubren con la capa transparente.

15 En una realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre parcialmente con un recubrimiento no transparente, de tal forma que el recubrimiento no transparente se aplica al área de la esquina formada en la unión entre el fondo y las paredes laterales de la cámara de reacción y el recubrimiento está ausente en el centro del fondo de la cámara de reacción lo que forma un orificio cerca del centro del fondo. En una realización, el diámetro de la abertura es de aproximadamente 28 micrómetros. En otra realización, se forma un anillo de recubrimiento alrededor de la rendija en el fondo de la cámara de reacción cuando la capa se aplica al área de la esquina y el anillo de recubrimiento tiene una anchura de 8,5 micrómetros.

20 En otra realización, la superficie superior de la matriz y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con la capa transparente.

En otra realización, la capa transparente incluye al menos un primer recubrimiento transparente.

25 En otra realización, la capa no transparente comprende al menos una primera capa no transparente y una segunda capa no transparente.

En otra realización, la distancia entre la superficie superior que comprende las cámaras de reacción y la superficie del fondo pulida es no mayor de 5 mm.

Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 es una serie de imágenes de microscopía electrónica de barrido (imágenes SEM, por sus siglas en inglés), con 5000 y 10000 aumentos, de placas de fibra óptica grabadas recubiertas con SiO₂ utilizando los siguientes métodos de deposición en fase de vapor: pulverización catódica (figuras 1a y 1b), PECVD (deposición química en fase de vapor asistida por plasma, por sus siglas en inglés) (figuras 1c y 1d) y deposición asistida por iones (figuras 1e y 1f).

35 La figura 2 es una serie de imágenes SEM de secciones transversales de placas de fibra óptica que tienen cámaras de reacción que han sido recubiertas con SiO₂ que muestran el espesor y la calidad del revestimiento, para tres métodos de revestimiento por deposición en fase de vapor. La figura 2a es un esquema del área de deposición en la cámara de reacción. La figura 2b es una imagen de la capa aplicada por pulverización catódica. La figura 2c es una imagen de una capa aplicada mediante PECVD. La figura 2d es una imagen de una capa aplicada mediante deposición asistida por iones.

40 La figura 3 es un diagrama esquemático del proceso de deposición asistida por iones.

La figura 4 es un diagrama de barras que muestra el ruido de fondo en la secuenciación inducida por PCR de placas de fibra óptica recubiertas y no recubiertas con SiO₂ que comprenden cámaras de reacción.

45 La figura 5 es una serie de gráficos que muestran métricas de rendimiento de la secuenciación de placas de fibra óptica recubiertas y no recubiertas con SiO₂ que comprenden cámaras de reacción: precisión (figura 5a), fracción "normalizada" de pasos clave (figura 5b) y señal de pirofosfato (PPI) (figura 5c).

La figura 6 es una serie de imágenes de microscopía electrónica de barrido de una zona de la superficie de una placa de fibra óptica (sin recubrir) que comprende cámaras de reacción.

La figura 7a es un dibujo de una abrazadera de polietileno-eter-cetona (PEEK) (vista en planta).

50 La figura 7b es un dibujo de una abrazadera de PEEK (vista lateral).

La figura 7c es un dibujo de una abrazadera de PEEK (vista del extremo frontal).

- La figura 7d es un dibujo de una abrazadera de PEEK (vista del extremo posterior).
- La figura 8a es un dibujo de una placa de fibra óptica de 25 x 75 mm (vista en planta).
- La figura 8b es un dibujo de una placa de fibra óptica de 25 x 75 mm (vista desde el borde anterior).
- La figura 8c es un dibujo de una placa de fibra óptica de 25 x 75 mm (vista desde el borde posterior).
- 5 La figura 9 es un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento de limpieza RER.
- La figura 10 es un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento de grabado por un solo lado.
- La figura 11a es un dibujo de una junta de grabado (vista en planta).
- La figura 11b es un dibujo de una junta de grabado (vista desde el extremo posterior).
- La figura 11c es un dibujo de una junta de grabado (vista desde el extremo anterior).
- 10 La figura 11d es un dibujo de una junta de grabado (vista lateral primera).
- La figura 11e es un dibujo de una junta de grabado (vista lateral segunda).
- La figura 12 es un dibujo de un "sándwich fijado" de placas de fibra óptica donde las piezas se mantienen juntas con dos abrazaderas y que está lista para el proceso de grabado (vista en planta).
- La figura 13 es un dibujo del "sándwich" anterior con las piezas de la placa de fibra óptica separadas.
- 15 La figura 14 es una vista lateral de una placa de fibra óptica que contiene cámaras de reacción en la que las paredes de las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tienen una capa de una película delgada no transparente.
- La figura 15a ilustra el montaje utilizado para la deposición de metal a un cierto ángulo utilizando un útil inclinado. Se muestra una vista lateral de una placa de fibra óptica que contiene cámaras de reacción montada sobre el vehículo o portador de sustrato de un útil.
- 20 La figura 15b ilustra el montaje del útil inclinado y rotatorio.
- La figura 16a es una vista lateral de una placa de fibra óptica que contiene tres cámaras de reacción, en la que una cámara está vacía y las otras dos cámaras están cargadas con glóbulos o perlas del sustrato del reactivo (las más grandes) y glóbulos del reactivo (las más pequeñas). Las cámaras de reacción tienen un revestimiento sobre las paredes laterales de la cámara de reacción y sobre la superficie superior de la matriz y el fondo de la cámara de reacción está parcialmente cubierto. La capa de recubrimiento mostrada se aplica al área de la esquina de la cámara de reacción, de modo que el recubrimiento se aplica "a la zona de la esquina de las paredes laterales" y "a la zona de la esquina del fondo" donde el recubrimiento falta en el fondo de la cámara de reacción.
- 25 La figura 16b es una vista en planta de tres cámaras de reacción que tienen un recubrimiento aplicado sobre la zona de la esquina del fondo de la cámara de reacción, de tal modo que falta recubrimiento en el fondo de la cámara de reacción que forma una abertura u orificio cerca del centro del fondo. Se muestran el diámetro de la abertura circular y la anchura del anillo del área de la esquina.
- 30 La figura 17 es una vista (corte) lateral de una plaza de fibra óptica que contiene tres cámaras de reacción, cargadas con glóbulos del sustrato (los más grandes) y con perlas o glóbulos del reactivo (los más pequeños) y en el que la pared lateral de cada cámara se ha recubierto con una capa de recubrimiento. El recubrimiento se ha modificado para contener una enzima (por ejemplo apirasa) sobre su superficie.
- 35 La figura 18 ilustra los "efectos de ángulo o de inclinación" que pueden ocurrir cuando la fuente de iones es considerablemente más pequeña que el sustrato durante la deposición en fase de vapor de un recubrimiento. Los efectos de ángulo producen una matriz con cámaras de reacción que no están recubiertas de manera uniforme. Por ejemplo, A muestra el recubrimiento que se está depositando en el área de la esquina de tres cámaras de reacción situadas en un extremo del sustrato y B muestra el recubrimiento que se está depositando sobre el fondo de tres cámaras de reacción situadas sobre el otro extremo del sustrato.
- 40 La figura 19a ilustra el uso de una máscara de sombra durante el proceso de deposición para dirigir el recubrimiento a una zona seleccionada (por ejemplo a la "zona recubierta con metal") de la placa de fibra óptica y para eliminar efectos de ángulo.
- 45 La figura 19b ilustra el uso de un obturador durante el proceso de deposición para dirigir el recubrimiento a un área seleccionada (la "zona recubierta con metal") de la placa de fibra óptica y para eliminar el ángulo.
- La figura 20a muestra una placa de fibra óptica que tiene hilos de la fibra que están orientadas formando un ángulo

agudo menor de 90 grados con la superficie del fondo de la placa de fibra óptica (“ángulo agudo #1) (es decir, los hilos de la fibra no son perpendiculares).

5 La figura 20b muestra una cámara de reacción inclinada en la que se sitúa una perla o glóbulo en una esquina de la cámara de reacción que tiene una pared lateral que está inclinada un ángulo agudo (#2) respecto del fondo de la cámara de reacción. El glóbulo se puede fijar en esta posición de la esquina utilizando la fuerza centrífuga.

La figura 20c es un esbozo de un haz de fibras ópticas que está marcado con dos líneas que muestran un ejemplo de donde cortar el haz de fibras ópticas para hacer un corte no perpendicular.

10 La figura 21a es un esbozo de una matriz en la cual las cámaras de reacción de la misma están formadas, cada una de ellas por 4 postes frontera construidos sobre la parte superior del sustrato, de modo que tales postes frontera “atrapan” cada glóbulo o partícula en el espacio definido por el conjunto de los cuatro postes frontera. Se muestran el fondo y la pared lateral de la cámara de reacción que sujetan un glóbulo.

15 La figura 21b ilustra el proceso de deposición de metal para una matriz en la que las cámaras de reacción están formadas por una serie de postes límite o frontera sobre la superficie superior de un sustrato. La figura 21b muestra el solapamiento de las sombras durante deposiciones múltiples de recubrimientos de película delgada a ángulos diferentes. Las sombras creadas por los postes frontera producen patrones y formas únicas sobre las áreas de solapamiento.

La figura 22 muestra imágenes ópticas tomadas en dos áreas de una placa de fibra óptica que ha sido grabada y recubierta en una mitad. El área A está recubierta con una capa metálica (de plata) y el área B no está recubierta. La placa se aplicó a la matriz utilizando un proceso de evaporación térmica.

20 La figura 23 muestra dos fotografías microscópicas de la misma placa de fibra óptica grabada que ha sido revestida con una capa de plata, no transparente. El área de la superficie superior de la matriz, las paredes laterales y el área de la esquina de cada cámara de reacción se recubre con plata, de tal forma que el recubrimiento falta en el centro del fondo lo que crea una abertura cerca del centro del fondo (de cada cámara de reacción). La foto A está enfocada en el fondo de la cámara y la foto B está enfocada en el recubrimiento.

25 En la figura 24, A y B son gráficos que ilustran como puede disminuir un recubrimiento, no transparente, que se aplica a las paredes laterales de las cámaras de reacción de una matriz, el drenaje óptico entre dos cámaras adyacentes de la matriz. Los dos gráficos representan dos órdenes de flujo de nucleótidos diferentes.

30 La figura 25a muestra tres vistas del recubrimiento de plata sobre la esquina de una cámara de reacción de una placa de fibra óptica; la capa de plata cubre la esquina del fondo de la cámara. El espesor de la capa es tal que bloquea la luz y actúa como escudo para evitar las fugas de fotones a cámaras adyacentes. La vista 1 muestra la cámara de reacción completa. La vista 2 es un primer plano de la esquina de la cámara y la vista 3 es una vista ampliada de esta esquina.

35 La figura 25b muestra tres vistas de un recubrimiento de plata sobre la esquina superior de una cámara de reacción y sobre la superficie superior de una placa de fibra óptica, en la que el espesor de la capa de recubrimiento sobre las paredes laterales es diferente del espesor sobre la superficie superior del revestimiento. Esta diferencia de espesor se debe al giro del sustrato durante el proceso de deposición del metal. La vista 1 muestra la cámara de reacción completa. La vista 2 es un primer plano de la esquina superior y de la parte superior de la cámara de reacción y la vista 3 es una vista aumentada de la esquina superior.

40 La figura 26a muestra una matriz en la que las cámaras de reacción tienen paredes laterales que no son continuas, es decir, las paredes laterales están interrumpidas por una ranura en las mismas entre dos cámaras de reacción adyacentes.

45 La figura 26b ilustra el patrón formado sobre el fondo de una cámara de reacción (con una pared lateral no continua) cuando se deposita una capa a través de la abertura de la ranura en la pared lateral de una cámara de reacción. El recubrimiento se deposita en un gradiente de tal forma que la capa es más gruesa cerca de la línea central del fondo de la cámara de reacción y el recubrimiento es más delgado lejos de la línea central hacia el borde.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

50 A menos que se definan de otra forma, todos los términos científicos y técnicos que se usan en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente entendido por cualquier persona con un conocimiento normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

“Analito” significa una molécula, compuesto, composición o complejo, bien natural o bien sintetizado, que se va a detectar o medir en una muestra de interés o se va a separar de ella. Entre los analitos se incluyen, si bien las posibilidades no se limitan a ellos: proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, carbohidratos, hormonas, esteroides, compuestos, lípidos, vitaminas, bacterias, virus, productos farmacéuticos y metabolitos.

- 5 “Sandwich fijado” se refiere a una combinación de dos placas de fibra óptica con una junta situada entre las dos placas de fibra óptica, en la que la muesca de la esquina de cada placa de fibra óptica está alineada adecuadamente con la barrera de la esquina de la junta apropiada, de tal forma que la superficie pulida de cada placa de fibra óptica tenga su cara dirigida hacia la junta, de modo que se forma un cierre sellante, hermético, entre la superficie pulida de la placa de fibra óptica y la junta que es impermeable a los líquidos.
- “Material del núcleo” se refiere al componente interior de una fibra de fibra óptica. El material es transparente y tiene un índice de refracción alto.
- “Material de revestimiento” se refiere al componente exterior de una fibra de fibra óptica. El material es transparente y tiene un índice de refracción bajo.
- 10 “Área o zona de la esquina” se refiere a la superficie interior de la cámara de reacción en la que se forma una unión entre la pared lateral y el fondo de la cámara de reacción (véase la figura 16a).
- “Barrera de la esquina” se refiere a una forma o característica en una junta que incluye una banda o tira que se coloca en un ángulo en la esquina de la junta y proporciona una base física para orientar una placa de fibra óptica cuando la placa de fibra óptica se monta en la junta.
- 15 “Muesca de la esquina” se refiere a una esquina de una placa de fibra óptica que se corta en ángulo y se elimina para proporcionar una base física para orientar la placa de fibra óptica, por ejemplo, cuando se monta una placa de fibra óptica en un sistema para análisis o en una junta para el proceso de grabado; la muesca de la esquina de la placa de fibra óptica se hace casar con una forma complementaria situada en el sistema de análisis o en la junta.
- 20 “Proceso de grabado” se refiere a un proceso químico que emplea ácido para crear cámaras de reacción en el sustrato de una matriz.
- “Placa de fibra óptica” es un haz de cables de fibra óptica que se funden juntos para formar una estructura monolítica que luego se corta en “rodajas” para formar una oblea o pastilla del espesor que se requiere.
- “Grupos funcionales” son cualesquiera especies químicas o biológicas capaces de unir un reactivo, un sustrato de reacción o un analito a la superficie interior de la cámara de reacción.
- 25 “Junta” se refiere a un componente del equipo para el proceso de grabado. La junta se encuadra entre dos placas de fibra óptica y protege un lado de cada placa de fibra óptica (por ejemplo el lado pulido) de la exposición al ácido mediante la formación de un cierre o sellado hermético frente al fluido.
- 30 “Forma índice de junta” se refiere a una tira o banda colocada en una esquina de una junta que crea una muesca que es complementaria de la muesca de la esquina de una placa de fibra óptica y que proporciona una base física para orientar una placa de fibra óptica.
- “Forma índice” se refiere a una estructura que proporciona una base física para orientar una placa de fibra óptica.
- “Forma índice de placa de fibra óptica” se refiere a una muesca de esquina sobre la placa de fibra óptica que proporciona una base física para orientar de manera adecuada una placa de fibra óptica.
- 35 “Deposición asistida por iones” significa un método de deposición en fase de vapor utilizado para depositar una capa de película delgada sobre un sustrato de matriz en el que, en primer lugar, se usan átomos neutros y cargados eléctricamente para eliminar contaminantes del sustrato y, en segundo lugar, se evapora el material que formará la capa, de forma mejorada mediante la interacción con átomos o iones de gas reactivo o de gas inerte energético y se deposita sobre el sustrato.
- 40 “Impermeable al agua” se refiere a la capacidad de una capa de película delgada para proporcionar una barrera frente a una disolución acuosa contenida en la cámara de reacción y para evitar la lixiviación de la disolución de la cámara en los componentes de la pared lateral de la cámara de reacción.
- 45 “Capa o recubrimiento de película delgada no transparente” o “revestimiento o capa no transparente” se refieren a una capa de material que modula, esto es, que bloquea, bloquea sustancialmente o difunde el paso de la luz a su través. Por ejemplo, la capa de película delgada no transparente o no transparente es opaca, semiopaca, opaca brillante o traslúcida.
- “Opaco” significa que se bloquea el paso de la luz de tal forma que menos de 2 de cada 1000 fotones pasan a través de un material de película delgada.
- “Ópticamente transparente” se refiere a la capacidad de transmitir la luz a través de una capa de película delgada.
- 50 “Abrazadera de PEEK” se refiere a una abrazadera de poliéter-éter-cetona que se usa para sujetar firmemente juntas dos placas de fibra óptica y una junta durante el proceso de grabado.

“Recubrimiento parcial” significa que el recubrimiento se ha aplicado a una superficie inferior a la superficie completa, esto es, que se ha cubierto menos de la superficie total del fondo o de la superficie lateral de una cámara de reacción.

5 “Placa de pivaloración” o PTP por sus siglas en inglés, de PicoTiterPlate™, es un sustrato matriz que incluye una placa de fibra óptica grabada.

“Deposición química en fase de vapor asistida por plasma”, o “PECVD” por sus siglas en inglés, significa un método de deposición en fase de vapor utilizado para depositar una capa o recubrimiento de película delgada sobre un sustrato de matriz, en el que la capa de película delgada se produce por la reacción química de gases.

10 “Reactivo” significa cualquier molécula, compuesto, composición o complejo químico o biológico, natural o de síntesis, que es capaz de enlazarse con, formar un o reaccionar con un analito en una muestra de interés ya sea solo o junto con otro reactivo. Los reactivos descritos en este documento son útiles para reacciones químicas o mediciones, detecciones o separaciones biológicas. Entre los ejemplos de reactivos se incluyen, si bien las posibilidades no se limitan a estos productos: aminoácidos, ácidos nucleicos, incluyendo oligonucleótidos y ADNc, carbohidratos y proteínas como enzimas y anticuerpos.

15 “Cámara de reacción” quiere decir una cámara o cubeta localizada que comprende un fondo y una pared lateral (es decir, un espacio hueco, que tiene anchura y profundidad) que se encuentra sobre un sustrato.

“Limpiador RCA” es una disolución de hidróxido de amonio y de peróxido de hidrógeno.

“Proceso de limpieza RER” se refiere a un proceso para limpiar una placa de fibra óptica grabada utilizando el limpiador RCA, EDTA y de nuevo limpiador RCA.

20 “Sándwich” se refiere a una combinación de dos placas de fibra óptica con una junta colocada entre las dos placas de fibra óptica, en la que la muesca de la esquina de cada placa de fibra óptica está alineada adecuadamente con la forma índice de la junta, de tal forma que la superficie pulida de cada placa de fibra óptica tenga su cara dirigida hacia la junta y que la superficie sin pulir quede expuesta.

25 “Microscopía electrónica de barrido” o “SEM”, por sus siglas en inglés, se refiere a un método de obtención de imágenes de alta resolución.

“Semiopaco” quiere decir que casi bloquea el paso de la luz de tal forma que menos del 10 % de la luz pasa a través de la capa de película delgada.

30 “Opaco brillante” quiere decir que el paso de la luz está bloqueado de tal forma que menos de 2 fotones de cada 1000 pasan a través de la capa o recubrimiento de película delgada y que la luz se refleja en la superficie opaca brillante.

“Pulverización catódica” quiere decir un método de deposición en fase de vapor utilizado para depositar una capa de película delgada sobre el sustrato de una matriz.

“Sustrato” se refiere a un soporte sólido o a cualquier material que se puede modificar para que contenga cámaras de reacción individuales, discretas y que es susceptible de soportar al menos un método de detección.

35 “Película delgada” o “capa o recubrimiento de película delgada” se refiere a una capa de material depositada sobre la superficie del sustrato.

“Transparente” quiere decir que deja pasar la luz a través de una capa de película delgada sin dispersión apreciable, de tal modo que se pueden ver claramente los objetos (a su través).

40 “Capa o recubrimiento de película delgada transparente” o “capa o recubrimiento transparente” se refiere a una capa de material depositada sobre la superficie del sustrato, en la que el recubrimiento tiene un espesor de menos de 5,0 micrómetros, que es ópticamente transparente y que es impermeable al agua.

“Translúcido” significa que deja pasar la luz a través de una capa de película delgada, pero que la luz se difunde de tal forma que los objetos no se pueden ver claramente a su través.

45 “Deposición en fase de vapor” se refiere a un método para depositar una capa o recubrimiento en forma de película delgada sobre una matriz.

50 La presente invención proporciona composiciones de matriz que incluyen un sustrato que tiene cámaras de reacción individuales y que está recubierto con una o más capas de películas delgadas. La exposición incluye el proceso de fabricación y de uso de la matriz recubierta. Mediante el término “matriz” se entiende en este texto un conjunto de numerosas cámaras de reacción que son pocillos, cubetas o cámaras localizadas en forma matricial sobre la superficie de un sustrato. Cada cámara de reacción incluye un fondo y una pared lateral. El tamaño de la matriz y de sus cámaras de reacción dependerá de la composición y del uso final de la matriz. En una realización, la matriz,

incluyendo al menos a la pared lateral o el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz o la superficie superior de la matriz, se recubre con una o más capas de película delgada para mejorar las propiedades y las funciones de la matriz y de sus cámaras de reacción. La capa o capas de película delgada protegen el contenido de la disolución en la cámara de reacción de los efectos nocivos del sustrato de la matriz, sin comprometer la utilidad o la facilidad de fabricación de la matriz. Asimismo, las capas de película delgada proporcionan una composición de superficie uniforme que permite la modificación uniforme de la superficie de la cámara de reacción (por ejemplo con una monocapa). En una realización, la capa de película delgada produce un obstáculo óptico con el fin de eliminar la dispersión óptica de la luz a través de los materiales de revestimiento hacia cámaras de reacción adyacentes.

La matriz según la reivindicación 1 y aquéllas descritas en este documento pueden ser un componente de un sistema y métodos más amplios. Tales sistema y métodos se pueden usar para procesar ácidos nucleicos por múltiples vías. Por ejemplo, se desarrollan métodos para determinar la identidad de una secuencia de ácidos nucleicos o para la detección de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en fragmentos de ácidos nucleicos, para perfiles de expresión de ácidos nucleicos (comparando el perfil de expresión de un ácido nucleico entre dos o más estados, por ejemplo, comparando entre tejido normal y tejido enfermo o comparando entre tejido sin tratar y tejido tratado con tratamientos químicos, radiación, enzimas o medicamentos), para determinar haplotipos (comparar genes o variaciones en genes en cada uno de dos alelos presentes en un sujeto humano), para determinar cariotipos (comparar con objetivo de diagnóstico uno o más genes en un tejido de prueba, típicamente para un embrión o feto antes de la concepción para detectar defectos congénitos, con los mismos genes de sujetos "normales" cariotipados) y para determinar genotipos (comparar uno o más genes en un primer individuo de una especie con los mismos genes en otros individuos de la misma especie).

Un sistema analítico típico tiene un cierto número de componentes. Estos incluyen, por ejemplo: (1) una plantilla de ácido nucleico que se va a procesar; (2) una cámara de entrega, de modo que la cámara comprende una matriz recubierta como se describe en este documento, un equipo para contener la plantilla de ácido nucleico; (3) una cámara de flujo y medios para la entrega del reactivo que permitan el flujo de los reactivos de procesado del ácido nucleico sobre la plantilla de ácido nucleico, donde los reactivos de ensayo generan una señal detectable, por ejemplo, luz, cuando se procesa el ácido nucleico; (4) un sistema de obtención de imágenes en comunicación con la cámara de entrega de reactivos que detecta la señal emitida a medida que se procesa el ácido nucleico y que convierte la luz capturada en datos y (5) un sistema de recogida de datos en comunicación con la cámara de entrega de los reactivos que procesa los datos para proporcionar información significativa acerca del ácido nucleico que se ha procesado.

1. Matrices recubiertas con capas de películas delgadas

La presente descripción incluye composiciones de matrices que incluyen un sustrato con numerosas cámaras de reacción sobre su superficie superior. Cada una de las cámaras de reacción de la matriz está constituida por un fondo y por una pared lateral y, al menos una parte, es decir, el fondo, la pared lateral o la superficie superior de la matriz está recubierta con una o más capas de película delgada. En una realización, el sustrato de la matriz tiene un recubrimiento de película delgada no transparente sobre el fondo o la pared lateral (al menos uno de los dos) de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior y la capa no transparente es opaca, semiopaca, opaca brillante o traslúcida. En otra realización, el sustrato tiene un recubrimiento no transparente sobre el fondo o la pared lateral (al menos uno de ellos) de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz y el sustrato tiene un recubrimiento transparente sobre el fondo o la pared lateral (al menos uno de ellos) de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, siendo la capa transparente de un espesor de 0,1 a 5,0 micrómetros e impermeable al agua.

A continuación se describen realizaciones de esta invención:

A. El sustrato de la matriz

El sustrato de la matriz es un soporte sólido que se puede modificar para contener cámaras de reacción individuales. Se usa cualquier material como sustrato. Entre los materiales del sustrato se incluyen, si bien las posibilidades no se limitan a estos: plásticos y polímeros orgánicos, como polímeros vinílicos entre los que se incluyen poliestireno, polietileno, polipropileno, polibutileno, poli(cloruro de vinilo) y Teflon®, incluyendo copolímeros y mezclas, así como polímeros de condensación incluyendo poli(tereftalato de etileno), poliuretanos, policarbonatos, acrílicos, poliamidas, poliimidias, poliésteres y resinas epoxi y siliconas incluyendo copolímeros y mezclas. Los materiales de los sustratos pueden ser también materiales inorgánicos entre los que se incluyen cerámicas, vidrios, vidrios modificados o funcionalizados, sílice o materiales a base de sílice, silicio y silicio modificado. Los materiales del sustrato pueden incluir también haces de fibra óptica. En general, todos estos tipos de materiales se conforman fácilmente como matrices con cámaras de reacción. Sin embargo, las matrices fabricadas a partir de dichos materiales son a menudo incompatibles con muchos disolventes orgánicos y, en consecuencia, aplicar una capa de película delgada a tal sustrato de matriz mejora la compatibilidad de la matriz con los disolventes. También pueden tener problemas las matrices en lo que se refiere a interferencias físicas y "drenaje óptico" entre cámaras de reacción vecinas. Estos tipos de problemas se pueden resolver aplicando una o más capas de película delgada que sean opacas, semiopacas, opacas brillantes o traslúcidas para evitar que los fotones viajen a través del material de revestimiento transparente entre cámaras de reacción transparentes.

Generalmente, el sustrato es plano, aunque se usan otras configuraciones de sustrato; por ejemplo, hay sustratos cóncavos, convexos, tridimensionales, por ejemplo, esféricos, texturizados o en cavidades, por ejemplo en el extremo con cavidad de una placa de fibra óptica o en una microcubeta grabada, moldeada o micromecanizada de otra forma en la superficie plana, por ejemplo utilizando técnicas utilizadas comúnmente en la construcción de sistemas microelectromecánicos. Véase, por ejemplo, Rai-Choudhury, *Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication*, volume I: *Microlithography*, volumen PM39, SPIE Press (1997); Madou, CRC Press (1997), Aoki, *Biotech. Histochem.* 67: 98-9 (1992); Kane *et al.*, *Biomaterials* 20: 2363-76 (1999); Deng *et al.*, *Anal. Chem.* 72: 3176-80 (2000); Zhu *et al.*, *Nat. Genet.* 26: 283-9 (2000). En una realización, el sustrato es plano. Un sustrato puede contener también formas, por ejemplo, cavidades esféricas, pozos cilíndricos, columnas, postes y cilindros inclinados. Tales formas sobre la superficie del sustrato se conforman mediante grabado, deposición, impresión, estampado, moldeado, mecanizado, etc.

En general, el sustrato permite la detección óptica y no presente fluorescencia por sí mismo de manera apreciable. El sustrato se fabrica con un material que facilita la detección del evento de la reacción química o del resultado de la prueba. Por ejemplo, en una reacción típica de secuenciación de un ácido nucleico, el enlace de un desoxiribonucleótido trifosfato (dNTP) a una muestra de ácido nucleico que se está secuenciando se puede controlar mediante la detección de los fotones generados por acción de la enzima sobre el fosfato liberado en la reacción de secuenciación. De este modo, tener un sustrato fabricado con un material transparente o conductor de la luz facilita la detección de los fotones. En algunas realizaciones, el sustrato es ópticamente transparente. En otra realización, la superficie del sustrato emite impulsos ópticamente.

1. Placa de fibra óptica

En una realización, el sustrato de la matriz se elabora a partir de un haz de fibras ópticas “cortado en rodajas” también denominado placa de fibra óptica. Una placa de fibra óptica se fabrica fundiendo muchas fibras ópticas juntas para dar una estructura monolítica (es decir, un haz o manojo) que retiene las propiedades de transmisión de luz de las fibras individuales. Un haz de fibras “se corta en rodajas” para formar una “oblea” o placa de fibra óptica. La placa de fibra óptica resultante posee propiedades de manipulación similares a las de un vidrio plano o una placa de microscopio. Una placa de fibra óptica es un sustrato sobre el que se graban cámaras o pocillos para crear una matriz de cámaras de reacción.

Los hilos de fibra individuales de fibra óptica que hacen una placa de fibra óptica están compuestos por dos materiales, un material “del núcleo”, interior y una capa exterior o “material de revestimiento” (figura 2). El núcleo de la fibra óptica incluye un material que es transparente y que tiene un índice de refracción alto. Ejemplos de materiales del núcleo son óxidos de metales pesados como óxidos de plomo, bario, lantano y niobio. El revestimiento de la fibra óptica incluye un material que es transparente y que tiene un índice de refracción bajo. Un material de revestimiento típico es el dióxido de silicio dopado. Entre los agentes dopantes se incluyen óxidos metálicos, como los de boro y aluminio.

Cada hilo de fibra individualmente considerado de los que forman una placa de fibra de vidrio tiene un diámetro. Los hilos de fibra individuales pueden tener diámetros de cualquier tamaño (por ejemplo, entre 3 y 100 μm). En una realización, las fibras individuales tienen un diámetro de 6 a 12 μm . Una vez que el manojo de fibras ópticas se ha fundido para formar una estructura monolítica los hilos de fibra ya no se manejan de forma individual; esto es, un hilo de fibra ya no puede ser separado físicamente, en general, en ningún punto todo a lo largo del mismo de otro hilo de la fibra. Los haces de fibras ópticas fundidas y las placas se pueden obtener de manera comercial de diferentes fabricantes.

Un haz de fibra óptica se “corta en rodajas” para formar una “oblea”, una placa de fibra óptica. En una realización, el haz de fibra óptica se corta perpendicularmente a las fibras ópticas fundidas. En otra realización, el haz de fibra óptica se corta con un cierto ángulo respecto de las fibras ópticas fundidas, de forma no perpendicular (véanse, por ejemplo, las figuras 20a-c). Cuando el haz de fibra óptica se corta o rebana a un cierto ángulo (el “ángulo de rebano”) que no es de 90° respecto de las fibras ópticas fundidas, la placa de fibra óptica producida contiene hilos de fibra que no son perpendiculares al fondo de la placa de fibra óptica. Cuando se graba al ácido la placa de fibra óptica, las cámaras de reacción que se forman no están formando tampoco ángulos de 90° con respecto al fondo de la placa de fibra óptica. Las cámaras de reacción que se forman tienen una pared lateral que está inclinada (“cámaras de reacción inclinadas”).

Típicamente, una superficie de una placa de fibra óptica (es decir, el lado que no es el de la cámara de reacción) está muy pulido de tal forma que permita el acoplamiento óptico con un dispositivo de detección (figura 2) (por ejemplo, mediante inmersión óptica u otros fluidos de acoplamiento óptico). En una realización, el acoplamiento óptico se puede facilitar mediante un segundo haz de fibras fundidas. Típicamente, este segundo haz de fibras fundidas tiene un tamaño de fibras significativamente más pequeño que la primera placa de fibra óptica que contiene las cámaras de reacción y sirve para actuar como un conducto para la transmisión de la luz producida al dispositivo de detección adjunto, como un sistema de producción de imágenes CCD (dispositivo de carga acoplada) o una cámara.

En una realización, el sustrato de la matriz es una placa de fibra óptica. La forma de conjunto de una placa de fibra

5 óptica es rectangular, aunque las personas expertas en la técnica entenderán que una placa de fibra óptica no está limitada a una forma específica y entre las placas de fibra óptica adecuadas se incluye diferentes formas y dimensiones globales. Una placa de fibra óptica tiene al menos dos superficies, superior y de fondo o inferior, que son opuestas, existiendo una distancia entre la superficie superior (o cima) y la superficie inferior (o fondo). En una realización, los hilos de fibra dentro de la placa de fibra óptica están orientados de manera sustancialmente perpendicular a las superficies superior e inferior de la placa de fibra óptica. En otra realización, los hilos de fibra dentro de la placa de fibra óptica no están orientados perpendicularmente a las superficies superior e inferior de la placa de fibra óptica. En una realización, una placa de fibra óptica incluye además al menos una forma índice para proporcionar una base física con el fin de asegurar la orientación adecuada de una placa de fibra óptica tanto en equipos automáticos como en procesos manuales. Por ejemplo, se usa una forma índice para colocar adecuadamente una placa de fibra óptica en un instrumento para análisis.

15 Las figuras 8a-8c ilustran una placa de fibra óptica 1 para ser usada con la invención que aquí se describe. En una realización, una placa de fibra óptica 1 tiene una primera superficie plana 2 y una segunda superficie plana 3, opuestas entre sí. Una placa de fibra óptica 1 es ópticamente conductora de tal modo que las señales ópticas procedentes de las cámaras de reacción son detectadas por la primera superficie plana 3; hay una distancia D_1 entre la primera superficie y la segunda superficie. La distancia D_1 es cualquier distancia. En una realización, típicamente la distancia D_1 entre la primera superficie 2 y la segunda superficie 3 no es mayor de 10 cm. En otra realización, D_1 está entre 0,5 mm y 5 mm. En otra realización adicional, D_1 es 2 mm. La primera superficie 2 y la segunda superficie 3 de una placa de fibra óptica 1 están pulidas o, alternativamente, no pulidas. En una realización, una superficie está pulida y la superficie opuesta no está pulida. En un aspecto de esta invención, la primera superficie 2 está pulida y la segunda superficie 3 no está pulida. En una realización adicional, la primera superficie 2 está pulida y la segunda superficie 3 tiene cámaras de reacción. En otra realización, la primera superficie 2 tiene cámaras de reacción y la segunda superficie 3 está pulida.

25 Una placa de fibra óptica 1 tiene al menos un primer y un segundo lados y un primer y un segundo extremos. En una realización, la placa de fibra óptica 1 tiene un primer extremo 4 y un segundo extremo 5 separados por una distancia; un primer lado 6 y un segundo lado 7 separados por una distancia y un lado de la esquina 8 que se extiende entre un extremo y un lado. En una realización, mostrada en la figura 8a, el borde o bisel de una esquina 8 se extiende entre el segundo lado 7 y el segundo extremo 5. Los extremos y los lados están conectados para formar el perímetro exterior de una placa de fibra óptica 1. Por ejemplo, el primer lado 6 y el segundo lado 7 se extienden ambos perpendicularmente entre el primer y el segundo extremo 4 y 5.

35 Los lados y/o los extremos de una placa de fibra óptica se pueden achaflanar con un cierto ángulo con el fin de hacer posible que la placa de fibra óptica se monte en un instrumento. Se puede achaflanar o biselar cualquier combinación de lados y de extremos, o bien se pueden dejar todos sin biselar. En una realización, todos los lados y extremos se biselan con un cierto ángulo. Un borde biselado de un lado se bisela a un cierto ángulo para formar una parte inclinada y una parte plana o alternativamente, el lado biselado no tiene parte plana. En una realización, el primer lado 6 se bisela con un ángulo A_1 para formar un primer borde lateral oblicuo 17 (figura 8b). El primer borde lateral oblicuo 17 está formado por una parte inclinada 15 y por una parte plana 12. La parte plana 12 del borde lateral oblicuo 17 tiene una altura L_8 . De forma similar, el segundo lado 7 se bisela con un cierto ángulo para formar un segundo borde lateral oblicuo 16. El primer y el segundo bordes laterales se biselan con cualquier ángulo. En otra realización, los bordes laterales se biselan con un ángulo entre 10 y 80 grados. En otra realización el ángulo es sustancialmente de 45 grados, donde "sustancialmente" significa que el ángulo es un poco mayor o un poco menor de 45 grados: Los bordes laterales opuestos se pueden biselar para permitir que la placa de fibra óptica se deslice en una estructura retenedora adecuada (por ejemplo, un cartucho) situada dentro del instrumento analítico que capturará, situará adecuadamente y montará la placa de fibra óptica respecto de la cámara de reacción fluidica y de la cámara.

45 En una realización, cada uno de los lados primero y segundo 6 y 7 están biselados para formar ángulos de 45 grados y la longitud final L_8 de la parte plana resultante es 0,20 mm – 0,45 mm. Los lados biselados 6 y 7 se localizan a lo largo de la superficie plana resultante ópticamente conductora 2.

50 Las personas con un conocimiento y destreza normales en la técnica apreciarán que la primera superficie y la segunda superficie de una placa de fibra óptica tienen cualquier longitud y cualquier anchura. En una realización, la longitud y la anchura son iguales. En realizaciones en las que al menos alguno de los lados está biselado, la anchura de la primera superficie es ligeramente más pequeña que la anchura de la segunda superficie debido al borde con el lado en ángulo. Por ejemplo, en una realización, la anchura W_2 de la primera superficie 2 es aproximadamente 38 mm y la anchura W_3 de la segunda superficie 3 es aproximadamente 40 mm (figura 8b). En realizaciones similares en las que al menos uno de los extremos está biselado, la longitud de la primera superficie es ligeramente más pequeña que la longitud de la segunda superficie.

55 En una primera realización, la segunda superficie 3 tiene una longitud L_3 de aproximadamente 75 mm y la anchura W_3 de la segunda superficie 3 es aproximadamente 40 mm. La primera superficie 2 tiene la misma longitud L_3 que la segunda superficie 3 y la anchura W_2 de la primera superficie 2 es aproximadamente 38 mm.

60 En una segunda realización, la segunda superficie 3 tiene una longitud L_3 de aproximadamente 75 mm y la anchura

W_3 de la segunda superficie 3 es aproximadamente 25 mm. La primera superficie 2 tiene la misma longitud L_3 que la segunda superficie 3 y la anchura W_2 de la primera superficie 2 es aproximadamente 22 mm.

Las placas de fibra óptica adecuadas incluyen, por ejemplo, una o más formas índice. Una forma índice se localiza en cualquier lugar sobre una placa de fibra óptica y no está limitada a un tipo específico de forma o de tamaño. En una realización, una forma índice se localiza en el perímetro de la placa de fibra óptica. En otra realización, la forma índice se sitúa en una esquina. El propósito de una forma índice es proporcionar una base física para permitir el ajuste y colocación de una placa de fibra óptica y asegurar su adecuada orientación. Como se muestra en la figura 8a, una placa de fibra óptica adecuada 1 incluye una forma índice que es una muesca de esquina 13 formada eliminando una parte de la esquina de la placa de fibra óptica en la que el lado y el extremo de la placa de fibra óptica conectan de forma perpendicular. Una placa de fibra óptica 1 tiene una o más muescas o cortes de esquina. En una realización, una placa de fibra óptica 1 tiene una muesca de esquina 13. En otra realización, se forma una muesca de esquina 13 eliminando la esquina donde el segundo lado 7 se une al segundo extremo 5. La parte de la esquina se corta y elimina con un ángulo A_2 para crear una muesca de esquina 13. El ángulo A_2 no está limitado a un número determinado de grados e incluye otros ángulos y otras formas. En una realización, el ángulo A_2 se elimina de la parte de la esquina de una placa de fibra óptica 1 en la que el segundo lado 7 se une con el segundo extremo 5 y el ángulo A_2 es de aproximadamente 45 grados. El lado de la esquina resultante 8 tiene una longitud L_{11} que es de cualquier medida. En una realización, L_{11} es aproximadamente 6 mm. La muesca de la esquina 13 se ajusta a una forma o característica complementaria diseñada en el componente en el cual la placa de fibra óptica 1 ajusta, por ejemplo, una forma diseñada en el equipo (hardware) del sistema de análisis que monta la placa de fibra óptica o una forma diseñada en la junta de un equipo o aparato de grabado.

La placa de fibra óptica 1 se puede etiquetar con uno o más códigos de identificación. La placa de fibra óptica 1 se marca con un código identificativo con numerosos objetivos. Por ejemplo, un código de identificación permite el seguimiento y/o la autenticación de una placa de fibra óptica. Un código de identificación permite también la orientación visual de la placa de fibra óptica 1 cuando se monta en el sistema de análisis (por ejemplo el sistema no funciona a la hora de analizar una placa de fibra óptica a menos que pueda leer adecuadamente el código de identificación). El código identificativo puede ser cualquier tipo de código, por ejemplo, un código de barras, un código de barras bidimensional como un código Data Matrix, etc. . En una realización, una placa de fibra óptica 1 se codifica con un código de barras. En otra realización, una placa de fibra óptica 1 se codifica con un código Data Matrix. En una realización, una placa de fibra óptica 1 tiene tanto un código de barras como un código Data Matrix. También se puede incorporar un código alfanumérico que pueda ser leído por una persona. El código de identificación lo lee un instrumento, por ejemplo una cámara CCD o un lector de código de barras.

En una realización, se puede grabar un código de identificación directamente sobre la superficie de la placa de fibra óptica con un láser. En una realización alternativa, el código identificador se imprime sobre la superficie de la placa de fibra óptica.

B. La superficie de la matriz

Antes de recubrirla con una o más capas de película delgada, al menos una superficie del sustrato se modifica para contener una o más cámaras individuales de reacción, definidas de tal forma que cada mezcla de reacción o disolución de ensayo esté localizada de forma discreta, no continua, en un espacio definido, así como para la detección del resultado analítico. La superficie superior o la superficie del fondo, o ambas superficies, se pueden modificar para contener cámaras de reacción individuales. De este modo, tal y como se usa en este documento, el término "cámara de reacción" se refiere a una "cámara" o "cubeta" o "pocillo" sobre el sustrato, que facilita la interacción de los reactivos, por ejemplo en una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos. Típicamente, los reactivos se distribuyen en las cámaras de reacción de la matriz en un medio que facilita la reacción química o el bioensayo y que fluye a través de la cámara de reacción. Por ejemplo, para la secuenciación de ADN, se distribuye una plantilla de ácido nucleico en cada cámara de reacción sobre uno o más soportes sólidos, perlas o partículas en una disolución que fluye por la cámara de reacción.

Las cámaras de reacción se pueden formar bien sobre la superficie superior o bien sobre la superficie del fondo o bien sobre ambas superficies del sustrato de la matriz. Una cámara de reacción es un espacio hueco con una anchura, una profundidad y una abertura. La abertura de una cámara de reacción puede ser de cualquier forma, por ejemplo: sustancialmente redonda, cuadrada, oval, rectangular, hexagonal, en forma de media luna o de estrella. La cámara de reacción puede ser de cualquier forma, por ejemplo: sustancialmente redonda, cuadrada, oval, rectangular, hexagonal, en forma de media luna o de estrella. En una realización, la cámara de reacción es circular o cilíndrica. En otra realización, la cámara de reacción tiene varios lados, con una forma aproximada de caja cuadrada o rectangular. En referencia a la figura 6, la forma de la cámara de reacción en una realización es sustancialmente hexagonal. En una realización, las cámaras de reacción tienen forma uniforme.

Cada cámara de reacción de la matriz incluye un fondo y una pared lateral que definen las fronteras de la cámara de reacción. El fondo de la cámara de reacción puede tener cualquier forma: por ejemplo, sustancialmente redonda, cuadrada, oval, rectangular, hexagonal, en forma de media luna o de estrella. El fondo de la cámara de reacción puede ser plano, cóncavo o convexo. El fondo de la cámara de reacción es opuesto a la abertura de la cámara de reacción. La pared lateral de la cámara de reacción puede tener cualquier forma. Por ejemplo, la pared lateral puede

ser de forma cilíndrica y estar conectada a un fondo redondo. La pared lateral de la cámara de reacción puede tener también lados múltiples, por ejemplo, la pared lateral de una cámara de reacción con un fondo de forma hexagonal tiene seis lados que dan forma a la pared lateral de la cámara de reacción. Los lados de la cámara de reacción que constituyen la pared lateral pueden ser continuos o, de manera alternativa, pueden ser discontinuos. Por ejemplo, en una cámara de reacción de forma hexagonal, la cámara de reacción puede ser cerrada, de tal forma que los lados estén conectados entre sí o la cámara de reacción puede ser abierta, de tal forma que los lados no sean continuos y no estén conectados entre sí. La pared lateral puede tener una superficie suave o una superficie irregular.

El fondo y la pared lateral se conectan para constituir la esquina del fondo de la cámara de reacción en la unión en la que el fondo y la pared lateral se juntan. El ángulo con el cual se conectan la pared lateral y el fondo puede ser sustancialmente de 90 grados alrededor del perímetro del fondo o, de manera alternativa, el ángulo puede variar de menos de 90 grados a más de 90 grados alrededor del perímetro del fondo. La conexión entre el fondo y la pared lateral puede ser continua a lo largo del perímetro del fondo. De manera alternativa, en algunas realizaciones, la conexión entre el fondo y la pared lateral no es continua a lo largo del perímetro del fondo.

En una realización, la superficie interior de la cámara de reacción toma la forma de un pocillo o de una cámara en el sustrato, con una anchura y una profundidad, en la cual se depositan las mezclas de reacción o las disoluciones de ensayo (figura 2). En una realización, las cámaras de reacción son de tamaño suficiente para que se pueda: (i) introducir en las cámaras los reactivos necesarios; (ii) producir reacciones químicas o ensayos dentro de la cámara y (iii) inhibir la mezcla de reactivos y/o análisis dentro de las cámaras.

En otra realización, la pared lateral de la cámara de reacción no es continua, es decir, la pared lateral está interrumpida con una abertura entre cámaras de reacción adyacentes de tal forma que los reactivos pueden fluir de una cámara de reacción a otra.

La abertura u orificio entre las cámaras puede ser de cualquier forma y tamaño. Por ejemplo, la abertura puede estar formada por uno o más agujeros, canales, tubos o rendijas. Tal abertura en la pared lateral facilita el intercambio rápido de reactivos. Por ejemplo, reactivos inmovilizados sobre la superficie de perlas o gránulos ("perlas reactivas") que son suficientemente pequeños para pasar por la abertura en la pared lateral son libres de moverse entre cámaras de reacción adyacentes de la matriz, mientras que los sustratos de reacción inmovilizados en perlas o gránulos más grandes, que no pasan por la abertura de la pared lateral son retenidos dentro de las cámaras individuales de reacción, por ejemplo, sustratos de reacción enlazados a perlas o gránulos ("perlas de sustrato") o, de manera alternativa, las perlas de sustrato de reacción pueden estar enlazadas al fondo de la cámara de reacción. Generalmente, la eficiencia del intercambio de reactivos entre cámaras de reacción con una abertura en la pared lateral es mejor y se disminuye el tiempo para las reacciones químicas o los bioensayos. Además, la abertura en la pared lateral de la cámara de reacción permite la eliminación más rápida y más completa de los productos de reacción y de los subproductos de la cámara. En una realización, la abertura es una rendija en el material de revestimiento entre dos cámaras de reacción adyacentes sobre una placa de fibra óptica (figura 26a-b).

En otra realización, la pared lateral no es continua y contiene uno o más postes frontera que definen la geometría de la cámara de reacción. Los postes frontera tienen cualquier forma (por ejemplo, cilíndrica, semiesférica, en forma de media luna, etc). En una realización, las cámaras de reacción sobre la matriz se forman mediante una serie de postes frontera cilíndricos que salen hacia arriba desde el sustrato (por ejemplo, vidrio, placa que no es de fibra óptica, etc) para formar una "matriz de postes". En una realización, cada cámara queda definida por cuatro postes frontera y los postes forman una pared lateral no continua de cada cámara de reacción sobre una matriz de postes. En una realización, la matriz de postes se usa para "atrapar" una perla sustrato de reacción (figura 21a-b). El número y tamaño de los postes frontera, así como el patrón determinado por los postes frontera sobre el sustrato pueden variar. Este tipo de cámara de reacción "abierto" facilita un intercambio rápido entre reactivos que pueden fluir entre las cámaras de reacción de la matriz y los sustratos de reacción que son retenidos por las cámaras individuales de reacción, por ejemplo, sustratos de reacción unidos a perlas o partículas que están atrapados entre postes frontera. Para más ejemplos al respecto, véase, por ejemplo, el documento de la solicitud de patente de Estados Unidos 10/260.704, Pengguang Yu, Kevin Kornelsen, US patent application number 20030091475, 5 de mayo 2003.

En una realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tienen una pared lateral que está conectada perpendicularmente al fondo del sustrato y la abertura de la cámara de reacción y el fondo están opuestos de tal modo que los puntos centrales del fondo y de la abertura están alineados. De manera alternativa, en otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tienen una pared lateral que no está conectada perpendicularmente respecto del fondo del sustrato y la abertura de la cámara de reacción y el fondo están opuestos de tal forma que los puntos centrales están desplazados, esto es, no están alineados (véase por ejemplo, la figura 20b). La cámara de reacción que se forma cuando el ángulo no es perpendicular y los puntos centrales no están alineados se denomina "cámara de reacción inclinada". La pared lateral de una cámara de reacción inclinada está inclinada y el ángulo con el que se conectan el fondo y la pared lateral varía de menos de 90 grados a más de 90 grados alrededor del perímetro de la esquina del fondo de la cámara de reacción. En una realización, el ángulo formado en la zona de la esquina del fondo de la cámara de reacción varía aproximadamente entre 60 y 120 grados. En otra realización, el ángulo formado en la zona de la esquina del fondo de la cámara de reacción varía entre 80 y 100 grados. En otra realización, el ángulo formado en la zona de la esquina del fondo de la cámara de reacción varía entre 85 y 95 grados. En otra realización, el ángulo formado en la zona de la esquina del

fondo de la cámara de reacción varía entre 88 y 92 grados. En otra realización, el ángulo formado en la zona de la esquina del fondo de la cámara de reacción varía entre 89 y 91 grados.

En una realización, se forma una matriz con cámaras de reacción inclinadas cuando se corta en rodajas una placa de fibra óptica con un ángulo no perpendicular y la placa de fibra óptica resultante tiene hilos de fibra óptica que no son perpendiculares al fondo de la placa (figura 20a-b). Cuando esta placa de fibra óptica con fibras no perpendiculares se graba químicamente, las cámaras de reacción que se forman tienen, cada una de ellas, una pared lateral que está inclinada, es decir, una cámara de reacción inclinada. Las cámaras de reacción inclinadas se pueden usar para “fijar” o “mantener” una perla o gránulo en una posición específica dentro de una cámara de reacción inclinada (figura 20b). En una realización, se emplea la fuerza centrífuga para fijar la posición de una perla en una cámara de reacción inclinada. En otra realización, la perla se fija o se sujeta en una esquina de la cámara de reacción inclinada. En otra realización, se usa fuerza centrífuga para depositar un primer gránulo (por ejemplo, una perla de sustrato) dentro de cada cámara de reacción de la matriz. En otra realización, la fuerza centrífuga se usa para depositar una segunda perla, más pequeña que la primera (por ejemplo una perla de reactivo), dentro de cada cámara. En otra realización más, la fuerza centrífuga se usa para depositar más de una segunda perla o gránulo, que es más pequeña que la primera perla, dentro de cada cámara.

La “zona de la esquina” de una cámara de reacción es la superficie interior del fondo y de la pared lateral de la cámara de reacción, donde el fondo y la pared lateral de la cámara de reacción se conectan para formar una unión (“la unión”) en la esquina del fondo (figuras 16a-b). La zona de la esquina incluye tanto la “zona de la esquina del fondo” como la “zona de la esquina de la pared lateral”. La zona de la esquina se extiende desde la unión a lo largo de toda la longitud de la pared lateral hacia la superficie superior de la matriz y a lo largo de toda la longitud del fondo hacia el centro de la cámara de reacción. La zona de la esquina no se extiende a lo largo de toda la longitud de la pared lateral ni de toda la longitud del fondo. En una realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 90 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 60 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 40 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 20 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 10 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 5 % de la longitud total de la pared lateral. En otra realización, la zona de la esquina de la pared lateral se extiende menos del 5 % de la longitud total de la pared lateral (véanse por ejemplo, las figuras 16a y 16b).

En otra realización, la zona de la esquina del fondo se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 40 % de la longitud total del fondo. En otra realización, la zona de la esquina del fondo se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 20 % de la longitud total del fondo. En otra realización, la zona de la esquina del fondo se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 10 % de la longitud total del fondo. En otra realización, la zona de la esquina del fondo se extiende desde la unión hasta una longitud de al menos 5 % de la longitud total del fondo. En otra realización, la zona de la esquina del fondo se extiende desde la unión hasta una longitud de menos de 5 % de la longitud total del fondo. La zona de la esquina puede tener la forma de un anillo sobre el fondo de la cámara de reacción, donde la zona de la esquina no incluye el área cerca del centro del fondo de la cámara de reacción. En una realización adicional, se forma una abertura cerca del centro del fondo de la cámara de reacción mediante el recubrimiento que se aplica de manera parcial al fondo de la cámara de reacción. En una realización, las cámaras de reacción de la matriz están distribuidas siguiendo un patrón, es decir un diseño o configuración regular, o las cámaras están distribuidas al azar sobre la superficie de la matriz. En una realización, hay un patrón regular de cámaras de reacción sobre la matriz, de modo que las cámaras pueden ser direccionadas en un plano de coordenadas X-Y. “Patrón” en este sentido incluye una unidad que se repite. En otra realización, la matriz contiene una densidad alta de cámaras de reacción dispuestas siguiendo un patrón o modelo sobre el sustrato. En una realización, una matriz empaquetada hexagonal irregular de cámaras de reacción se dispone sobre la superficie del sustrato de la matriz como se ilustra en la figura 6.

Las cámaras de reacción pueden estar espaciadas entre sí con una distancia de separación adecuada cualquiera. El espaciado se determina midiendo la distancia entre los puntos centrales de dos cámaras de reacción adyacentes (figura 2). Generalmente, las cámaras de reacción están espaciadas entre 5 μm y 200 μm . En una realización, las cámaras de reacción están espaciadas entre 10 μm y 150 μm . En una realización, las cámaras de reacción están espaciadas entre 20 μm y 100 μm . En otra realización, las cámaras de reacción están espaciadas entre 40 μm y 60 μm . En otra realización, las cámaras de reacción tienen una distancia entre los puntos centrales de dos cámaras de reacción adyacentes de aproximadamente 43 μm a 50 μm . El tamaño de la cámara de reacción se hace para acomodar cualquier volumen. En una realización, el volumen de la cámara de reacción está entre 10 y 150 picolitros. En otra realización, el volumen de la cámara de reacción está comprendido entre 20 y 90 pl. En una realización adicional, el volumen de la cámara de reacción está entre 40 y 85 pl. En otra realización, el volumen de la cámara de reacción es aproximadamente de 75 pl.

Las cámaras de reacción pueden tener cualquier anchura adecuada. En una realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tienen un diámetro (anchura) en una dimensión comprendido entre 3 μm y 100 μm .

En otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción tienen un diámetro entre 20 μm y 70 μm . En otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tienen un diámetro entre aproximadamente 30 μm y 50 μm . En otra realización más, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tienen un diámetro entre aproximadamente 38 μm y 44 μm .

5 Las cámaras de reacción pueden tener cualquier profundidad adecuada. Generalmente, la profundidad de sustancialmente todas las cámaras de reacción está entre 10 μm y 100 μm . En una realización, la profundidad de sustancialmente todas las cámaras de reacción está entre 20 μm y 60 μm . En otra realización, la profundidad de sustancialmente todas las cámaras de reacción está entre 50 y 55 μm . De forma alternativa, sustancialmente todas las cámaras de reacción tienen una profundidad comprendida entre 0,25 y 5 veces la anchura en una dimensión de la cámara de reacción o, en otra realización, entre 0,3 y 1 veces la anchura en una dimensión de la cámara de reacción. Para los objetivos de esta descripción, "sustancialmente todas las cámaras de reacción" quiere decir al menos 90 % de las cámaras de reacción. En otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción quiere decir al menos 95 %. En otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción quiere decir al menos 97 %. En otra realización más, sustancialmente todas las cámaras de reacción quiere decir al menos 99 %. En otra realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción quiere decir 100 % de las cámaras de reacción. En una realización, la profundidad de las cámaras de reacción varía en una placa de fibra óptica desde aproximadamente la mitad del diámetro de una fibra óptica individual hasta dos a tres veces el diámetro de la fibra. La profundidad de una cámara de reacción se mide, por ejemplo, utilizando un perfilador de superficies interferométrico Micro-Xam 3D (ADE Phase shift, San José, California, Estados Unidos). Se realizan medidas ordinarias de la profundidad de las cámaras de reacción utilizando la característica del diagrama de diferencia de áreas del instrumento. El instrumento compara la profundidad de ocho cámaras respecto de un punto de referencia sobre el revestimiento de la placa de fibra óptica para proporcionar una profundidad de cámara de reacción promedio.

La matriz incluye un número suficiente de cámaras de reacción para llevar a cabo numerosos ensayos individuales. La matriz contiene cualquier número de cámaras de reacción. Dependiendo del uso final de la matriz, los sustratos se fabrican para tener una densidad muy alta de cámaras de reacción (por ejemplo más de 200.000), una densidad alta (por ejemplo, al menos 100.000), una densidad moderada (por ejemplo, al menos 50.000), una densidad baja (por ejemplo, al menos 10.000) y una densidad muy baja (por ejemplo, menos de 10.000). Las matrices de baja densidad tienen un pequeño número de cámaras de reacción. En una realización hay menos de 10.000 cámaras de reacción. Por ejemplo, la matriz contiene entre 1 y 96 cámaras de reacción. En una realización, la matriz contiene entre 96 y 384 cámaras de reacción. En otra realización, la matriz contiene entre 384 y 1536 cámaras de reacción. En otra realización más, la matriz contiene más de 1536 cámaras de reacción.

Se puede fabricar una placa de fibra óptica que contenga un número muy grande de cámaras de reacción. En una realización, hay al menos 10.000 cámaras de reacción. En otra realización, hay al menos 50.000 cámaras de reacción. En una realización adicional, hay más de 100.000 cámaras de reacción. En otra realización, hay más de 200.000 cámaras de reacción sobre la superficie del sustrato. Puesto que el número de medidas analíticas simultáneas está limitado por el número de cámaras de reacción, el rendimiento total de medida analítica realizado utilizando una matriz se puede aumentar fabricando sustratos que contienen densidades crecientes de cámaras de reacción. La tabla 1 muestra esta progresión para áreas activas de 14 x 43 mm y 30 x 60 mm, derivadas de placas de fibra óptica de 25 x 75 mm y 40 x 75 mm, respectivamente. Véase, por ejemplo, el documento de la solicitud de patente de Estados Unidos en tramitación número 10/767.779, que se incorpora como referencia a este documento. La separación indicada es la distancia entre fibras medida de "centro a centro" (tabla 1). La separación y el tamaño de fibra son, generalmente, equivalentes.

Tabla 1: desarrollo de matrices con un número más alto de cámaras de reacción.

Separación (μm)	Diámetro de la cámara de reacción (μm)	Número de cámaras de reacción (14 x 43 mm)	Número de cámaras de reacción reacción (30 x 60 mm)
50	44	275K	800K
43	38	375K	1,2M
35	31	575K	1,6M
25	22	1,1M	3,2M

45 Como se ilustra previamente, una ventaja particular de las matrices descritas en este documento es que se pueden producir matrices de muy alta densidad mejoradas, en particular mediante el uso de la tecnología de fibras ópticas. De este modo, por ejemplo, es posible tener tantas fibras y celdas como 50.000 diferentes en un haz de fibra óptica de 1 mm^2 , con densidades de más de 250.000 fibras individuales por cada 0,5 cm^2 obtenible.

Por ejemplo, una cámara de reacción de canal ancho puede tener unas dimensiones aproximadas de 14 mm x 43 mm. Así, con estas dimensiones aproximadas y una densidad aproximada de $4,82 \times 10^{-4}$ cámaras/ μm^2 , la matriz puede tener aproximadamente 290.000 cámaras de reacción.

Las cámaras de reacción se forman en la superficie del sustrato como se sabe generalmente en la técnica, utilizando diversas técnicas incluyendo las siguientes, si bien las posibilidades no se limitan a esas: grabado químico, fotolitografía, técnicas de estampado, por presión, por moldeo, micrograbado, deposición electrolítica, deposición en fase de vapor o química empleando máscaras o plantillas, mecanizado electroquímico, ablación o mecanizado con láser, ablación o mecanizado con haces de electrones y mecanizado convencional. La técnica dependerá de la composición y de la forma del sustrato. En una realización, las cámaras de reacción se forman utilizando grabado químico. Típicamente, las cámaras de reacción se forman en el sustrato antes de recubrir la matriz con cualquier recubrimiento de película delgada.

C. Los recubrimientos de película delgada

Se proporciona en este documento la aplicación de una o más capas de película delgada a la matriz del sustrato. Un recubrimiento de película delgada es un recubrimiento transparente o no transparente. Tales recubrimientos de película delgada transparentes y no transparentes se diseñan para mejorar las propiedades y las funciones de la matriz, incluyendo mejorar la compatibilidad de la mezcla de reacción o la disolución de ensayo con el sustrato de la matriz y para disminuir problemas tales como el drenaje óptico y la interferencia física entre cámaras de reacción adyacentes. El recubrimiento de película delgada transparente proporciona una barrera entre la disolución contenida en la cámara de reacción y el sustrato y evita tanto la lixiviación de material del sustrato a la disolución como el contacto entre el contenido de la cámara de reacción y el sustrato. El recubrimiento de película delgada no transparente proporciona una barrera a los fotones que evita la fuga de fotones de una cámara de reacción a otra cámara de reacción adyacente (es decir, la interferencia entre canales). El recubrimiento no transparente crea una barrera que no permite que pase la luz entre cámaras de reacción vecinas y, de este modo, restringe (la salida de) los fotones y mantiene la luz en la cámara de reacción para eliminar la dispersión óptica. Se puede usar un recubrimiento no transparente para mejorar la retención de las perlas o partículas en la cámara de reacción (por ejemplo, perlas de soporte sólido para llevar a cabo una reacción química).

Típicamente, los recubrimientos de película delgada de la presente descripción se aplican para recubrir el fondo o las pared lateral de las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz. Para los objetivos de esta descripción, cuando se recubre el fondo o la pared lateral de la cámara de reacción o de la superficie superior de la matriz con un recubrimiento de película delgada, el recubrimiento cubre parcialmente, sustancialmente o completamente la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior. En una realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están completamente cubiertos cuando la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta al 100 % con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están sustancialmente cubiertos cuando la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta de 97 a 100 % con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta menos del 97 % con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando al menos 80 % de la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando al menos 60 % de la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando al menos 40 % de la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando al menos 20 % de la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta con el recubrimiento de película delgada. En otra realización, el fondo, la pared lateral o la superficie superior están parcialmente cubiertos cuando al menos 10 % de la superficie del fondo, de la pared lateral o de la superficie superior está cubierta con el recubrimiento de película delgada.

En un aspecto de la descripción, el recubrimiento no transparente se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz. En otra realización, el recubrimiento no transparente se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz y el recubrimiento no transparente se deposita sobre la matriz antes de un recubrimiento transparente que se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz. En otra realización, se deposita un recubrimiento transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz y el recubrimiento transparente se deposita sobre la matriz antes de que se deposite un recubrimiento no transparente sobre al menos el fondo o sobre la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz.

El recubrimiento de película delgada transparente

En una realización, el sustrato de la matriz se recubre con una capa de película delgada no transparente en combinación con una capa de película delgada transparente, que está hecho de un material que típicamente se sabe que es compatible con los componentes que se encuentran en las disoluciones de los ensayos y en las mezclas de

las reacciones químicas. El recubrimiento transparente se puede depositar sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz antes de depositar el recubrimiento no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz. De manera alternativa, el recubrimiento transparente se puede aplicar después de que se haya depositado la capa de recubrimiento no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz.

En una realización, el recubrimiento transparente es impermeable al agua. En otra realización, el recubrimiento transparente proporciona una composición superficial uniforme. En una realización, el recubrimiento transparente es ópticamente transparente. Otras propiedades deseables del recubrimiento transparente son durabilidad, compatibilidad con los materiales del sustrato, parámetros de deposición bien comprendidos y resistencia a altas temperaturas. En una realización, el recubrimiento transparente se adhiere a los materiales vítreos. Típicamente, el recubrimiento transparente minimiza la absorción no específica de macromoléculas. El sustrato de la matriz se puede recubrir completamente con el recubrimiento de película delgada transparente. En una realización, todo el sustrato de la matriz, incluyendo cada fondo y pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tiene un recubrimiento transparente. De manera alternativa, el sustrato de la matriz puede no ser recubierto completamente con el recubrimiento transparente. Por ejemplo, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o de la superficie superior de la matriz están recubiertas con un recubrimiento transparente (figura 2). De forma alternativa, el recubrimiento transparente está ausente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tiene un recubrimiento transparente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tiene un recubrimiento transparente y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz no tienen un recubrimiento transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tiene un recubrimiento transparente y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz y la superficie superior de la matriz no tienen un recubrimiento transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz y la superficie superior de la matriz tienen un recubrimiento transparente. En una realización adicional, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tienen un recubrimiento transparente y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción no tiene un recubrimiento transparente.

En otra realización, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz está parcialmente recubierta. En una realización, el fondo y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz están parcialmente recubiertas con un recubrimiento transparente, de tal modo que el recubrimiento transparente se aplica al área de la esquina formada en la unión entre el fondo y la pared lateral y está ausente del centro del fondo, de modo que la falta de recubrimiento transparente ahí forma una abertura (esto es, un agujero) cerca del centro del fondo (por ejemplo, véanse figuras 16a y 16b). El tamaño de la abertura se puede ajustar durante el proceso de recubrimiento de tal modo que se pueda modular y concentrar la cantidad de luz que se deja pasar a través del fondo de la cámara de reacción.

En un aspecto de esta invención, el recubrimiento transparente se aplica a una forma o característica localizada sobre un sustrato. Ejemplos de tales formas que se pueden recubrir en un sustrato son: cavidades esféricas, pozos cilíndricos, columnas, postes, cilindros inclinados, etc. En otra realización, se recubre con un recubrimiento transparente una matriz hecha con un sustrato y postes frontera construidos sobre la parte superior del sustrato para formar cámaras de reacción, es decir, una "matriz de postes" (figuras 21a y 21b). El tamaño, el número y el patrón de los postes frontera sobre el sustrato puede variar. Los postes frontera pueden tener cualquier forma (por ejemplo, circular, rectangular, hexagonal, etc). En una realización, se aplica un primer recubrimiento transparente sobre la matriz de postes. En otra realización, se aplica un segundo recubrimiento transparente sobre la matriz de postes después de que se haya aplicado el primer recubrimiento transparente, de tal modo que el primer y el segundo recubrimientos transparentes son diferentes (véase por ejemplo la figura 21b). En otra realización, la deposición del primer y del segundo recubrimientos sobre la matriz de postes crea un "área de sombras" en la cual no se aplica recubrimiento, por ejemplo, véase la figura 21b.

En otro aspecto de la invención, el recubrimiento transparente se aplica a una matriz en la que sustancialmente todas las cámaras de reacción tienen una pared lateral que es no continua, es decir, la pared lateral está interrumpida por una abertura o agujero entre cámaras de reacción adyacentes. El agujero puede ser de cualquier forma y tamaño. En una realización, el agujero es una rendija, como se muestra en la figura 26a. El agujero o abertura de la pared lateral de la cámara de reacción proporciona un medio para depositar el recubrimiento con un patrón o modelo específico sobre el fondo de la cámara de reacción (véase, por ejemplo, la figura 26b). En una realización, el patrón sobre el fondo de la cámara de reacción tiene forma cónica. En otra realización, el recubrimiento transparente se deposita en un gradiente, de tal modo que el espesor del recubrimiento varía. En una realización, el recubrimiento transparente es más grueso cerca de la línea central del fondo de la cámara de reacción y el recubrimiento se hace más delgado a medida que se separa de la línea central, hacia el borde de la cámara.

En otro aspecto de la invención, el recubrimiento transparente se aplica a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz donde las cámaras de reacción tienen paredes laterales que no son perpendiculares al fondo del sustrato, es decir, son cámaras de reacción inclinadas. En una realización, el recubrimiento transparente se aplica a una placa de fibra óptica con hilos de fibra

óptica que no son perpendiculares al fondo de la placa, donde al menos el fondo o la pared lateral de las cámaras de reacción o la superficie superior de la placa de fibra óptica se recubren con el recubrimiento transparente.

El término "película delgada transparente" se refiere a un recubrimiento transparente con un espesor que es significativamente más pequeño que otras dimensiones características de la matriz. En una realización, el espesor del recubrimiento transparente está comprendido entre 0,1 y 5,0 micrómetros. El espesor del recubrimiento transparente puede ser no uniforme sobre la superficie de la matriz, incluyendo la superficie interior de la cámara de reacción. Por ejemplo, en una realización, cuando está presente, el espesor del recubrimiento transparente de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz es aproximadamente 200-400 nm sobre la superficie superior de la matriz. En otra realización, cuando está presente, el espesor del recubrimiento transparente de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz es aproximadamente 50-100 nm sobre las paredes laterales de la cámara de reacción. En otra realización, cuando está presente, el espesor del recubrimiento transparente de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz es aproximadamente 100-300 nm sobre el fondo de la cámara de reacción.

Como material de recubrimiento transparente se pueden usar muchos tipos distintos de materiales. La composición de un recubrimiento de película delgada transparente dependerá del sustrato de la matriz, de la aplicación y del método de deposición de la película delgada. En una realización, el recubrimiento transparente es un polímero. En una realización, el polímero es un polímero inorgánico. En otra realización, el recubrimiento transparente es un óxido no metálico (por ejemplo, dióxido de silicio (SiO_2)). Otros recubrimientos transparentes son, por ejemplo, una aleación metálica, un óxido, un nitruro, un carburo o un boruro de un metal o de un semiconductor. Muchos recubrimientos transparentes están disponibles comercialmente.

Entre los materiales de recubrimiento transparente también se incluyen aquellos materiales utilizados para unir un cebo de anclaje a un sustrato. También se pueden usar como recubrimientos transparentes para revestir el sustrato de la matriz reactivos organosilánicos que permiten el acoplamiento covalente directo de las proteínas a través de grupos amino, sulfhidrido (tiol) o carboxilo. Otros recubrimientos transparentes son los enlazantes fotorreactivos, por ejemplo, la fotobiotina (Amos et al., "Biomaterial Surface Modification Using Photochemical Coupling Technology", en *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A: Materials*, Wise et al. editores, New York, Marcel Dekker, pp. 895926, 1995).

Otros materiales de recubrimiento transparentes son materiales poliméricos tales como geles poliméricos hidrofílicos como poliacrilamida o polisacáridos, que se polimerizan directamente sobre la superficie del sustrato o cadenas poliméricas que se unen de manera covalente al sustrato, directamente (Hjerten, *J. Chromatogr.* 347, 191 (1985); Novotny, *Anal. Chem* 62, 2478 (1990)), así como polímeros plurónicos (copolímeros tribloque, por ejemplo, PPO-PEO-PPO, también conocido como F-108), adsorbidos específicamente a poliestireno o a superficies de vidrio silanizado (Ho et al., *Langmuir* 14: 3889-94, 1998), así como capas adsorbidas pasivamente de proteínas enlazadas a biotina. La superficie se puede recubrir también con un recubrimiento transparente que incluye un epóxido que permite el acoplamiento de reactivos a través de un enlace amino. En una realización, el recubrimiento de película delgada transparente es de SiO_2 .

Antes de aplicar cualquier revestimiento de película delgada, la placa de fibra óptica se limpia mediante tratamiento con ultrasonidos en una disolución acuosa, básica, por ejemplo, en una disolución al 5 % de Contrad ®. La disolución de Contrad ® es una disolución limpiadora preparada con tensioactivos en una disolución acuosa alcalina. La disolución de Contrad ® al 5 % contiene sustancialmente 5 por ciento de Contrad ®. Sustancialmente 5 % quiere decir que la disolución puede contener un poco más o un poco menos del 5 % de Contrad ®.

En una realización, después de la limpieza, típicamente se usa un proceso de deposición asistida por iones para recubrir las placas de fibra óptica grabadas con un recubrimiento transparente de SiO_2 , en el que el espesor del recubrimiento transparente es de 0,1 a 5,0 micrómetros. En una realización, cuando está presente, el espesor del recubrimiento transparente es de 200-400 nm sobre la superficie superior de la matriz. En otra realización, cuando está presente, el espesor del recubrimiento transparente es de 50-100 nm sobre la pared lateral y, cuando está presente, es de 100-300 nm sobre el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz. El SiO_2 es transparente, tiene espesores de barrera frente al agua muy eficientes hasta un mínimo de 10 nm, se adhiere a los materiales vítreos y resiste procedimientos de limpieza duros y altas temperaturas. Además, las propiedades de las superficies de SiO_2 son bien conocidas, así como los métodos para modificar estas propiedades. Además, se ha probado que el SiO_2 es compatible con las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (reacción PCR) a microescala.

El recubrimiento de película delgada no transparente

En otra realización, el sustrato de la matriz se recubre con un recubrimiento de película delgada no transparente realizado con un material que modula el paso de la luz a su través, por ejemplo que bloquea, bloquea sustancialmente o difunde la luz para evitar, inhibir o reducir el drenaje óptico de fotones hacia cámaras de reacción adyacentes y la interferencia física entre cámaras de reacción vecinas.

El espesor del recubrimiento no transparente se puede variar y controlar de tal modo que se obtenga un

recubrimiento opaco, semi-opaco, opaco brillante o traslúcido. En una realización, el recubrimiento no transparente es opaco. En otra realización, el recubrimiento no transparente es semi-opaco. En otra realización, el recubrimiento no transparente es opaco brillante. En otra realización, el recubrimiento no transparente es traslúcido. Otras propiedades deseables del recubrimiento no transparente son durabilidad, compatibilidad con los materiales del sustrato, parámetros de deposición bien comprendidos y resistencia a altas temperaturas. En una realización, el recubrimiento no transparente se adhiere a los materiales vítreos. El recubrimiento no transparente minimiza la absorción no específica de macromoléculas. El sustrato de la matriz se puede cubrir totalmente con el recubrimiento de película delgada no transparente. De manera alternativa, el sustrato de la matriz puede no cubrirse completamente con el revestimiento de película delgada no transparente. En una realización, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz tiene un recubrimiento no transparente (figura 2). En una realización, todo el sustrato de la matriz, incluyendo cada fondo y cada pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tiene un recubrimiento no transparente. En otra realización, la superficie superior de la matriz y la pared lateral y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con un recubrimiento no transparente.

En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tiene un recubrimiento no transparente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz tiene un recubrimiento no transparente y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz no tienen un recubrimiento no transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción tiene un recubrimiento no transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción tiene un recubrimiento no transparente y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior no tienen un recubrimiento no transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tienen un recubrimiento no transparente. En una realización adicional, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz tienen un recubrimiento no transparente y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción no tiene un recubrimiento no transparente.

En otra realización, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz está parcialmente recubierto con un recubrimiento no transparente. En una realización, el fondo y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz está parcialmente recubierto con un recubrimiento no transparente, de tal modo que el recubrimiento no transparente se aplica al área de la esquina formada en la unión entre el fondo y la pared lateral y el recubrimiento no transparente está ausente del centro del fondo, de tal modo que la ausencia del recubrimiento no transparente forma una abertura (es decir, un agujero) cerca del centro del fondo (por ejemplo, véanse las figuras 16a y 16b). El tamaño de la abertura o agujero se puede ajustar de tal modo que la cantidad de luz que se deja pasar a través del fondo de la cámara de reacción se pueda modular y concentrar.

El recubrimiento no transparente se puede usar para recubrir, es decir, cubrir, una forma o característica localizada sobre un sustrato. Ejemplos de tales formas que se pueden recubrir en un sustrato son: cavidades esféricas, pozos cilíndricos, columnas, postes, cilindros inclinados, etc. En otra realización, se recubre con un recubrimiento no transparente una matriz hecha con un sustrato y postes frontera construidos sobre la parte superior del sustrato para formar cámaras de reacción (una "matriz de postes"). El tamaño, el número y el patrón de los postes frontera sobre el sustrato pueden variar. En una realización, se aplica un primer recubrimiento no transparente sobre la matriz de postes. En otra realización, se aplica un segundo recubrimiento no transparente sobre la matriz de postes después de que se haya aplicado el primer recubrimiento no transparente, de tal modo que el primer y el segundo recubrimiento no transparentes son diferentes (véase por ejemplo la figura 21b). En otra realización, la deposición del primer y del segundo recubrimientos no transparentes sobre la matriz de postes crea un "área de sombras" en la cual no se aplica recubrimiento, por ejemplo, véase la figura 21b.

En otro aspecto de la invención, el recubrimiento no transparente se aplica a una matriz en la que sustancialmente todas las cámaras de reacción tienen una pared lateral que es no continua, esto es, la pared lateral está interrumpida por un agujero entre cámaras de reacción adyacentes. La abertura o agujero puede tener cualquier tamaño y cualquier forma. En una realización, el agujero es una rendija, como se muestra en la figura 26a. El agujero o abertura de la pared lateral de la cámara de reacción proporciona un medio para depositar el recubrimiento no transparente con un patrón o modelo específico sobre el fondo de la cámara de reacción (véase, por ejemplo, la figura 26b). En una realización, el patrón tiene forma cónica. En otra realización, el recubrimiento no transparente se deposita en un gradiente, de tal modo que el espesor del recubrimiento varía, de modo que el recubrimiento no transparente es más grueso cerca de la línea central del fondo de la cámara de reacción y el recubrimiento no transparente se hace más delgado a medida que se separa de la línea central, hacia el borde de la cámara.

En otro aspecto de la invención, el recubrimiento no transparente se aplica a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz que tiene cámaras de reacción con paredes laterales que no son perpendiculares al fondo del sustrato, es decir, son cámaras de reacción inclinadas. En una realización, el recubrimiento no transparente se aplica a una placa de fibra óptica con hilos de fibra óptica que no son perpendiculares al fondo de la placa, donde al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la placa de fibra óptica se recubren con el recubrimiento no transparente.

El término “película delgada no transparente” se refiere a un recubrimiento no transparente con un espesor que es significativamente más pequeño que otras dimensiones características de la matriz (figura 14). En una realización, el espesor del recubrimiento no transparente determina si el recubrimiento es opaco, semi-opaco, traslúcido u opaco brillante.

5 Como recubrimiento de película delgada no transparente, se pueden usar muchos tipos diferentes de materiales. La composición del recubrimiento de película delgada no transparente dependerá del sustrato de la matriz, de la aplicación y del método de deposición de la película delgada. Se puede escoger un recubrimiento de película delgada no transparente entre un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y un óxido de un no metal. En una realización, el recubrimiento no transparente es un polímero. En otra realización, el recubrimiento no transparente es un compuesto orgánico o inorgánico. En una realización, el compuesto inorgánico es un metal. Los metales que se usan como recubrimientos de película delgada no transparentes se escogen entre: cromo, oro, plata, aluminio, titanio, cobre, hierro, níquel, zinc, cadmio, estaño, plomo, antimonio, cobalto, platino y cualquier aleación de ellos, por ejemplo, aleación de titanio y plomo. En una realización, el recubrimiento no transparente se escoge entre cromo, oro, plata, aluminio, titanio y platino. En una realización, el recubrimiento no transparente es cromo. En otra realización, el recubrimiento no transparente es plata.

En una realización, se aplica a la matriz un primer recubrimiento no transparente y se aplica a la matriz un segundo recubrimiento no transparente después de aplicar el primer recubrimiento no transparente. En una realización, el primer y el segundo recubrimientos no transparentes son el mismo. De forma alternativa, el primer y el segundo recubrimiento no transparentes son distintos. En una realización, el primer recubrimiento no transparente es cromo y el segundo recubrimiento no transparente es oro. En otra realización, el primer recubrimiento no transparente es oro y el segundo recubrimiento no transparente es cromo. En otra realización, el primer recubrimiento no transparente es titanio y el segundo recubrimiento no transparente es platino. En otra realización, el primer recubrimiento no transparente es platino y el segundo recubrimiento no transparente es titanio. El primer y el segundo recubrimiento no transparentes se pueden aplicar en procesos separados. De forma alternativa, el primer y el segundo recubrimientos se pueden aplicar en el mismo proceso, cambiando a diferentes blancos metálicos.

En otra realización, el recubrimiento es dieléctrico. El recubrimiento dieléctrico puede ser transparente o no transparente. En una realización, el recubrimiento dieléctrico es no transparente. En otra realización, el recubrimiento dieléctrico es transparente. Un recubrimiento que es dieléctrico tiene una resistencia eléctrica alta, por ejemplo el SiO₂. En una realización, se aplica un recubrimiento transparente, dieléctrico, encima de un recubrimiento no transparente y se usa para proteger el recubrimiento no transparente de la erosión. Por ejemplo, se aplica un recubrimiento de SiO₂ después de que se haya aplicado un recubrimiento de metal a una matriz, con el fin de proteger el recubrimiento de metal de la erosión mientras que el recubrimiento de SiO₂ permanece transparente.

En otra realización, el recubrimiento es conductor. Un recubrimiento que es conductor es eléctricamente conductor, por ejemplo una película delgada de oro. Se puede usar un recubrimiento conductor como un primer recubrimiento para galvanización electrolítica o electrodeposición o para ser usado como una superficie de electrodo en una disolución. En una realización, se aplica un recubrimiento no transparente que es conductor a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o a la superficie superior de la matriz. En otra realización, se aplica un recubrimiento no transparente, que es conductor, a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o a la superficie superior de la matriz y se aplica un recubrimiento transparente a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o a la superficie superior de la matriz después de haber aplicado el recubrimiento no transparente. En una realización, la matriz se recubre con un recubrimiento conductor que permite intensificar de forma electroquímica las reacciones químicas o los bioensayos que se llevan a cabo en las cámaras de reacción. Por ejemplo, se puede usar una placa de fibra óptica grabada químicamente, recubierta con metal, como ánodo o como cátodo para análisis utilizando métodos electroquímicos junto con iluminación química. En otra realización, se aplica un recubrimiento de SiO₂ encima de un recubrimiento metálico conductor y el recubrimiento de SiO₂ de la matriz se polariza, lo cual aumenta el movimiento de iones cerca de la superficie en la disolución. Hay muchos materiales para recubrimientos no transparentes que están disponibles comercialmente.

En otro aspecto de la invención, el sustrato de la matriz se recubre con ambos recubrimientos, transparente y no transparente. En una realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz se recubren con el recubrimiento transparente y el fondo se recubre con el recubrimiento no transparente. En otra realización, la pared lateral y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con el recubrimiento transparente y la superficie superior de la matriz se recubre con un recubrimiento no transparente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz se recubren con el recubrimiento transparente y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con el recubrimiento no transparente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con el recubrimiento transparente y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz se recubren con el recubrimiento transparente y la pared lateral y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con el recubrimiento no transparente. En otra realización, la superficie superior de la matriz se recubre con el recubrimiento transparente y la pared lateral y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con el recubrimiento no transparente. En otra realización, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con

5 el recubrimiento transparente y el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior de la matriz se recubren con el recubrimiento no transparente. En otra realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con el recubrimiento transparente, la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con el recubrimiento no transparente y la superficie superior de la matriz no se recubre.

10 Se pueden depositar múltiples capas de recubrimientos transparentes y no transparentes sobre el sustrato de la matriz. En una realización, el recubrimiento transparente incluye al menos un primer recubrimiento transparente. En otra realización, el recubrimiento no transparente incluye al menos un primer recubrimiento no transparente. Se pueden depositar dos o más recubrimientos de material transparente o no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz. En una realización, el primer recubrimiento no transparente, por ejemplo, cromo, se deposita sobre un lado de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz y el segundo recubrimiento no transparente, por ejemplo, oro, se deposita en el lado opuesto de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz. En otra realización, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz se recubren con el primer y el segundo recubrimiento no transparentes. En una realización, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con un primer recubrimiento transparente y el fondo y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubren con un segundo recubrimiento parcialmente transparente, donde además el segundo recubrimiento transparente se aplica al área de la esquina formada en la unión entre el fondo y la pared lateral de la cámara de reacción y el segundo recubrimiento transparente está ausente del centro del fondo de tal modo que la falta del segundo recubrimiento transparente sobre el fondo de la cámara de reacción forma un agujero cerca del centro de fondo. En una realización, el fondo y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubren con un recubrimiento parcial no transparente, donde además el recubrimiento transparente se aplica en el área de la esquina formada en la unión entre el fondo y la pared lateral de la cámara de reacción y el recubrimiento no transparente está ausente del centro del fondo de tal modo que la falta del recubrimiento no transparente en el fondo de la cámara de reacción forma una abertura o agujero cerca del centro del fondo.

Funcionalización de los recubrimientos transparente y no transparente de película delgada

30 Tanto los recubrimientos de película delgada transparentes como no transparentes permiten que se unan fácilmente reactivos (por ejemplo, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos) y no afectan de manera negativa a la actividad de los reactivos inmovilizados. En algunos casos, el recubrimiento de película delgada puede aumentar la estabilidad de los reactivos.

35 Los recubrimientos transparentes y no transparentes permiten mejorar la superficie, lo cual puede proporcionar funciones adicionales para mejorar las reacciones químicas o para eliminar efectos indeseados tales como el intercambio de informaciones entre cámaras de reacción adyacentes.

40 Generalmente, los reactivos y los analitos están asociados de forma no covalente en las cámaras de reacción. Sin embargo, las cámaras recubiertas con películas delgadas se pueden funcionalizar biológica o químicamente. Por ejemplo, cualquiera de los recubrimientos transparentes o no transparentes descritos se puede derivatizar con uno o más grupos funcionales que se conocen normalmente en la técnica para la inmovilización de enzimas y nucleótidos, por ejemplo, grupos quelantes de metales (por ejemplo, nitrilo, ácido triacético, ácido iminodiacético, quelante pentadentado, etc.). En una realización, sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz recubierta con película delgada, recubierta bien con un recubrimiento transparente o bien con un recubrimiento no transparente, se modifican para tener grupos funcionales que se usan para enlazar o capturar, tanto covalentemente como de forma no covalente, reactivos o analitos a la pared lateral o al fondo. En este contexto, el término “cámaras de reacción modificadas químicamente” incluye la adición de grupos funcionales como grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol, que están unidos a la superficie recubierta con película delgada de la cámara de reacción y que se usan para enlazar o capturar reactivos o analitos sobre la misma superficie, aunque no se limita solo a esto. De manera alternativa, “cámaras de reacción modificadas biológicamente” quiere decir la unión de ligandos enlazantes o de pares de compuestos enlazantes, incluyendo (aunque no solamente), pares antígeno / anticuerpo, enzima / sustrato o pares inhibidores, pares receptor / ligando, carbohidratos y sus parejas enlazantes (lectinas, etc).

55 En una realización, el recubrimiento transparente genera una superficie para la modificación química o biológica. En otra realización, el recubrimiento no transparente genera una superficie para la modificación química o biológica. En una realización adicional, el recubrimiento transparente proporciona una superficie para la inmovilización de enzimas. En una realización, la enzima para inmovilización se escoge entre sulfurilasa, luciferasa, polimerasa, hipoxantina, fosforiboxiltransferasa, xantinaoxidasa, uricasa, apirasa y peroxidasa. En otra realización, el recubrimiento no transparente proporciona una superficie para la inmovilización de enzimas. En otra realización, el primer recubrimiento proporciona un medio para atrapar reactivos o analitos en la cámara de reacción. En otra realización, el recubrimiento no transparente proporciona un medio para atrapar reactivos o analitos en la cámara de reacción.

2. Procedimiento para grabar químicamente por un único lado una placa de fibra óptica

La presente descripción se refiere también a un procedimiento para producir cámaras de reacción sobre el sustrato de una matriz y al aparato para realizar dicho procedimiento. En una realización, las cámaras de reacción se forman sobre un sustrato de placa de fibra óptica. En una realización, las cámaras de reacción se forman utilizando un procedimiento de grabado químico selectivo que se aprovecha de la diferencia en las velocidades de grabado entre los materiales del núcleo y del revestimiento. Véase, por ejemplo, Pantano et al., *Chem. Mater.* 8: 2832 (1996) y Walt et al., documento de la patente de Estados Unidos número 20020015146. Las cámaras de reacción se pueden formar sobre uno o sobre ambos lados de una placa de fibra óptica. Los métodos para formar cámaras de reacción en ambos lados del sustrato no necesitan equipos o aparatos especiales, más allá de un baño de grabado. Sin embargo, en una realización, las cámaras de reacción grabadas sobre uno de los lados de la placa de fibra óptica necesitan ser eliminadas posteriormente de tal forma que la superficie sea lo suficientemente suave como para ser acoplada ópticamente a un sistema de cámaras. Este proceso de eliminación supone una etapa de pulido cara y que consume mucho tiempo. Si se forman las cámaras de reacción en un único lado, la placa de fibra óptica está lista casi inmediatamente para su limpieza y recubrimiento de la superficie. La presente descripción proporciona tanto un equipo como un procedimiento de grabado químico que están diseñados para producir cámaras de reacción sobre un solo lado de una placa de fibra óptica.

A. Equipo de grabado: abrazaderas y juntas

Generalmente, un equipo utilizado para el grabado químico de una placa de fibra óptica por un único lado incluye las siguientes piezas: al menos una abrazadera y una junta (figuras 12 y 13). El término "sándwich" se refiere a dos placas de fibra óptica con una junta colocada entre las dos placas de fibra óptica. Una abrazadera 39 es un dispositivo que se usa para presionar o sujetar firmemente juntas las dos placas de fibra óptica 1 con una junta 75, para formar un "sándwich fijado" que se usa durante el proceso de grabado. La junta 75 se diseña para crear un cierre ajustado fluido en un sándwich fijado, esto es, se coloca una junta entre dos placas de fibra óptica con el fin de proteger un lado de cada una de las placas de fibra óptica de la exposición frente al ácido. Tanto las placas de fibra óptica como la junta contienen todas una forma índice que proporciona una base física para montar las placas de fibra óptica de tal forma que solo se someta a tratamiento con el ácido una cara de cada placa de fibra óptica.

1. Abrazadera.

La presente invención incluye una abrazadera que tiene dos componentes unidos, una base y unos dientes. Ambos componentes se fabrican a partir de un único material adecuado o, de manera alternativa, cada componente se fabrica separadamente a partir de materiales adecuados y se unen juntos utilizando cualquier variedad de técnicas de unión conocidas en la técnica (por ejemplo se unen mediante adhesivos, se unen mecánicamente, etc). La base tiene generalmente forma de caja rectangular con al menos una superficie superior y una superficie inferior, opuestas entre sí, existiendo una cierta distancia entre la superficie superior y la inferior. La superficie inferior está unida permanentemente a la superficie superior por lados y extremos que están unidos de forma permanente para formar el perímetro exterior de la base. La base tiene al menos un primer y un segundo lados y al menos un primer y un segundo extremos. La superficie de la base es generalmente plana.

Al menos dos dientes se alinean sobre una superficie de la base. En esta versión de la invención, al menos dos dientes se alinean sobre la superficie superior de la base y se extienden hacia fuera de ella una cierta distancia. Se puede alinear sobre la superficie superior cualquier número de dientes. El diente adecuado tiene cualquier forma o tamaño. Por ejemplo, un diente es un rectángulo afilado que tiene al menos cuatro bordes, incluyendo un borde externo y un borde interno y un primer y segundo bordes. Los bordes externo e interno se oponen entre sí y los bordes primero y segundo se oponen entre sí. Los bordes de un diente se conectan para formar un diente con forma rectangular acabada en punta. El borde interno de un diente es plano y se une perpendicularmente a la superficie superior de la base. El diente tiene una punta y una altura. Se coloca un par de dientes a lo largo de la superficie superior, con el borde interno de un diente opuesto al borde interno de un segundo diente, para formar una ranura por debajo del medio de la superficie superior de la base. La ranura, con una anchura W_{11} , es donde las placas de fibra óptica y la junta se sujetan de manera segura por los dientes de una abrazadera. Las personas expertas en la técnica saben que una abrazadera no se limita a una forma específica (como la indicada) y que puede ser de otras formas y dimensiones globales.

Tomando como referencia las figuras 7a-d, una realización de la invención incluye una abrazadera unitaria 39 que está formada por una base de forma rectangular 40 y al menos dos dientes 43, 44. La base tiene una superficie superior 41 y una superficie inferior, 42, que son opuestas. La superficie inferior 42 está unida de manera permanente a la superficie superior 41 por cualquier número de lados y extremos, que están conectados para formar la frontera exterior de la base 40. La distancia D_2 entre la superficie superior 41 y la superficie del fondo 42 es cualquier distancia. En una realización, la distancia entre las superficies superior e inferior, 41 y 42, no es mayor de 10 cm. En otra realización, D_2 es de 0,5 mm a 5 mm. En una realización adicional, la distancia D_2 es de aproximadamente 4 mm.

En una realización, la base rectangular 40 tiene un primer lado 35 y un segundo lado 36 separados por una distancia W_{12} y un primer extremo 37 y un segundo extremo 38 separados por una distancia L_{10} . En una realización más preferida, la base 40 tiene forma rectangular con esquinas planas. Por ejemplo, la base 40 tiene un primer lado 35 y un segundo lado 36 separados por una distancia W_{12} ; un primer extremo 37 y un segundo extremo 38 separados por una distancia L_{10} y cuatro extremos de esquina que incluyen un primer extremo de esquina 45, un segundo extremo de esquina 46, un tercer extremo de esquina 47 y un cuarto extremo de esquina 48.

Las personas normalmente conocedoras de la técnica se darán cuenta de que los lados, extremos y extremos de esquina de la base 40 pueden tener cualquier longitud. En una realización, el primer y el segundo lados, 35 y 36, tienen la misma longitud; el primer y el segundo extremos, 37 y 38, tienen la misma longitud y los cuatro extremos de esquina, 45, 46, 47 y 48, tienen la misma longitud. En una realización, la longitud y la anchura son iguales. Por ejemplo, el primer lado 35 y el segundo lado 36 tienen cada uno una longitud L_9 de aproximadamente 58 mm. El primer extremo 37 y el segundo extremo 38 tienen cada uno una longitud L_{11} de aproximadamente 12 mm. Los cuatro extremos de las esquinas, 45, 46, 47 y 48, tienen cada uno una anchura L_{13} que es de aproximadamente 2 mm.

Un diente tiene cualquier forma y cualesquiera dimensiones, incluyendo la altura. En esta versión de la invención, la forma general del diente es un rectángulo acabado en punta. Un diente comprende múltiples bordes, una punta del diente y tiene una altura. En una realización, un diente 43 tiene cuatro bordes, incluyendo un borde interno 49 y un borde externo 52 que se oponen y un primer borde 50 y un segundo borde 51 que se oponen a su vez. En una realización, la superficie del borde interior 49 es plana y perpendicular a la superficie superior 41. La superficie del borde externo 52 es plana y forma un ángulo A_4 con la superficie superior 41. En una realización, el ángulo A_4 es de 45 grados. El primer borde 50 tiene una superficie que es cóncava y el segundo borde 51 tiene una superficie que es cóncava. La punta de un diente puede ser de cualquier forma y de cualesquiera dimensiones. En una realización, la punta o extremo superior de un diente 55 es puntiaguda. De manera alternativa, la punta de un diente es plana o redondeada. En un aspecto de la invención, el extremo superior 55 es plano y de forma rectangular. En una realización adicional, el área rectangular del extremo superior 55 es de aproximadamente 1 mm x 2 mm. Un diente (por ejemplo, el 44) puede tener cualquier altura. En una realización, la altura H_6 de un diente es de aproximadamente 5-6 mm.

La abrazadera 39 puede usar un conjunto de al menos dos dientes para comprimir juntas las placas de fibra óptica y la junta para el proceso de grabado químico. La superficie de la base 40 tiene cualquier número de dientes. Generalmente, los dientes se alinean a lo largo de la superficie superior 41. En una realización, un diente 43 se alinea sobre la superficie superior 41 con su lado externo 52 a lo largo del primer lado 35 y otro diente 44 se opone y alinea sobre la superficie superior 41 con su lado externo a lo largo del segundo lado 36. La abrazadera 39 puede tener uno o más pares de dientes. La abrazadera 39 puede tener múltiples pares de dientes. En un aspecto de la invención, la abrazadera 39 tiene de uno a seis pares de dientes alineados sobre la superficie superior 41. Las personas diestras en la técnica saben que el número de pares de dientes puede variar, dependiendo del tamaño de la placa de fibra óptica.

Un par de al menos dos dientes, 43 y 44, y una base 40 forman una abrazadera unitaria 39 fabricada a partir de un único material adecuado o a partir de materiales separados adecuados que están respectivamente fabricados en conjunto o unidos después. En esta versión, la abrazadera 39 tiene una ranura 56 situada por debajo del centro de la superficie superior 41. La ranura 56 es el lugar donde se sujetan las placas de fibra óptica y la junta por la abrazadera 39. La ranura 56 se crea por el alineamiento de los dientes 43 y 44 sobre la superficie superior 41 a lo largo de los lados primero y segundo, 35 y 36. La longitud L_{10} de la ranura 56 se extiende desde el primer extremo 37 al segundo extremo 38. La anchura W_{11} de la ranura 56 es la distancia entre el borde interno de un borde 44 y el borde interno de un diente 43. La ranura puede tener cualquier anchura y cualquier longitud. La anchura W_{11} de la ranura 56 es generalmente equivalente a la anchura de un sándwich formado por el conjunto de dos placas de fibra óptica y una junta. En una realización, la anchura W_{11} de la ranura 56 es aproximadamente 6 mm. En una realización, la longitud L_{10} de la ranura 56 es aproximadamente 62 mm.

Una abrazadera está fabricada con cualquier material adecuado. En una realización, se fabrica una abrazadera con cualquier material resistente a los ácidos. En una realización adicional, la abrazadera se fabrica con un material plástico. En una realización muy preferida, la abrazadera se fabrica con poliéteretercetona ("abrazadera de PEEK").

2. Junta.

La presente invención incluye una junta como una de las piezas que incluye un equipo de grabado al ácido. El objetivo general de una junta es formar un sello o cierre hermético entre la junta y una superficie de la placa de fibra óptica con el fin de proteger la otra superficie de la placa de fibra óptica de la exposición al líquido (es decir, al ácido). La junta se fabrica con cualquier material adecuado que tenga propiedades compatibles con las condiciones del proceso de grabado químico. La junta está fabricada generalmente con un material resistente a los ácidos. En una realización, el material de la junta es flexible. Las personas con conocimientos normales de la técnica se darán cuenta que la junta puede tener cualquier forma o tamaño siempre que se pueda conformar de manera adecuada para formar un sello o cierre hermético con la placa de fibra óptica, de tal forma que el área sellada esté situada correctamente sobre la placa de fibra óptica y proteja del grabado químico el área deseada. Una junta tiene al menos

dos superficies, una superficie superior y una superficie inferior. La superficie de la junta tiene una cresta, que es una superficie elevada, plana, que hace contacto con la placa de fibra óptica a lo largo del perímetro de la placa de fibra óptica alrededor del área que se va a proteger en el proceso de grabado. En una realización, una junta tiene al menos dos crestas opuestas que son superficies planas elevadas que hacen contacto con la placa de fibra óptica a lo largo del perímetro de la placa de fibra óptica alrededor del área que se va a proteger en el proceso de grabado. En una realización, la junta es de forma rectangular y tiene dos superficies planas opuestas separadas una cierta distancia entre ellas y cada superficie contiene una cresta. La junta tiene una característica en forma de marco exterior que sale hacia fuera sobre ambas superficies, superior e inferior, que sirve para colocar la placa de fibra óptica en la posición adecuada cuando se monta sobre la junta. El marco exterior de la junta está formado por paredes que están unidas de forma permanente a las superficies superior y de fondo. Una junta tiene cualquier número de paredes. En una realización, una junta tiene cuatro paredes, a saber, la pared primera, la pared segunda, la pared tercera y la pared cuarta. La pared de la junta tiene una altura. Las paredes de la junta están conectadas a ángulos perpendiculares para formar un marco exterior rectangular. Las paredes de la junta, que conforman el marco exterior de la placa de fibra óptica, se extienden por encima de la superficie superior y por debajo de la superficie inferior para formar una estructura de tipo bandeja en la cual se coloca cada placa de fibra óptica durante el proceso de grabado. En un aspecto de la invención, la junta tiene la misma forma general que la placa de fibra óptica.

Al menos la superficie superior, o la superficie inferior (fondo) o, alternativamente, ambas superficies de una junta incluyen una parte levantada que forma una cresta elevado por encima de la superficie; la razón para que exista esa cresta es facilitar la formación de un cierre apretado entre la placa de fibra óptica y la superficie de la junta y evitar que un lado de cada placa de fibra óptica resulte expuesto al líquido. La cresta es suave y tiene una sección transversal uniforme y forma una barrera continua alrededor del perímetro de las placas de fibra óptica. En una realización, la cresta es una frontera con forma rectangular que tiene una cierta altura por encima de la superficie de la junta y una cierta anchura. La cresta está situada a una distancia dentro de las paredes de la junta.

La junta incluye además al menos una forma índice para proporcionar una base física para orientar adecuadamente una placa de fibra óptica durante el proceso de grabado, de tal modo que permite que la placa de fibra óptica se monte en una junta con la única orientación posible. La colocación adecuada de la placa de fibra óptica asegura de manera consistente que se graba siempre el mismo lado de la placa de fibra óptica. Una forma índice puede tener cualquier forma. En una realización, se coloca una banda con un cierto ángulo en una esquina de la junta para formar la forma índice de la junta, de modo que la banda forma una barrera de esquina que limita y restringe la manera en que se monta una placa de fibra óptica en una junta (es decir, la muesca de esquina de una placa de fibra óptica se hace coincidir con la forma índice de la junta).

Tomando como referencia las figuras 11a-e, esta versión de la invención incluye una junta 75, que tiene una superficie superior 76 y una superficie inferior 77. Las superficies superior e inferior, 76 y 77, se oponen directamente, de modo que hay una distancia entre la superficie superior 76 y la superficie inferior 77. La distancia entre las dos superficies es cualquier distancia. En una realización, la distancia H_{10} entre la superficie superior 76 y la superficie inferior 77 es de aproximadamente 1 mm. La superficie de la junta tiene cualquier forma. En una realización, las superficies superior e inferior de la junta tienen formas rectangulares.

Cualquier persona diestra en la técnica sabe que una junta tiene un cierto número de paredes. En una realización, la junta 75 tiene cuatro paredes: la primera pared 78, la segunda pared 79, la tercera pared 80 y la cuarta pared 81. En una realización, todas las paredes de la junta 75 están conectadas permanentemente. Las paredes están conectadas para formar un marco exterior unido permanentemente a las superficies opuestas superior e inferior 76 y 77. En una realización, las paredes 78, 79, 80 y 81 de una junta forman un marco de forma rectangular alrededor de las superficies opuestas superior e inferior 76 y 77. Por ejemplo, en la figura 11a, la primera pared 78 y la tercera pared 80 se extienden perpendicularmente entre la segunda pared 79 y la cuarta pared 81.

La longitud de las paredes de la junta 75 es cualquiera. En una realización, las paredes 78, 79, 80 y 81 tienen la misma longitud o, de manera alternativa, tienen longitudes diferentes. Las juntas adecuadas tienen paredes con diferentes longitudes. En una realización, la longitud L_4 de la primera pared 78 es aproximadamente 78 mm y la longitud de la tercera pared 80 es la misma que la longitud L_4 de la primera pared 78. La anchura L_6 de la segunda pared 79 es aproximadamente 42 mm y la longitud de la cuarta pared 81 es la misma que la anchura L_6 de la segunda pared 79.

En una realización, una o más paredes de la junta 75 se extienden hasta una cierta altura por encima de la superficie superior 76. En una realización, todas las paredes 78, 79, 80 y 81 se extienden hasta una altura por encima y por debajo de las superficies 76 y 77. En una realización más preferida, la cuarta pared 81 se eleva por encima de la superficie superior 76 hasta una altura H_8 ; la segunda pared 79 se eleva por encima de la superficie 76 hasta una altura H_{12} ; la tercera pared se eleva por encima de la superficie superior 76 hasta una altura H_{14} y la primera pared 78 se eleva por encima de la superficie superior 76 hasta una altura H_{17} . En una realización más preferida, las alturas de cada uno de los lados por encima de la superficie superior, H_8 , H_{12} , H_{14} y H_{17} son iguales. En la realización más preferida, la altura de cada una de las paredes 81, 79, 80 y 78 que se extiende por encima de la superficie superior 76 es la misma y es aproximadamente 2 mm.

En otra realización, una o más paredes de una junta 75 tienen una altura que se extiende por debajo de la superficie

del fondo 77. En una realización, la cuarta pared 81 se extiende por debajo de la superficie inferior 77 hasta una altura H_9 ; la segunda pared 79 se extiende por debajo de la superficie inferior 77 hasta una altura H_{13} ; la tercera pared 80 se extiende por debajo de la superficie inferior 76 hasta una altura H_{15} y la primera pared 78 se extiende por debajo de la superficie inferior 76 hasta una altura H_{16} . En una realización más preferida, las alturas H_9 , H_{13} , H_{15} y H_{16} de cada una de las paredes 81, 79, 80 y 78 que se extienden por debajo de la superficie inferior 77 son iguales y de aproximadamente 2 mm.

Ambas superficies 76 y 77 de una junta tienen una parte levantada que es una cresta elevada por encima de la superficie. En una realización, tanto la superficie superior 76 como la superficie inferior 77 incluyen una cresta elevada. Por ejemplo, una cresta adecuada 85 se levanta una altura H_7 sobre la superficie superior 76 y la misma cresta se encuentra sobre la superficie inferior 77. En una realización, la altura H_7 de la cresta 85 es aproximadamente 0,5 mm. La cresta 85 es continua y tiene forma rectangular. La cresta 85 forma una frontera dentro de las paredes de la junta y está a una distancia D_3 de las paredes de la junta. En una realización, la distancia D_3 desde la pared de la junta a la cresta 85 es de aproximadamente 1 mm. La cresta 85 tiene cualquier anchura. En una realización, la anchura W_{15} de la cresta es aproximadamente 2 mm. En algunas juntas adecuadas, hay al menos una forma o característica adicional de la cresta que asegura que se forma un sellado eficaz cerca de la forma índice entre una placa de fibra óptica y la junta. Por ejemplo, la cresta 85 tiene una barra cruzada adicional 84. La barra cruzada 84 tiene la misma altura y anchura que el resto de la cresta 85. Una junta tiene cualquier número de barras cruzadas.

En esta invención una junta tiene al menos una forma índice. Una forma índice de una junta proporciona una base física para orientar una placa de fibra óptica de tal forma que la placa de fibra óptica se monte sobre una junta en una única orientación. La orientación consistente de la placa de fibra óptica asegura que se protege de la exposición al líquido el mismo lado individual de la placa de fibra óptica. La forma índice se localiza sobre la superficie superior 76 o sobre la superficie inferior 77 o, de manera alternativa, sobre ambas superficies 76 y 77 de una junta. En una realización, una junta incluye al menos una forma índice que es una barrera de esquina 82, que comprende una banda 83 colocada formando un ángulo A_5 que proporciona una base física para orientar una placa de fibra óptica cuando la placa de fibra óptica se monta en una junta. En una realización, el ángulo A_5 es 45 grados. Como resultado de tener una forma índice adecuada en una placa de fibra óptica (por ejemplo una muesca o entalla de esquina) y una forma índice complementaria en una junta (por ejemplo una barrera de esquina), se produce el montaje adecuado de la placa de fibra óptica 1 en la junta cuando la esquina con la muesca 13 de la placa de fibra óptica y la barrera de esquina 82 de la junta se alinean de forma adecuada. Cuando se montan apropiadamente la placa de fibra óptica y la junta, la superficie pulida 2 de la placa de fibra óptica 1 se coloca consistentemente contra la junta 75 y, por lo tanto, la superficie pulida 2 no se expone al ácido y no resulta grabada.

Las juntas se fabrican con cualquier material adecuado siempre que el material sea compatible con las condiciones del proceso de grabado químico. En una realización, la junta se fabrica con un material resistente al ácido. Los materiales adecuados para la fabricación de juntas son flexibles. En una realización, la junta se fabrica con un material flexible. En una realización, la junta se fabrica con silicona.

B. El proceso de grabado químico

La presente invención proporciona un procedimiento que produce cámaras de reacción sobre una única superficie o lado de una placa de fibra óptica. Un proceso adecuado es el grabado químico, en el cual las cámaras de reacción se graban sobre una placa de fibra óptica utilizando productos químicos. En una realización, el producto químico usado para grabar las cámaras de reacción sobre la placa de fibra óptica es ácido. En una realización adicional, un procedimiento para grabar una única superficie de una placa de fibra óptica requiere que una superficie de la placa de fibra óptica se proteja de tal modo que la superficie protegida no se exponga a productos químicos y, por lo tanto, no resulte grabada. Un procedimiento adecuado para grabar una única superficie de una placa de fibra óptica utiliza un equipo (por ejemplo, el equipo descrito previamente, que comprende un conjunto de abrazaderas y una junta) para proteger una superficie de una placa de fibra óptica a la exposición química. En una realización, se produce una placa de fibra óptica con cámaras de reacción grabadas sobre una superficie utilizando el proceso que se desarrolla en la figura 10. Antes de la exposición química, las placas de fibra óptica sin grabar se montan utilizando un equipo de grabado que incluye un conjunto de abrazaderas y una junta.

La figura 13 muestra un despiece que ilustra la relación de los distintos componentes utilizados en el proceso de grabado, incluyendo una junta 75 que se coloca entre dos placas de fibra óptica sin grabar. Una primera superficie 2 de una placa de fibra óptica 1 se monta opuesta a la superficie superior de una junta 75, de modo que la muesca de la esquina 13 de la placa de fibra óptica 1 se ajusta con la barrera de esquina complementaria 82 de la junta 75. Se fijan dos abrazaderas 39 de PEEK a lo largo de los dos lados más largos, opuestos del sándwich 100 para mantener bien sujetos, firmemente, las placas de fibra óptica 1 y la junta 75 y para evitar que la primera superficie 2 de la placa de fibra óptica resulte expuesta al ácido. El montaje conjunto mostrado en la figura 12 se denomina "sándwich fijado". El sándwich fijado 101 se transfiere a un baño de ácido. En una realización, el baño de ácido contiene 20 % de ácido nítrico (peso en volumen de disolución acuosa). El tiempo y las condiciones de la reacción del grabado químico se ajustan para conseguir controlar el tamaño y el volumen de las cámaras de reacción resultantes. El sándwich fijado permanece en el baño de ácido durante el tiempo suficiente para que se formen cámaras de reacción con la profundidad deseada. En una realización, el tiempo de grabado es aproximadamente 3 horas y 30

minutos, para producir cámaras de reacción con una profundidad de 55 μm . El proceso de fabricar cámaras de reacción se adapta a cualquier tamaño de fibra de modo que se proporciona un amplio intervalo de cámaras con el tamaño adecuado. Generalmente, las cámaras se introducen en los extremos de las fibras colocando las placas de fibra óptica en un baño de ácido durante un tiempo variable. El tiempo necesario varía, dependiendo de la profundidad global de la cámara de reacción deseada (véase, por ejemplo, Walt et al., 1996, *Anal. Chem.* 70: 1888).

3. Procedimiento de limpieza RER

Antes de aplicar uno o más recubrimientos de película delgada, todos los sustratos (por ejemplo, placas de fibra óptica grabadas al ácido) se limpian a fondo para hacer que la superficie de la matriz esté libre de contaminantes de partículas gruesas y que esté relativamente libre de contaminación grasa, como huellas de dedos, antes de aplicar el recubrimiento de película delgada. En una realización, la placa de fibra óptica se limpia a fondo después de terminar el proceso de grabado para formar las cámaras de reacción como se describe en el ejemplo 1 (figura 9). En una realización, después de la limpieza, al menos el fondo, la parte superior o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con un recubrimiento de película delgada transparente que comprende SiO_2 y que tiene un espesor de 0,1 a 5,0 micrómetros, ópticamente transparente e impermeable al agua y el recubrimiento transparente se aplica antes de aplicar el recubrimiento no transparente. En otra realización, al menos el fondo, la parte superior o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre con un recubrimiento de película delgada no transparente que es de cromo o de plata.

4. Procedimiento para el recubrimiento de las matrices

Se usan varios métodos para depositar uno o más recubrimientos de película delgada sobre la superficie del sustrato de la matriz. Entre estos métodos se incluyen procesos de deposición en fase de vapor o en fase líquida, como evaporación térmica, evaporación con haces electrónicos, pulverización catódica, rociado y recubrimiento electrostático. Típicamente, los recubrimientos transparente y no transparente se aplican en etapas separadas. Estos métodos se describen con más detalle a continuación.

A. Deposición en fase de vapor

La deposición en fase de vapor es un método ampliamente usado en la industria de componentes ópticos y de semiconductores, para el cual existen procesos disponibles comercialmente. La deposición en fase de vapor se puede usar para depositar recubrimientos transparentes y no transparentes. En una realización, cuando están presentes, se depositan los recubrimientos de película delgada transparente y/o no transparente a partir de la fase de vapor sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz. Típicamente, se definen los procesos de deposición en fase de vapor como de naturaleza física o química, dependiendo del grado en el que el material de la película depositada se transforma químicamente a partir de sus precursores. En una realización, cuando están presentes, los recubrimientos de película delgada transparente y no transparente se depositan sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando un proceso físico en fase de vapor conocido como pulverización catódica ("sputtering") o evaporación, en el cual el reactivo químico, que es el precursor de la película delgada, se evapora térmicamente en una cámara de vacío. El vapor de la "prepelícula" recubre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz y forma el recubrimiento de película delgada. Véase, por ejemplo, Plummer et al., *Silicon VLSI Technology*, capítulo 9, Prentice Hall, 2000. En una realización, un óxido de un no metal se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método de pulverización catódica o evaporación (figuras 1a, 1b y 2b). En otra realización, se deposita un metal sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método de deposición de pulverización o evaporación. En una realización adicional, se deposita metal cromo sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método de deposición de pulverización o evaporación. En otra realización, se deposita plata metálica sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método de deposición de pulverización o evaporación.

La deposición química en fase de vapor se puede usar para depositar el recubrimiento transparente o no transparente. En una realización, cuando están presentes, los revestimientos de película delgada transparente o no transparente, se depositan sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando un proceso de deposición química en fase de vapor conocido como deposición química en fase de vapor asistida por plasma, (PECVD, por sus siglas en inglés), en el que dos productos químicos se hacen reaccionar sobre un sustrato calentado, para producir un recubrimiento de película delgada. La PECVD se lleva a cabo en una cámara de reacción, en la cual se inyectan gases. Típicamente, se produce una reacción química a 400 $^{\circ}\text{C}$ que produce como resultado un recubrimiento de película delgada que se deposita sobre la matriz. Se genera un plasma en la cámara para aumentar la energía disponible para la reacción química a una temperatura dada. Típicamente, el proceso PECVD se realiza por un lado del sustrato cada vez. Véase, por ejemplo, Plummer et al., *Silicon VLSI Technology*, capítulo 9, Prentice Hall, 2000. En otra realización, se deposita un óxido de un no metal sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras

de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método PECVD de deposición de vapor. En una realización, se deposita el óxido no metálico SiO_2 sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método PECVD de deposición de vapor (figuras 1c, 1d y 2c). En otra realización, se deposita un metal sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método PECVD de deposición de vapor. En otra realización más, se deposita cromo metálico sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método PECVD de deposición de vapor. En otra realización más, se deposita plata metálica sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz utilizando el método PECVD de deposición de vapor.

La deposición en fase de vapor asistida por iones o iónica se puede usar para depositar el recubrimiento transparente o no transparente. El proceso de deposición iónica incorpora características de otras dos tecnologías, el grabado por pulverización y la mezcla de haces de iones. En el proceso de deposición iónica, el sustrato a recubrir y la fuente del material de recubrimiento se mantienen en un cámara de vacío, dentro de un ambiente gaseoso de baja presión. Antes de ser recubierto con el recubrimiento de película delgada, el sustrato se "limpia por pulverización". Iones (átomos cargados eléctricamente) energéticos y átomos neutros de un gas inerte activado bombardean el sustrato para eliminar contaminantes. La limpieza por pulverización es importante en el proceso de deposición asistida por iones ya que produce una superficie atómicamente limpia y muy reactiva. El material de recubrimiento de película delgada se evapora, favorecido por la interacción con el gas inerte energético (o gas reactivo). En una realización, cuando está presente el recubrimiento de película delgada transparente o no transparente, éste se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, utilizando un método de deposición en fase de vapor asistida por iones, que es un proceso híbrido químico-físico. La figura 3 muestra un diagrama esquemático del método de deposición en fase de vapor asistida por iones. En una realización, un óxido de un no metal se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, utilizando el método de deposición en fase de vapor asistido por iones. En una realización, el óxido de no metal, SiO_2 , se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de una placa de fibra óptica, utilizando el método de deposición en fase de vapor asistida por iones (figuras 1e, 1f y 2d). En otra realización, se deposita un metal sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, utilizando el método de deposición en fase de vapor asistida por iones. En otra realización más, se deposita cromo metálico sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, utilizando el método de deposición en fase de vapor asistida por iones. En otra realización, se deposita plata metálica sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, utilizando el método de deposición en fase de vapor asistida por iones (figura 23).

B. Deposición en estado líquido

Se usan muchos procesos en fase líquida para aplicar el recubrimiento de película delgada transparente o no transparente. En una realización, cuando están presentes, los recubrimientos de película delgada transparente y no transparente o sus materiales precursores se aplican en forma líquida a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie de la matriz y, posteriormente, el material se solidifica. Los procesos en fase líquida son de naturaleza física o química o una combinación de ambas. En una realización, cuando está presente, el material de la película delgada transparente y no transparente se disuelve en un disolvente volátil y la disolución resultante se aplica a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie de la matriz y se deja que se evapore el disolvente, produciendo un recubrimiento de película delgada mediante un proceso físico en fase líquida. En otra realización, cuando están presentes, los recubrimientos transparente y no transparente de película delgada se pueden formar mediante un proceso sol gel, en el cual se disuelven en un disolvente apropiado silicatos inorgánicos o siloxanos orgánicos y se aplican a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie de la matriz. Sometidos a secado y calentamiento, los silicatos o siloxanos de bajo peso molecular experimentan reacciones de condensación química para polimerizarse en una película similar al vidrio a través de un proceso híbrido físico-químico en fase líquida.

Los recubrimientos de película delgada transparente o no transparente depositados por deposición en fase líquida se aplican a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie de la matriz de diversas formas. En una realización, los sustratos de la matriz se sumergen en la disolución de recubrimiento y se retiran de manera controlada, dejando un recubrimiento líquido de espesor controlado mediante la velocidad de retirada del sustrato y el ángulo (de retirada). En otra realización, los líquidos se aplican mediante recubrimiento centrífugo, de modo que la disolución de la película delgada se aplica a al menos la parte superior o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, la cual luego se centrifuga para extender el líquido de manera uniforme y para eliminar el exceso del mismo. En otra realización, la disolución de la película delgada se pulveriza sobre al menos la parte superior o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, de forma que la coalescencia de las gotitas produce un recubrimiento de película delgada transparente o no transparente. En otra

realización, se utiliza una técnica conocida como recubrimiento capilar para recubrir al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz con una película delgada transparente o no transparente. La técnica de recubrimiento capilar implica el uso de un cilindro que gira inmerso parcialmente en la disolución de la película delgada. El sustrato se mueve cerca del cilindro, de tal manera que se forma un menisco en el cilindro y el cilindro se hace rotar a la misma velocidad a la que se traslada el sustrato.

La invención proporciona procedimientos para depositar una capa de película delgada transparente o no transparente sobre la superficie de una matriz que tiene una superficie superior y otra superficie inferior. En una realización, la invención proporciona procedimientos para depositar una capa de película delgada transparente o no transparente sobre el fondo y la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y sobre la superficie superior de la matriz. La invención proporciona también procedimientos para depositar una capa de película delgada transparente o no transparente sobre al menos la pared lateral o sobre el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz. Por ejemplo, la invención proporciona un método para depositar un recubrimiento de película delgada transparente o no transparente sobre la pared lateral de la cámara de reacción sin depositar el mismo recubrimiento de película delgada sobre el fondo de la cámara de reacción. En una realización, el fondo de la cámara de reacción se protege durante el proceso de recubrimiento y no se recubre, porque el fondo de la cámara de reacción está en el área de sombra (esto es, el recubrimiento está bloqueado por la pared lateral de la cámara de reacción y, por tanto, no se deposita sobre el fondo de la cámara de reacción). Por ejemplo, la figura 15a ilustra una cámara de reacción en la que la pared lateral crea una sombra, protegiendo de este modo el área de sombra de la cámara de reacción, de tal modo que no se deposita metal en el área de sombra sobre el fondo de la cámara de reacción. En una realización, el método de la invención utiliza sombras creadas por la pared lateral de la cámara de reacción y la rotación de la matriz a un cierto ángulo de inclinación controla donde se deposita el recubrimiento de película delgada transparente o no transparente. En otra realización, el sustrato de la matriz está girando durante el proceso de deposición del recubrimiento de película delgada transparente o no transparente. La rotación del sustrato de la matriz permite que el recubrimiento de película delgada se deposite de manera uniforme.

El montaje para el proceso de depositar un metal sobre la pared lateral y el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción y sobre la superficie superior de la matriz se ilustra en la figura 15a. El procedimiento implica inclinar el sustrato de la matriz montado sobre un soporte y hacer rotar el sustrato con un motor. A medida que el sustrato de la matriz gira, el recubrimiento de película delgada se deposita sobre la pared lateral y el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción y sobre la superficie superior de la matriz y el recubrimiento de película delgada falta en el centro del fondo de tal forma que la ausencia del recubrimiento crea un agujero cerca del centro del fondo de la cámara de reacción. Cambiar el ángulo de inclinación del sustrato que gira da como resultado que el recubrimiento de película delgada se deposite formando diferentes patrones sobre el sustrato de la matriz, por ejemplo, diferentes formas, gradientes de espesor o que se superpongan dos recubrimientos (figura 15a).

En una realización, el procedimiento de la invención deposita el recubrimiento de película delgada transparente o no transparente sobre toda la superficie de al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz, por ejemplo, la superficie del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción está recubierta completamente con una película delgada.

En otra realización, el recubrimiento de película delgada transparente o no transparente se deposita en el área de la esquina de la cámara de reacción, de tal modo que la zona de la esquina se forma en la unión entre el fondo y la pared lateral. El recubrimiento de película delgada se deposita parcialmente sobre el fondo y se deposita parcialmente sobre la pared lateral de la cámara de reacción, de modo que el recubrimiento está ausente del centro del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y forma un orificio (figura 16). En una realización, el ángulo al cual se sujeta el sustrato (esto es, el ángulo de inclinación) se puede ajustar para controlar el tamaño del orificio (figura 15a). La deposición parcial del recubrimiento de película delgada no transparente sobre el área de la esquina de modo que falte recubrimiento sobre el fondo de la cámara de reacción elimina además el drenaje óptico entre cámaras de reacción adyacentes y restringe los haces luminosos que se dirigen hacia el interior de los hilos de la fibra, por ejemplo cuando la matriz se usa para análisis (por ejemplo, secuenciación de ADN).

En una realización, el proceso de la invención se usa para depositar parcialmente (es decir, recubrir parcialmente) un recubrimiento de película delgada opaco, no transparente, sobre una parte de la superficie de al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de una matriz, por ejemplo, el fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubre parcialmente con una película delgada. En una realización, al menos 80 % del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 60 % del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 40 % del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 20 % del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 10 % del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente.

En otra realización, el recubrimiento de película delgada no transparente opaco se aplica a la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción sobre una placa de fibra óptica. El recubrimiento no transparente cubre completamente toda la superficie de la pared lateral o, de manera alternativa, el recubrimiento no transparente cubre parcialmente la superficie de la pared lateral. En una realización, al menos 80 % de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 60 % de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 40 % de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 20 % de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente. En otra realización, al menos 10 % de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz se recubre con una película delgada transparente o no transparente.

En otra realización, el recubrimiento parcial no transparente opaco sobre el área de la esquina del fondo y sobre la pared lateral produce un obstáculo óptico y elimina la dispersión óptica a través del material de revestimiento y permite que la luz atravesase el fondo que no está cubierto con el segundo recubrimiento opaco.

El método para depositar una película delgada transparente o no transparente se puede usar también para aplicar recubrimientos de película delgada a formas o características que se encuentran sobre un sustrato, por ejemplos postes de frontera o estructuras de columna. Los patrones de los postes producen diferentes patrones de sombras sobre el fondo.

Como se muestra en la figura 18, se pueden producir efectos de ángulo durante el proceso de deposición cuando la fuente (por ejemplo una fuente de iones metálicos) es de un tamaño considerablemente más pequeño que la superficie del sustrato que se va a recubrir. "Efectos angulares" significa que el perfil del recubrimiento de película delgada transparente o no transparente es variado (es decir, no es uniforme) en diferentes puntos del sustrato de la matriz. Los efectos angulares producen una matriz con cámaras de reacción que no están recubiertas de manera uniforme. La figura 18a muestra el recubrimiento que se está depositando en el área de la esquina de tres cámaras de reacción situadas en un extremo del sustrato y la figura 18b muestra el recubrimiento que se está depositando en el fondo de tres cámaras de reacción situadas en el otro extremo del mismo sustrato de la matriz. Entre las estrategias para eliminar los efectos de ángulo se incluyen: aumentar la distancia entre la fuente y el sustrato que se va a recubrir; poner una máscara de sombra enfrente del sustrato para desplazar y barrer un sustrato completo durante el proceso de deposición; introducir un obturador entre la fuente y el sustrato o disminuir el tamaño del obturador (su "apertura"). La figura 19a muestra el uso de una máscara de sombra durante el proceso de deposición para ayudar a dirigir el recubrimiento a un área escogida (por ejemplo, la "zona recubierta de metal") del sustrato y para eliminar efectos de ángulo. La máscara de sombra se coloca entre la fuente de iones y el sustrato y se puede colocar a cualquier distancia del sustrato. La figura 19b muestra el uso de un obturador durante el proceso de deposición para ayudar a dirigir el recubrimiento de metal a un área seleccionada del sustrato, la zona recubierta de metal.

Una realización de la invención incluye un procedimiento para depositar un recubrimiento de película delgada no transparente sobre un sustrato con una superficie superior que contiene numerosas cámaras de reacción, donde cada cámara de reacción comprende un fondo o una pared lateral y el recubrimiento no transparente es opaco, semi-opaco, opaco brillante o traslúcido y se deposita sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz. El procedimiento supone: (a) montar un sustrato sobre un portador de sustrato con un cierto ángulo; (b) hacer girar el sustrato montado en una cámara de vacío; (c) depositar la película delgada no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior del sustrato; (d) retirar el sustrato de la cámara de vacío y (e) desmontar el sustrato recubierto con el recubrimiento no transparente del portador del sustrato. En una realización, el procedimiento se usa para depositar un recubrimiento no transparente sobre el sustrato que es una placa de fibra óptica. En otra realización, el procedimiento se utiliza para depositar un recubrimiento no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de una matriz que ya está recubierta en el fondo o en la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz con un recubrimiento transparente, antes de que se aplique el recubrimiento no transparente. En otra realización, el procedimiento se usa para depositar un recubrimiento no transparente sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o sobre la superficie superior de una matriz que está revestida sobre al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas sus cámaras de reacción o sobre la superficie superior de la matriz con una película delgada transparente que es ópticamente transparente, de un espesor de 0,1 a 5 micrómetros e impermeable al agua. En otra realización, al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz se recubre con un recubrimiento no transparente antes de aplicar un recubrimiento transparente a al menos el fondo o la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de la matriz.

En una realización, el procedimiento de deposición de metal en ángulo utiliza un soporte inclinado y un montaje del portador en ese soporte inclinado. La figura 15a muestra una vista lateral de una placa de fibra óptica que contiene cámaras de reacción que está montada sobre el portador de sustrato de un plano inclinado. El montaje de soporte inclinado, en ángulo y giratorio, se muestra en la figura 15b. La placa de fibra óptica se mantiene a cierto ángulo (el

“ángulo de inclinación”) y gira, mientras se evapora un recubrimiento no transparente, por ejemplo, un metal, a partir de una fuente y se deposita sobre la pared lateral y el área de la esquina de cada cámara de reacción y sobre la superficie superior de la matriz. El proceso completo se puede llevar a cabo en una cámara de deposición de metal y el disco giratorio puede ser manejado por un motor compatible con el vacío, el cual puede girar a menos de 10 rpm.

5 C. Control de calidad

Una vez completado el proceso de recubrimiento, se evalúa la calidad de los recubrimientos de película delgada resultantes utilizando varias técnicas diferentes. Para detectar la presencia de recubrimientos de película delgada intactos y para evaluar el rendimiento de la matriz recubierta se utilizan tanto métodos directos como funcionales. En un aspecto de la invención, el recubrimiento de la matriz es uniforme. Inicialmente, se realiza una inspección de control de calidad visual que consiste en inspeccionar visualmente cada matriz recubierta de película con un microscopio, con el fin de detectar cualesquiera defectos grandes. Los agujeros pequeños en el recubrimiento (“agujeros de alfiler”) indican que el recubrimiento es de mala calidad. En algunas realizaciones, en las que el fondo está cubierto parcialmente, el centro del fondo de la cámara de reacción debería estar limpio de cualquier recubrimiento no transparente para asegurar que la luz puede pasar por el centro de la cámara sin ninguna reducción de intensidad. El diámetro del orificio formado en un fondo parcialmente recubierto se puede medir para determinar si el ángulo de inclinación usado en el proceso de deposición es el correcto. En una realización, el diámetro del orificio formado por el recubrimiento parcial del fondo de la cámara de reacción es aproximadamente de 28 micrómetros. En otra realización, la anchura del anillo formado cuando se aplica el recubrimiento al área de la esquina es aproximadamente de 8,5 micrómetros (figura 16b). En algunas realizaciones, es crítico que el área de la esquina de la cámara de reacción esté recubierta con el recubrimiento no transparente de tal forma que la luz no se “fugue” hacia las cámaras adyacentes. En una realización, el espesor del recubrimiento no transparente en el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción de la matriz es no menos de 500 Angstrom (figura 16a).

En segundo lugar, se realiza un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) sobre la matriz recubierta con la película delgada. El análisis SEM es un método de análisis clave usado para determinar la calidad tanto de los recubrimientos transparentes como de los no transparentes. Típicamente, se recogen y analizan imágenes SEM tanto de la superficie recubierta de la película delgada como de una sección transversal preparada. Las imágenes de la superficie se analizan para detectar eventuales defectos y daños en el recubrimiento, así como para observar la morfología global de la superficie recubierta con la película delgada, mientras que las secciones transversales se utilizan para medir espesores. Matrices escogidas se evalúan también para detectar los potenciales efectos de los componentes usados en una reacción química o en un bioensayo y que estén contenidos en la cámara de reacción (por ejemplo, el recubrimiento de película delgada se examina tanto antes como después de “simulacros” de condiciones PCR; véase por ejemplo, el ejemplo 3). Se puede medir el espesor del recubrimiento de película delgada. En una realización, se usa SEM para determinar el espesor del recubrimiento de película delgada. En otra realización, se mide el espesor de recubrimiento de película delgada añadiendo una muestra de zafiro al lote (Corion Division, Franklin, MA, Estados Unidos) y determinando el espesor de película delgada (por ejemplo de SiO₂) después de que se haya completado el proceso de recubrimiento, midiendo la dependencia de la longitud de onda de su transmitancia de luz. El espesor de los recubrimientos se sigue también mediante deposición electrolítica para deposición de películas delgadas más gruesas con el fin de producir características o formas adicionales sobre la matriz.

Las matrices recubiertas de películas delgadas se evalúan también “funcionalmente” observando su rendimiento en aplicaciones específicas, por ejemplo, secuenciación de ADN, para determinar los efectos del recubrimiento de película delgada sobre el ruido de fondo de secuenciación inducida por la PCR y sobre la calidad global de los resultados de secuenciación. Tal ensayo funcional puede proporcionar la ventaja de la resolución de una cámara individual a través de la superficie de la matriz entera. Véanse ejemplo 4 y figura 4. Una comparación de la intensidad luminosa generada durante las reacciones de secuenciación de ADN en dos cámaras de reacción adyacentes desde cámaras de reacción recubiertas y no recubiertas, sobre la misma matriz, mostró que un recubrimiento no transparente puede ayudar a disminuir el drenaje óptico entre dos cámaras adyacentes (véanse ejemplo 6 y figuras 24a-b).

5. Métodos de usar las matrices

Las matrices recubiertas con películas delgadas pueden contener varios reactivos y analitos distintos en sus cámaras de reacción. En una realización, cada cámara de reacción de la matriz recubierta de película delgada contiene reactivos para analizar un ácido nucleico o una proteína. Típicamente, las cámaras de reacción que contienen un ácido nucleico (no se necesitan para ello todas las cámaras de reacción de la matriz) contienen solamente una única especie de ácido nucleico (es decir, una única secuencia de interés). Puede haber una única copia de esta especie de ácido nucleico en cualquier cámara de reacción concreta, o puede haber múltiples copias. En una realización, una cámara de reacción contiene al menos 100.000 copias de la secuencia plantilla de ácido nucleico. En otra realización, la cámara de reacción contiene al menos 1.000.000 de copias. En otra realización más, la cámara de reacción contiene entre 2.000.000 y 20.000.000 copias. En otra realización, la cámara de reacción contiene entre 5.000.000 y 15.000.000 de copias del ácido nucleico. Por ejemplo, si el equipo que se describe en este documento se utiliza para una reacción de pirosecuenciación, la persona con conocimientos normales en la

técnica se dará cuenta de que los cambios en el número de copias de una especie de ácido nucleico en cualquier cámara de reacción afectarán al número de fotones generados en la reacción de pirosecuenciación y que se ajustan de manera rutinaria para proporcionar una señal de más o menos fotones, según se necesite. En una realización, la especie de ácido nucleico se amplifica para proporcionar el número deseado de copias utilizando PCR, RCA, la reacción en cadena de la ligasa, otra amplificación isotérmica u otro medio convencional de amplificación de ácidos nucleicos. En una realización el ácido nucleico es de un solo filamento.

El recubrimiento de película delgada proporciona una matriz con compatibilidad y funcionalidad mejoradas. Un ensayo concreto que ha encontrado problemas debido a la incompatibilidad de la matriz es el análisis de moléculas de ácidos nucleicos, específicamente la secuenciación con pirofosfato (PPS, por sus siglas en inglés) o los ácidos nucleicos amplificados mediante la técnica PCR. En una realización, la matriz recubierta con película delgada se usa para superar los problemas encontrados en los ácidos nucleicos amplificados con las técnicas PPS o PCR. El método PPS usado es conforme a los métodos de la solicitud de patente de Estados Unidos número 10/767.779. Véanse también, los documentos de las patentes de Estados Unidos números 4.863.849 y 4.971.903. Cuando se lleva a cabo la amplificación, seguida de la secuenciación en la misma cámara de reacción, se observa una señal de "fondo". La fuente de este fondo es el pirofosfato liberado (PPi) que permanece fuertemente enlazado a la cámara de reacción de la placa de fibra óptica de tal modo que persiste incluso después de intensos lavados. Por lo tanto, se desarrolló un ensayo "de fondo" que supone realizar PCR en la fase en disolución, lavar la placa de fibra óptica, cargar la placa de fibra óptica con perlas Dynal de sulfurilasa (S) y luciferasa (L) (Fischer Scientific, Pittsburg, PA, Estados Unidos de América) y medir la señal (normalizada respecto de un flujo de pirofosfato previo). Una reducción en el ruido de fondo en PPS produciría mejores resultados de secuenciación a un nivel de señal dado o permitiría que se obtuviesen resultados de secuenciación equivalentes a niveles de señal más bajos (ejemplo 5).

Los recubrimientos de película delgada de las cámaras de reacción de una matriz de microcubetas o micropocillos pueden disminuir de manera significativa el ruido de fondo de la secuenciación inducida por PCR, como se muestra en la figura 4. En una realización, un recubrimiento de película delgada de SiO₂ con un espesor de 0,1 – 5,0 micrómetros sobre al menos la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción o la superficie superior de una placa de fibra óptica disminuye de manera significativa el ruido de fondo de la secuenciación inducida por PCR y proporciona los mismos resultados de secuenciación que los obtenidos en una matriz sin recubrir, como se muestra en la figura 5.

La invención incluye un método para secuenciar un ácido nucleico utilizando las matrices; el método comprende: proporcionar numerosas plantillas de ácidos nucleicos de un solo filamento depositadas dentro de numerosas cámaras de reacción sobre una matriz de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento; llevar a cabo una reacción de secuenciación del pirofosfato simultáneamente sobre sustancialmente todas las cámaras de reacción mediante el templado de una cantidad efectiva de un cebador o iniciador de secuenciación a las plantillas de ácido nucleico y ampliando el iniciador de secuenciación con una polimerasa y un trifosfato de nucleótido predeterminado para producir un producto de secuenciación, de modo que, si el trifosfato de nucleótido predeterminado se incorpora en el extremo 3' de dicho iniciador de secuenciación, se produce un subproducto de la reacción de secuenciación; e identificar el subproducto de la reacción de secuenciación, determinando de este modo la secuencia del ácido nucleico en cada cámara de reacción.

Otro aspecto de esta invención es un aparato para analizar una secuencia de un ácido nucleico. El equipo comprende: una cámara de entrega, de modo que la cámara incluye una matriz de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento; un dispositivo de entrega de reactivos en comunicación con la cámara de entrega de reactivos; un sistema de representación de imágenes en comunicación con la cámara de entrega de reactivos y un sistema de recogida de datos en comunicación con el sistema de representación de imágenes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han escogido meramente para ilustrar adicionalmente características, ventajas y otros detalles de la invención. Expresamente se debe entender, sin embargo, que si bien los ejemplos sirven para este objetivo, las condiciones y los detalles concretos no están diseñados de manera que limitasen de forma indebida el alcance de esta invención.

Ejemplo 1: Proceso general de grabado y procedimiento de limpieza RER

Este ejemplo describe el proceso general de grabado por una sola cara para placas de fibra óptica (Incom Corporation, Charlton, MA, Estados Unidos de América) de tamaño 25 x 75 mm o 40 x 75 mm utilizando juntas de grabado de silicona y abrazaderas de plástico PEEK (polieteretercetona) (figuras 11a y 11b). Se desgasificó durante 10 minutos agua destilada para un baño Branson Ultrasonic (Fischer Scientific, NH, Estados Unidos) procedente de una unidad de purificación de agua PicoPure™ ("agua PicoPure"). Se reguló el recirculador Neslab (Portsmouth, NH, Estados Unidos) a 57,2 °C (con esta regulación, el agua dentro del baño de ultrasonidos se mantuvo a una temperatura constante de 55 °C). Se taparon y se colocaron dentro del baño de ultrasonidos cuatro depósitos de acero inoxidable. Cada depósito se cargó con 1000 ml (para placas de fibra óptica de 25 x 75 mm) o 1200 ml (para placas de fibra óptica de 40 x 75 mm) de HNO₃ al 20 % y se templaron a 55 °C. Se cargaron noventa y seis placas de fibra óptica sin grabar en las 96 posiciones de cuatro bandejas de grabado químico. Se escogió una placa de fibra

óptica determinada y se pesó. Se representó gráficamente la diferencia de peso de la placa de fibra óptica antes y después del grabado químico con el fin de correlacionar pérdida de peso con profundidad de la cámara de reacción.

5 Se juntaron dos placas de fibra óptica sin grabar colocando entre ellas una junta de silicona (figura 13) y se alinearon adecuadamente ambas, de tal modo que el lado pulido de cada placa de fibra óptica estuviera frente a la junta y dentro del borde de la junta. La muesca de la esquina de las placas de fibra óptica se alinea con la barrera de la esquina de la junta. Se colocó la primera abrazadera de PEEK para sujetar la junta y las dos placas de fibra óptica juntas verticalmente y se apretaron las placas juntas. Se apretó la abrazadera por debajo del centro del extremo largo de las placas de fibra óptica empezando desde el fondo. Se colocó la segunda abrazadera de PEEK. El "sándwich fijado" acabado se muestra en la figura 12. Las placas de fibra óptica sin grabar que quedaban se combinaron y se sujetaron con abrazaderas como se ha descrito previamente. A continuación, 12 sándwiches fijados se colocaron dentro de cada uno de los cuatro soportes de acero inoxidable. Una vez que la temperatura del HNO₃ alcanzó 55 °C, se puso en marcha el baño de ultrasonidos y se retiraron las tapas de los otros 3 depósitos de acero inoxidable. Se transfirieron los cuatro soportes de acero inoxidable que sujetaban las placas de fibra óptica dentro del ácido a 55 °C. Se mantuvieron las placas de fibra óptica en el baño de ácido a 55 °C. La velocidad de grabado químico de las placas de fibra óptica fue de aproximadamente 0,245 µm/minuto. El tiempo que las placas de fibra óptica permanecieron en el baño depende de la profundidad deseada de las cámaras de reacción. Por ejemplo, con un tiempo de grabado de 3 horas y 44 minutos, la profundidad de las cámaras de reacción resultó de 55 µm.

10 Las placas de fibra óptica grabadas (es decir, las placas de fibra óptica como tales) se sacaron del baño de ácido, se colocaron directamente en depósitos de acero inoxidable llenos con 1,0 litros de agua PicoPure y se sometieron a ultrasonidos durante 5 minutos. Se retiró el agua y los depósitos se volvieron a llenar con 1,0 l de agua PicoPure y se sometieron a ultrasonidos durante otros 5 minutos más. Se retiraron las placas de fibra óptica del agua de enjuague y se separaron las abrazaderas de PEEK y las juntas de cada pareja de placas de fibra óptica.

15 Para terminar los ensayos y pruebas posteriores al grabado, se volvieron a pesar las placas de fibra óptica señaladas y se registró la variación en el peso debida al grabado. Utilizando el microscopio, se contó el número de fibras individuales que tenían capacidad de transmisión óptica disminuida (la "cuenta de las fibras oscuras").

20 Se llevó a cabo un procedimiento de limpieza RER de cinco pasos utilizando el limpiador RCA y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ("el procedimiento de limpieza RER") en las placas de fibra óptica grabadas. "RCA" es una abreviatura para designar una disolución de hidróxido de amonio (NH₄OH) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para preparar el limpiador RCA, se juntaron 1,0 l de NH₄OH y 1,0 l de H₂O₂ en una campana de laboratorio y la disolución se mezcló removiendo con un agitador de barra magnético. Se colocaron noventa y seis (96) placas de fibra óptica del mismo lote en los estantes de vidrio.

Etapa 1: primer lavado con limpiador RCA

25 Se preparó limpiador RCA combinando en proporción 1:1 disoluciones de NH₄OH y de H₂O₂. Para las placas de fibra óptica de 25 x 75 mm, se añadieron 200 ml de limpiador RCA a cada uno de los recipientes de teñido de vidrio (Fischer Scientific, Pittsburg, PA, Estados Unidos). Para las placas de fibra óptica de 40 x 75 mm, se añadieron 200 ml de limpiador RCA a recipientes de teñido de polipropileno. Se colocaron seis recipientes de teñido en el depósito de un sistema giratorio Ocelot Rotator (Boekel Scientific, Feasterville, PA, Estados Unidos) y los otros recipientes se colocaron en otro sistema giratorio. Se fijó la velocidad de agitación en C. Después de 30 minutos, se retiró el limpiador RCA. Cada conjunto de 10 placas de fibra óptica se enjuagó 5 veces con 200 ml de agua PicoPure.

40 Etapa 2: primer lavado con EDTA

Se añadieron 200 ml de EDTA a cada recipiente de teñido. Se colocaron seis recipientes en el depósito de uno de los equipos giratorios y otros cuatro se colocaron en el depósito del otro sistema giratorio. Se fijó la velocidad de agitación en C. Después de 30 minutos, se retiró el EDTA. Cada conjunto de 10 placas de fibra óptica se enjuagó con 200 ml de agua PicoPure 5 veces.

45 Etapa 3: segundo lavado con limpiador RCA

Se preparó una disolución nueva de limpiador RCA (1:1 disoluciones de NH₄OH y de H₂O₂) y se añadieron 200 ml de limpiador RCA a cada uno de los recipientes de teñido. Seis recipientes se colocaron en el depósito de uno de los sistemas giratorios y los otros cuatro en el del otro sistema giratorio. Se fijó la velocidad de agitación en C. Después de 30 minutos, se retiró el limpiador RCA. Cada conjunto de 10 placas de fibra óptica se enjuagó con 200 ml de agua PicoPure 5 veces.

Etapa 4: segundo lavado con EDTA

50 Se añadieron 200 ml de EDTA a cada recipiente de teñido. Se colocaron seis recipientes en el depósito de uno de los equipos giratorios y otros cuatro se colocaron en el depósito del otro sistema giratorio. Se fijó la velocidad de agitación en C. Después de 30 minutos, se retiró el EDTA. Cada conjunto de 10 placas de fibra óptica se enjuagó con 200 ml de agua PicoPure 5 veces.

Etapa 5: sometiendo las placas de fibra óptica a ultrasonidos

Se cargó el recirculador Neslab con la cantidad apropiada de agua y se fijó la temperatura a 40 ° C con la temperatura de alarma inferior fijada a 5 ° C y la temperatura de alarma superior fijada a 100 °C. Se colocaron las placas de fibra óptica en un estante de acero inoxidable (de Fischer Scientific, Pittsburg, PA, Estados Unidos), poniendo las placas de fibra óptica separadas, en cada ranura, con el fin de que la disolución de limpieza pudiese fluir adecuadamente. Los estantes rellenos se colocaron dentro de una bandeja de polipropileno llena con una disolución Contrad® al 5 % de manera que la disolución cubriese completamente las placas de fibra óptica. La disolución Contrad® al 5 % se preparó mezclando 1000 ml de agua desionizada con 50 ml de Contrad® (Fisher Scientific). A continuación se taparon las bandejas con una cubierta de polietileno de alta densidad (HDPE). Cuando la temperatura del recirculador alcanzó 40 °C, se sumergieron en el agua dos bandejas de polipropileno que contenían las placas de fibra óptica. Las placas de fibra óptica se sometieron a tratamiento por ultrasonidos durante 90 minutos y luego se sacaron del equipo. Se sacaron los estantes de las bandejas y se extrajo la disolución de Contrad®. Se llenaron las bandejas de polipropileno con agua PicoPure. Los estantes de acero inoxidable se volvieron a colocar dentro de las bandejas y se enjuagaron las placas de fibra óptica dos veces. Se volvieron a llenar las bandejas por tercera vez con agua PicoPure y se llevaron al sistema giratorio Ocean Rotator y se movieron a la velocidad C. Después de 5 minutos, se enjuagaron las placas de fibra óptica 2 veces. Se cubrieron las placas de fibra óptica con papel de aluminio y se dejaron secar en los soportes de acero inoxidable.

Ejemplo 2: recubrimiento de placas de fibra óptica por el método de deposición asistida por iones

Inmediatamente antes de aplicar el recubrimiento de película delgada, se limpiaron las placas de fibra óptica. El detergente que se usó fue Contrad®. El equipo de ultrasonidos Branson se reguló a 40 °C. Se colocaron, con sus partes posteriores en contacto, dos placas de fibra óptica en un tubo Falcon o tubo de centrifuga y se añadieron 40-45 ml de disolución al 5 % de Contrad® en el tubo, que se cerró con su tapa. Se cargó el tubo en el equipo de ultrasonidos y se sometió a tratamiento durante 90 minutos. Se sacaron las placas de fibra óptica del tubo, se enjuagaron a fondo con agua desionizada nueva y se pasaron a un tubo Falcon nuevo que se relleno con agua desionizada. Se eliminó la disolución de detergente por el desagüe y se mantuvieron las placas de fibra óptica en agua desionizada a 4 °C.

Después de la limpieza, se llevó a cabo el proceso de recubrimiento por deposición asistida por iones de una placa de fibra óptica grabada químicamente con un recubrimiento de película delgada de SiO₂. La placa de fibra óptica que se iba a recubrir se colocó en un soporte aislado eléctricamente en una cámara de vacío junto con un blanco de silicio calentado y aislado eléctricamente, una fuente de plasma de argón y una fuente de oxígeno. Se encendió la fuente de plasma de argón, la cual generó una carga global negativa en la placa de fibra óptica. Se produjo vapor de silicio por evaporación del blanco calentado que reaccionó con el plasma de argón y con el oxígeno para formar SiO₂ cargado positivamente. El SiO₂ fue atraído por la placa de fibra óptica cargada negativamente, donde se condensó energéticamente, formando una película vítrea, no estructurada, de SiO₂. La morfología y la homogeneidad de la película son una función compleja de muchas variables del proceso, pero el espesor de la película se controló de manera precisa mediante el tiempo de exposición en la cámara. Véanse las figuras 1 y 2.

Ejemplo 3: exposición de una placa de fibra óptica recubierta con película transparente a condiciones PCR simuladas

Se ensayaron placas de fibra óptica grabadas al ácido y recubiertas con películas delgadas transparentes para probar su robustez medioambiental, exponiendo la placa de fibra óptica grabada y recubierta con SiO₂ a agua desionizada a ciertas temperaturas (que simularan la exposición térmica PCR) y se examinaron las imágenes SEM (de microscopía electrónica de barrido) tanto de las superficies como de secciones transversales en busca de daños en el recubrimiento, según el siguiente procedimiento. Se preparó un mililitro de tampón PCR 1xHiFi (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se colocó la placa de fibra óptica grabada y recubierta de película delgada sobre la parte superior de los tejidos y, utilizando una espátula para células se eliminó el exceso de agua. Rápidamente, se añadieron 400 µl de la disolución tampón sobre la parte superior de la superficie de la placa de fibra óptica y se extendió de manera uniforme la disolución con una espátula para células. Tras un minuto, se eliminó el exceso de disolución. Se repitió el procedimiento de añadir 400 µl de la disolución tampón seguido de eliminar la disolución. La placa de fibra óptica se colocó inmediatamente en un dispositivo de amplificación de diseño interno ("la plantilla AMP") (454 Life Sciences, Brandford CT, Estados Unidos), se cubrió con una placa de caucho de silicona y con espuma y se apretaron los tornillos de la plantilla AMP como se describe en Leamon et al., Electrophoresis 24: 3769-3777 (2003). La plantilla AMP se cargó en un Thermocycler MJ PTC 225 Tetrad (MJ Research, Waltham, MA, Estados Unidos) y se puso en marcha el programa de ciclos térmicos. Los detalles del perfil de temperatura son los siguientes: tiempo total de funcionamiento: 4,5 horas; 1) 40 ciclos cortos: 94 °C: 15 segundos; 58°C: 15 segundos; 68 °C: 15 segundos; 2)10 ciclos largos adicionales: 95 °C: 30 segundos; 58 °C: 10 minutos. El procedimiento se repitió durante un total de 80 ciclos. Después de este proceso, la superficie de la placa de fibra óptica se enjuagó con agua nueva. Se secó la superficie con flujo de nitrógeno y se midió el recubrimiento de SiO₂ mediante microscopía óptica y análisis SEM. Puesto que el análisis SEM es una técnica destructiva, no se pudieron llevar a cabo análisis de "antes" y "después" de las mismas placas de fibra óptica grabadas y con película delgada. No obstante, ninguna de las placas de fibra óptica grabadas y con películas delgadas examinadas por SEM después del procedimiento de "simulación de PCR" mostró daño aparente en su recubrimiento de SiO₂.

Ejemplo 4: evaluación del ruido de fondo de la secuenciación inducida por PCR

Se cargó una jeringa LuerLock® de 1 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) con 525 µl de disolución PCR (tampón 1xPlatinum HiFi, Invitrogen, Carlsbad, CA), 2,5 mM de MgSO₄, 0,5 % de BSA y 1 mM de dNTPs (MBI Fermentas, Hanover, MD, Estados Unidos) y la aguja de la jeringa se conectó a un dispositivo cargador de diseño propio (“el soporte de carga”) (454 Life Sciences, Brandford CT, Estados Unidos). Aquí dNTP se refiere a los 4 desoxinucleotido-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Se retiró un placa de fibra óptica grabada al ácido y recubierta con SiO₂ de un baño de agua desionizada, se colocó en la mesa de trabajo del laboratorio y utilizando una espátula para células, se eliminó de la superficie de la placa de fibra óptica el exceso de agua. Rápidamente se montó la placa de fibra óptica en el soporte de carga con cuatro clips de plástico. se llenó la cámara de fluido hasta arriba con disolución PCR empujando la jeringa hacia delante. Después de 3 minutos, la disolución se había difundido en las cámaras de reacción. Se retrajo el émbolo y se desmontó el soporte de carga. Se colocó inmediatamente la placa de fibra óptica en un soporte AMP y se cubrió con una placa de caucho de silicona y espuma. Se colocaron en su sitio los tornillos del soporte y se apretaron. El montaje del soporte se cargó en el Thermocycler y se puso en marcha el programa de ciclos térmicos. Los detalles del perfil de temperatura son los siguientes: tiempo total de funcionamiento: 4,5 horas; 1) 40 ciclos cortos: 94 °C: 15 segundos; 58°C: 15 segundos; 68 °C: 15 segundos; 2)10 ciclos largos adicionales: 95 °C: 30 segundos; 58 °C: 10 minutos.

Después de los ciclos térmicos, se abrió el soporte AMP, se retiró la placa de fibra óptica y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) que contenía 50 ml de agua desionizada. Luego el tubo se colocó en un Clay Adams® Nutator Mixer y se sometió a nutación durante 20 minutos para disolver el producto PCR. La nutación es un movimiento orbital suave que puede asegurar un mezclado uniforme sin que se produzca espuma. Se trasladó la placa de fibra óptica a 50 ml de tampón de ensayo AB (por sus siglas en inglés) con albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés). La AB es un disolución tampón que contiene tricina y acetato de magnesio. Se recogió la disolución resultante para el análisis de secuenciación PCR descrito en el ejemplo siguiente (ejemplo 5).

La mezcla de perlas se preparó (perlas Bangs de 175 µl + perlas Dynal de 175 µl) y se diluyó con 700 µl de agua desionizada. Las perlas Bangs son microesferas que llevan enzimas sulfurilasa y luciferasa inmovilizadas y las perlas Dynal son perlas magnéticas que portan las enzimas enlazadas a la luciferasa y sulfurilasa. Se usaron noventa tiras adhesivas (3M VHS, St Paul, MN, Estados Unidos) que contenían 13,2 µl de mezcla de perlas cada una de ellas, para sellar los agujeros de entrada. Se centrifugó entonces la placa de fibra óptica utilizando una centrifuga Allegra 6R (Beckman Coulter, Fullerton, CA, Estados Unidos) durante 8 minutos a 2000 rpm. Se llevó a cabo el ensayo de fondo y el tiempo total fue de 24 minutos: 1) lavado 5 minutos; 2) PPI 2 minutos; 3) lavado 10 minutos; 4) PPI 2 minutos y 5) lavado 5 minutos. Después del ensayo, se realizó un análisis de trazas utilizando software Kangaroo (454 Life Sciences, Brandford CT, Estados Unidos). Se obtuvieron los datos de cuentas ajustados restando 500 de los datos brutos. Se repitió el procedimiento completo tanto para placas de fibra óptica recubiertas con SiO₂ como no recubiertas, para comparaciones del ruido de fondo.

Ejemplo 5: resultados de secuenciación PCR

Para validación de los resultados PCR se emparejaron placas de fibra óptica recubiertas con SiO₂ con placas no recubiertas y se ensayaron simultáneamente, utilizando la disolución recogida para su análisis en el ejemplo 4. Cada disolución (tanto para matrices recubiertas con SiO₂ como no recubiertas) se dobló por dilución con agua desionizada. Luego, el producto PCR en cada una se cuantificó utilizando una unidad iCycler® RealTime PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Se determinó la cantidad de producto amplificada utilizando medidas de fluorescencia. Finalmente, se calculó el número de moléculas por cámara de reacción. El intervalo normal del número es del orden de 10³-10⁹. Los resultados se muestran en la tabla 2 que va a continuación y están en el intervalo 10⁶-10⁸, lo que es aceptable. Todas las placas de fibra óptica recubiertas con SiO₂ produjeron el mismo nivel de producto PCR que las placas de fibra óptica sin recubrir.

Tabla 2: resultados PCR en las cámaras de reacción

Sin recubrir (control)		Recubiertas con SiO ₂	
Número de la placa de fibra óptica	Moléculas / cámara de reacción	Número de la placa de fibra óptica	Moléculas / cámara de reacción
Placa nº 1	8,21 x 10 ⁷	Placa nº 3	1,70 x 10 ⁸
Placa nº 2	1,10 x 10 ⁸	Placa nº 4	3,98 x 10 ⁷
		Placa nº 5	1,70 x 10 ⁸
		Placa nº 6	4,40 x 10 ⁷
		Placa nº 7	8,16 x 10 ⁷

		Placa nº 8	6,04 x 10 ⁶
--	--	------------	------------------------

Ejemplo 6: comparación del perfil de intensidades de luz en cámaras de reacción adyacentes

Se preparó una matriz de placa de fibra óptica (40 x 75 mm) en la que la primera mitad de la matriz se recubrió con dos recubrimientos, un recubrimiento transparente y un recubrimiento no transparente y la segunda parte de la matriz se recubrió solo con un recubrimiento transparente. Se llevaron a cabo reacciones de secuenciación de ADN en cámaras de reacción de ambas mitades de la matriz y se compararon las intensidades luminosas generadas.

Se aplicó un recubrimiento de aluminio metálico, no transparente a la primera mitad de la matriz y luego un recubrimiento transparente de SiO₂ se aplicó encima del recubrimiento de aluminio a la primera mitad de la matriz. El recubrimiento de aluminio se aplicó a la superficie superior de la matriz y a la pared lateral de las cámaras de reacción y se aplicó parcialmente al área de la esquina de las cámaras de reacción, de tal modo que el diámetro del orificio formado por el recubrimiento de metal cerca del centro del fondo era de 28,77 micrómetros. El espesor del recubrimiento de aluminio medido sobre la superficie superior de la matriz era de 200 nm. Mientras se estaba aplicando el recubrimiento metálico, la segunda mitad de la matriz se protegió con una máscara de sombra. Después de aplicar el recubrimiento metálico, se aplicó el recubrimiento transparente de SiO₂ sobre la superficie superior de la matriz y el fondo y las paredes laterales de las cámaras de reacción de la primera y segunda mitades de la matriz.

Se llevó a cabo el análisis de secuenciación por pirofosfato (pirosecuenciación) de ácidos nucleicos amplificados por PCR según se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos número 10/767.779 en cámaras de reacción localizadas en ambas mitades de la matriz. Las figuras 24a y 24b muestran los resultados de estos experimentos.

En la figura 24a, las dos flechas indican los puntos centrales de dos cámaras de reacción adyacentes localizadas sobre la segunda parte de la matriz. Los puntos centrales de estas dos cámaras adyacentes están en el píxel número 5 y en el píxel número 2, respectivamente. Una cámara de reacción (píxel número 5) contiene el fragmento de ensayo 10 ADN ("TF10") y la otra cámara (píxel número 2) contiene el fragmento de ensayo 12 ADN ("TF12"). El proceso de secuenciación se llevó a cabo a un orden de flujo de nucleótidos de 43. El orden de flujo de nucleótidos se define como una inyección de nucleótidos específica en una corriente de una disolución que pasa a través de una máquina de secuenciación de ADN (por ejemplo un secuenciador 454 Sequencer 1.0). Durante el proceso de secuenciación del ADN, se inyectan una serie de disoluciones específicas de nucleótidos en la corriente de la disolución general y cada inyección tiene un número de flujo dado. A un orden de flujos de nucleótidos de 43, la muestra de ADN TF10 experimentó 5 incorporaciones de ADN múltiples y produjo una luz de alta intensidad en la cámara. Al mismo orden de flujo de nucleótidos, la muestra de ADN TF12 no experimentó incorporación de ADN y no produjo luz de alta intensidad.

La curva 1 muestra el perfil de seis píxeles (números 1 a 6) que cruzan los puntos centrales de las dos cámaras adyacentes recubiertas con SiO₂. Por ejemplo, el píxel número 1 es el primer píxel que está compensado un píxel desde el centro de la cámara TF12 en la dirección de corriente arriba; el píxel número 2 es un píxel a la derecha después del píxel número 1 en la dirección corriente abajo. Desde el píxel número 1 al píxel número 6 se puede dibujar un camino de barrido que pasa por los puntos centrales de dos cámaras (TF10 y TF12) en la dirección corriente abajo. El píxel número 3 se localiza dentro de la cámara TF12 y, en teoría, no debería dar ninguna señal porque no hay incorporación de ADN en esa cámara. Sin embargo, se observó un aumento en la intensidad de luz en el píxel número 3 en la cámara TF12 debido al drenaje de fotones de luz desde la cámara adyacente TF10 a la cámara TF12.

Para comparación, se llevaron a cabo reacciones de secuenciación en dos cámaras recubiertas con metal, de la primera mitad de la matriz recubierta con metal, que contenían los mismos fragmentos de ADN TF10 y TF12, uno en cada cámara y se realizó el proceso de secuenciación al mismo orden de flujo de nucleótidos de 43. La señal observada en el píxel número 3 en las cámaras recubiertas con metal, como se muestra en la curva 3, es más pequeña no linealmente que la señal medida en las cámaras recubiertas con SiO₂ de la primera mitad de la matriz, lo que indica que las paredes laterales opacas recubiertas con metal reducen el drenado óptico de fotones entre dos cámaras adyacentes recubiertas con una capa metálica.

La figura 24b muestra los resultados del mismo experimento, pero las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo a un orden de flujo de nucleótidos de 35. A este orden de flujo de nucleótidos, TF10 experimentó 4 incorporaciones de ADN y de nuevo en el píxel número 3 hay una señal menos intensa debido a la disminución del drenaje óptico sobre la primera mitad recubierta con metal comparada con la segunda mitad de la matriz.

Ejemplo 7: Matriz de micropocillos o microcubetas recubierta con película delgada de SiO₂

En una realización, la matriz se fabrica con una placa de fibra óptica comercial (Incom, Charlton, MA, Estados Unidos) que se ha grabado químicamente por un solo lado para obtener las cámaras de reacción individuales. Cada cámara de reacción formada por grabado químico tiene un volumen de aproximadamente 75 pl. La placa de fibra óptica se limpia antes de recubrirla con una película delgada. El recubrimiento de película delgada preferido es el óxido no metálico SiO₂ con un espesor que mide entre 0,1 y 5,0 micrómetros. El recubrimiento de SiO₂ es ópticamente transparente e impermeable al agua. El recubrimiento de película delgada se aplica utilizando el método

de deposición en fase de vapor asistida por iones. El uso de las cámaras de reacción recubiertas con película delgada sirve a varios objetivos: i) retrasar la difusión de la luminiscencia de la luz emitida en una zona diferente de la matriz; ii) aislar las cámaras de reacción que contienen componentes de la disolución de ensayo o de la mezcla de reacción y protegerlas de cualquier efecto perjudicial del material del sustrato de la matriz; iii) prevenir cualquier lixiviación de los materiales del sustrato en la cámara de la disolución y iv) proporcionar un acoplamiento óptico muy eficaz, de apertura numérica alta, con el CCD. Finalmente, cuanto mayor es la cantidad de reactivo, (por ejemplo, plantilla de secuenciación inmovilizada), o de analito dentro de una mezcla de reacción o una disolución de ensayo, más señal óptica se puede obtener.

Ejemplo 8: Matriz de microcubetas recubierta con película delgada metálica

10 La matriz se fabrica con una placa de fibra óptica comercial (Incom, Charlton, MA, Estados Unidos) que se ha grabado químicamente por un solo lado para obtener las cámaras de reacción individuales. Sustancialmente todas las cámaras de reacción formadas en el proceso de grabado químico tienen un volumen de aproximadamente 75 pl y una profundidad de 50-55 μm . Se limpia la placa de fibra óptica antes de recubrirla con un recubrimiento de película delgada no transparente. El recubrimiento de película delgada no transparente es cromo con un espesor que mide aproximadamente 200-300 nm sobre la superficie superior de la matriz y 60-120 nm sobre las paredes laterales y no menos de 50 nm sobre el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción. El recubrimiento es opaco. El recubrimiento de película delgada se aplica utilizando un método de deposición asistida por iones. El uso de cámaras de reacción recubiertas con una película delgada opaca, sobre la superficie de una placa de fibra óptica, proporciona una matriz con varias ventajas. Se eliminan problemas ópticos como el drenaje óptico, la dispersión de la luz y la interferencia entre cámaras de reacción vecinas y la luz se concentra. La eficiencia en la carga de las perlas se maximiza hasta cerca del 100 %.

Ejemplo 9: Matriz de microcubetas recubierta con película delgada metálica de SiO_2 y de metal

El equipo de la matriz para secuenciar ácidos nucleicos está fabricado a partir de una placa de fibra óptica comercial (Incom, Charlton, MA, Estados Unidos) que se ha grabado químicamente por un solo lado para obtener las cámaras de reacción individuales. El equipo usado para grabar una placa de fibra óptica incluye dos abrazaderas de PEEK y una junta de grabado de silicona. Sustancialmente todas las cámaras de reacción formadas en el proceso de grabado tienen un volumen de aproximadamente 75 pl y una profundidad entre 50 y 55 μm . Se limpia la placa de fibra óptica antes de recubrirla con un recubrimiento de película delgada no transparente. El recubrimiento de película delgada no transparente es cromo con un espesor que mide aproximadamente 200-300 nm sobre la superficie superior de la matriz, 60-120 nm sobre las paredes laterales y no menos de 50 nm sobre el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción. El recubrimiento es opaco. El recubrimiento de película delgada se aplica utilizando un método de deposición asistida por iones. Después de que se ha aplicado el recubrimiento de película delgada no transparente, se aplica un recubrimiento de película delgada transparente. El recubrimiento de película delgada transparente es SiO_2 con un espesor que mide aproximadamente 200-400 nm sobre la superficie superior de la matriz, 50-100 nm sobre las paredes laterales y no menos de 50 nm sobre el área de la esquina de sustancialmente todas las cámaras de reacción. Una matriz con cámaras de reacción recubiertas con un primer recubrimiento de película delgada no transparente y un segundo recubrimiento de película delgada transparente proporciona una matriz con varias ventajas. Se eliminan problemas ópticos como el drenaje óptico, la dispersión de la luz y la interferencia entre cámaras de reacción vecinas y el recubrimiento transparente de SiO_2 aplicado encima del recubrimiento no transparente protege también el recubrimiento de cromo de la erosión.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo en forma de matriz que comprende:
un sustrato de placa de fibra óptica que incluye una superficie plana superior o de arriba que incluye numerosas cámaras de reacción grabadas químicamente y una superficie inferior o del fondo pulida, ópticamente conductora y plana;
en el que cada cámara de reacción incluye una superficie interior del fondo y una superficie interior de la pared lateral;
en el que al menos la superficie interior de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior están recubiertas con un recubrimiento de película delgada transparente, el cual es ópticamente transparente, tiene un espesor de 0,1 a 5 micrómetros y es impermeable al agua,
caracterizado porque:
la superficie superior y la superficie interior de la pared lateral de sustancialmente todas las cámaras de reacción no tienen un recubrimiento no transparente, de modo que el recubrimiento no transparente es opaco y de modo que el recubrimiento no transparente se coloca por debajo del recubrimiento transparente.
2. La matriz de la reivindicación 1, en la que el recubrimiento transparente es dióxido de silicio.
3. La matriz de la reivindicación 1, en la que el espesor del recubrimiento transparente no es uniforme y es aproximadamente de 200-400 nm sobre la superficie superior, de 50-100 nm sobre las paredes laterales y, cuando existe, de 100-300 nm sobre el fondo.
4. La matriz de la reivindicación 1, en la que el espesor del recubrimiento no transparente es aproximadamente de 200-300 nm sobre la superficie superior, 60-120 nm sobre las paredes laterales y no menos de 50 nm sobre el área de la esquina, donde el área de la esquina está comprendida en la unión del fondo y de las paredes laterales de la cámara de reacción.
5. La matriz de la reivindicación 1, en la que el recubrimiento no transparente se escoge entre un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y un óxido no metálico.
6. La matriz de la reivindicación 5, en la que el compuesto inorgánico es un metal.
7. La matriz de la reivindicación 6, en la que el metal se escoge entre cromo, oro, plata, titanio, platino y aluminio.
8. La matriz de la reivindicación 7, en la que el metal es titanio.
9. La matriz de la reivindicación 1, en la que la superficie interior del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior están recubiertas con el recubrimiento transparente.
10. La matriz de la reivindicación 1, en la que cada una de las superficies interior de las paredes laterales e interior del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción y la superficie superior están recubiertas con el recubrimiento transparente.
11. La matriz de la reivindicación 1, en la que la superficie interior del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción está recubierta parcialmente con el recubrimiento no transparente, de tal forma que el recubrimiento no transparente cubre una área de esquina formada en la unión entre la superficie interior del fondo y la superficie interior de las paredes laterales de la cámara de reacción y está ausente del centro de la superficie interior del fondo de la cámara de reacción la cual forma una abertura cerca del centro de la superficie interior del fondo.
12. La matriz de la reivindicación 11, en la que el diámetro de la abertura es 28 micrómetros y un anillo formado alrededor del orificio por el recubrimiento no transparente tiene una anchura de 8,5 micrómetros.
13. La matriz de la reivindicación 1, en la que la superficie superior y la superficie interior del fondo de sustancialmente todas las cámaras de reacción se recubren con el recubrimiento transparente.
14. La matriz de la reivindicación 1, en la que el recubrimiento transparente incluye al menos un primer y un segundo recubrimientos transparentes.
15. La matriz de la reivindicación 1, en la que el recubrimiento no transparente incluye al menos un primer y un segundo recubrimientos no transparentes.
16. La matriz de la reivindicación 1, en la que se inmoviliza una enzima sobre el recubrimiento transparente.

17. La matriz de la reivindicación 1, en la que el número de cámaras de reacción es mayor de 10.000.
18. La matriz de la reivindicación 1, en la que la distancia entre la superficie que incluye las cámaras de reacción y la superficie pulida es no mayor de 5 mm.

Figura 1: Microscopías electrónicas de barrido (SEM) de placas de fibra óptica recubiertas

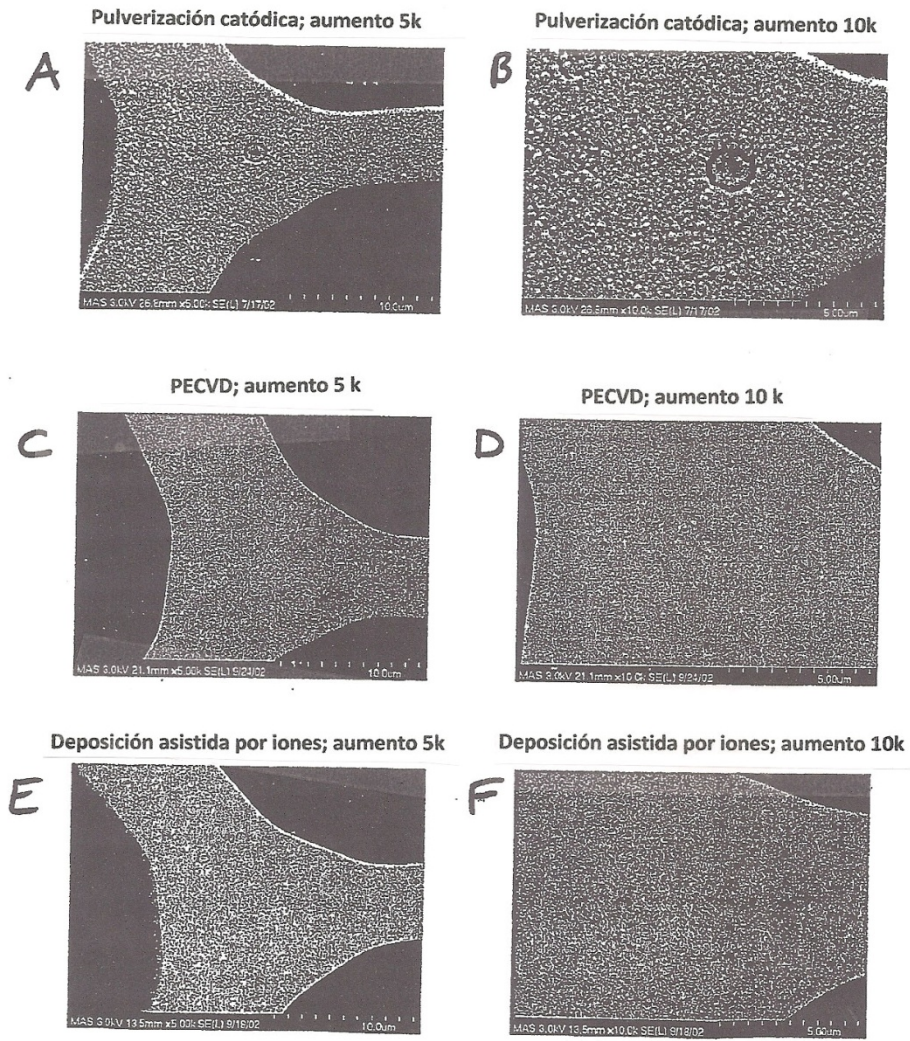


Figura 2: Microscopías electrónicas de barrido (SEM) de secciones transversales de placas de fibra óptica recubiertas

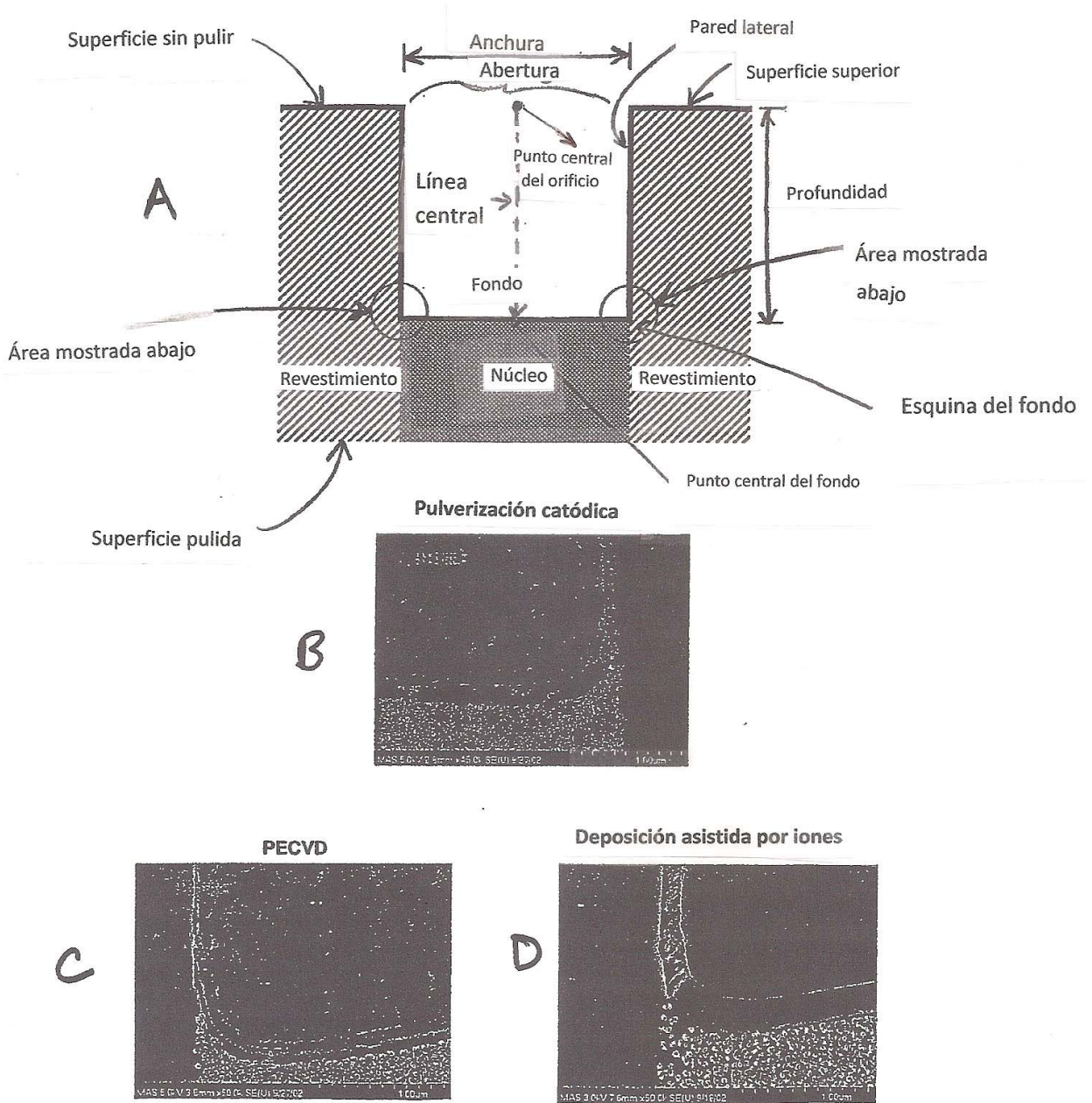


Figura 3: Diagrama esquemático del procedimiento de deposición asistida por iones

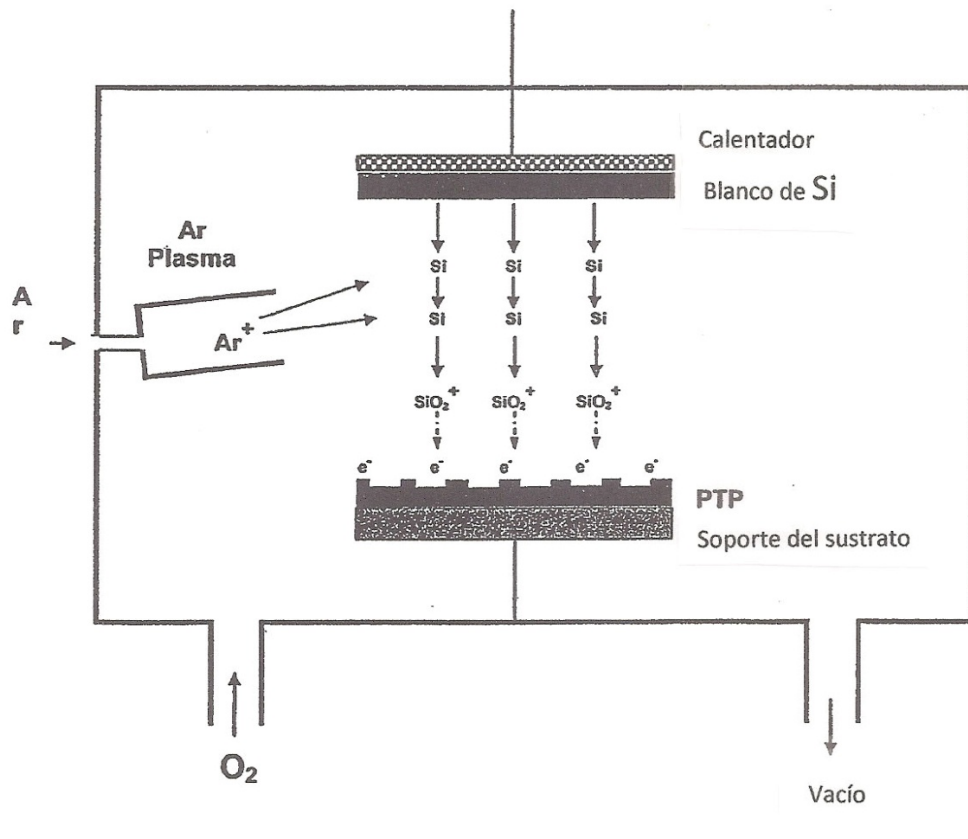


Figura 4: Ruido de fondo en secuenciación inducida por PCR de placas de fibra óptica recubiertas con SiO₂ y sin recubrir

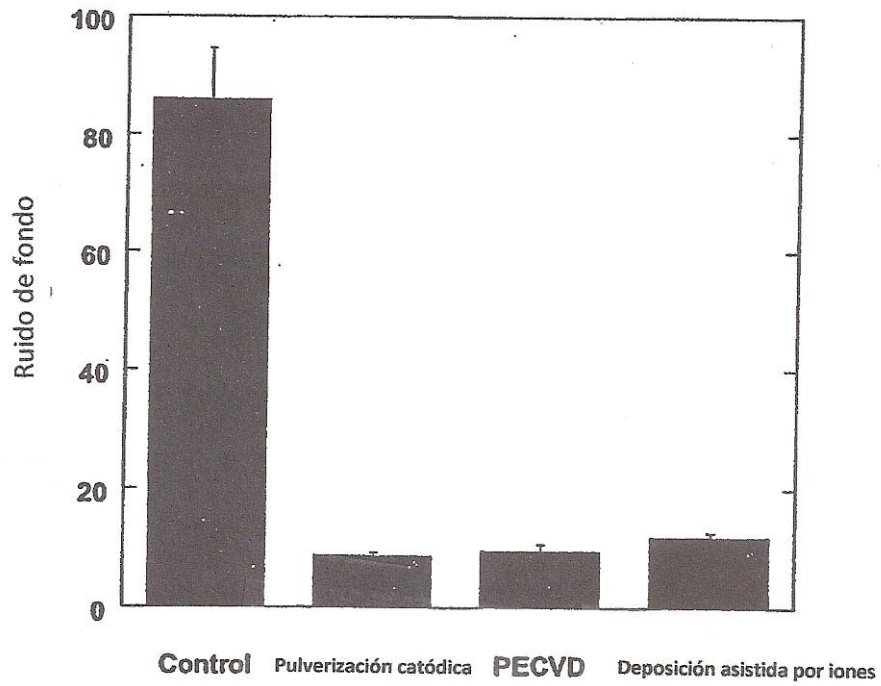


Figura 5: Métricas de rendimiento en la secuenciación de placas de fibra óptica recubiertas con SiO₂ y sin recubrir

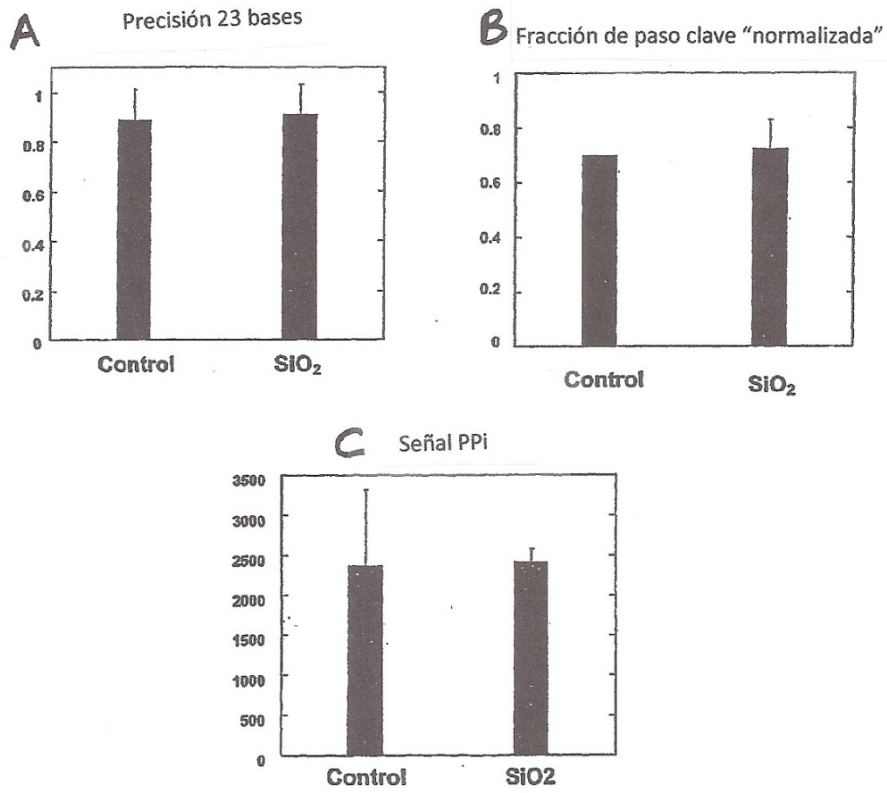
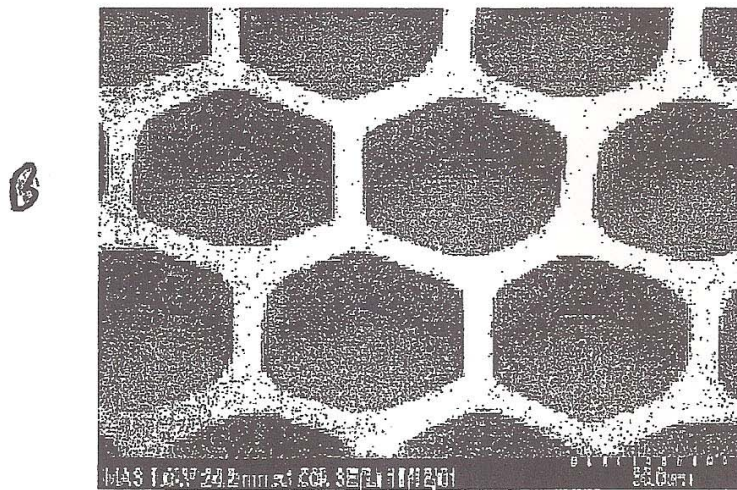
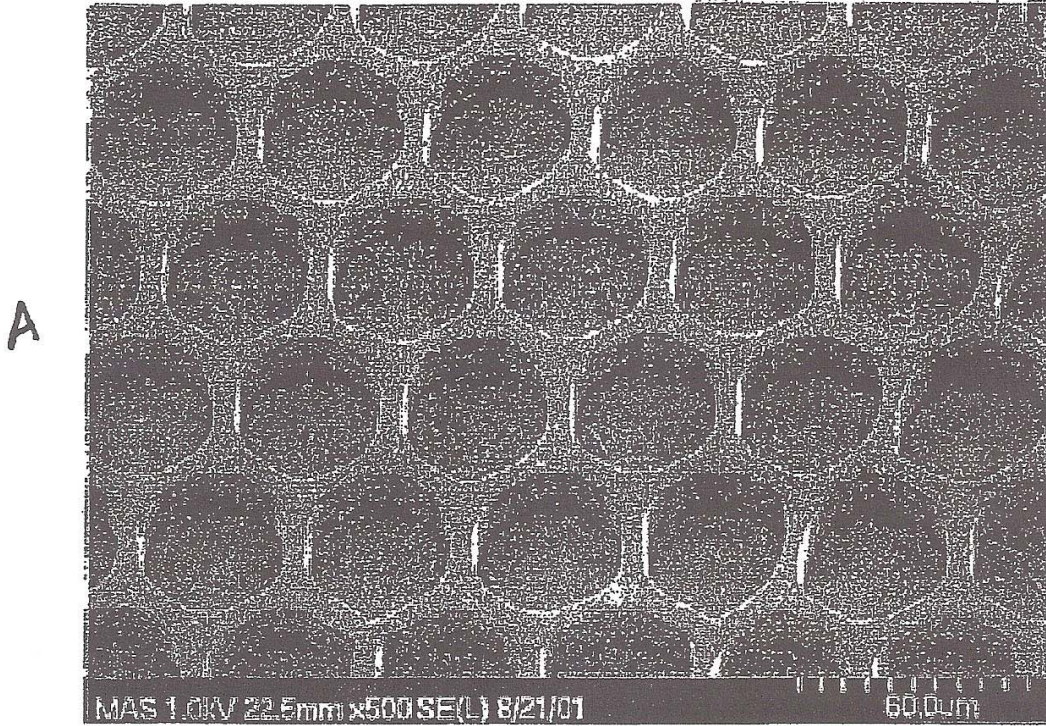


Figura 6



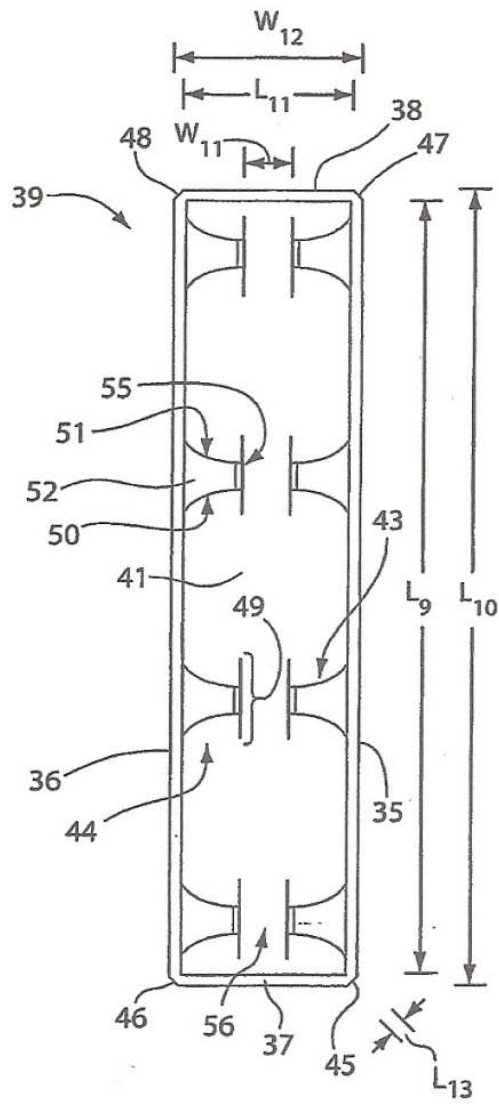


Fig. 7a

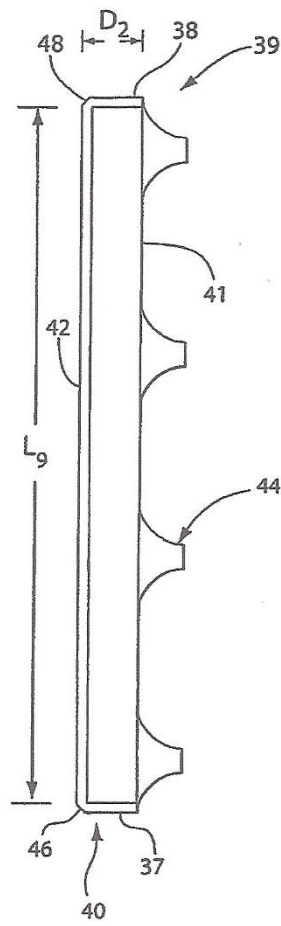


Fig. 7b

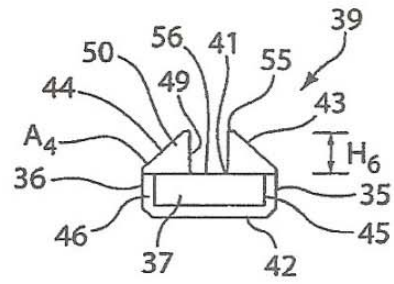


Fig. 7c

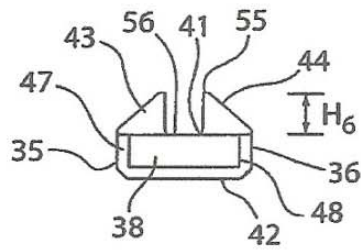


Fig. 7d

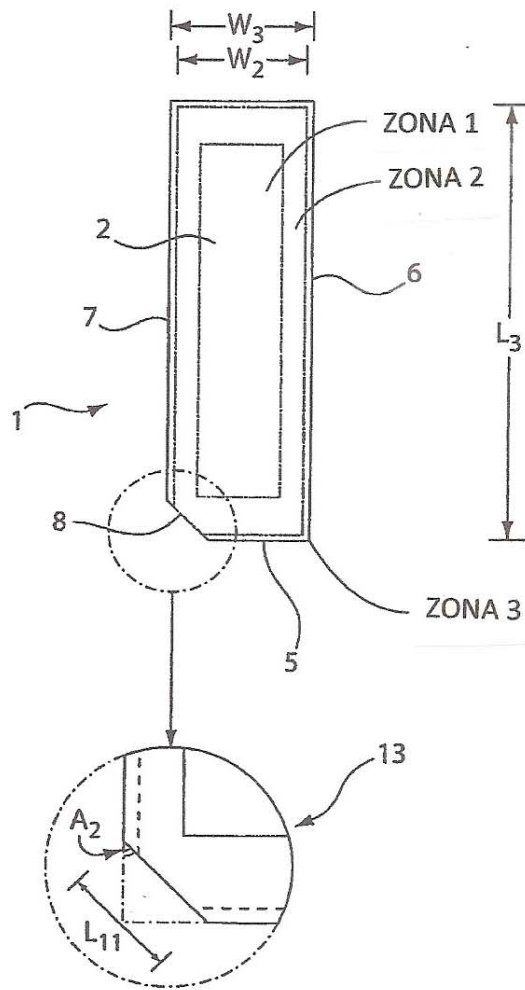


Fig. 8a

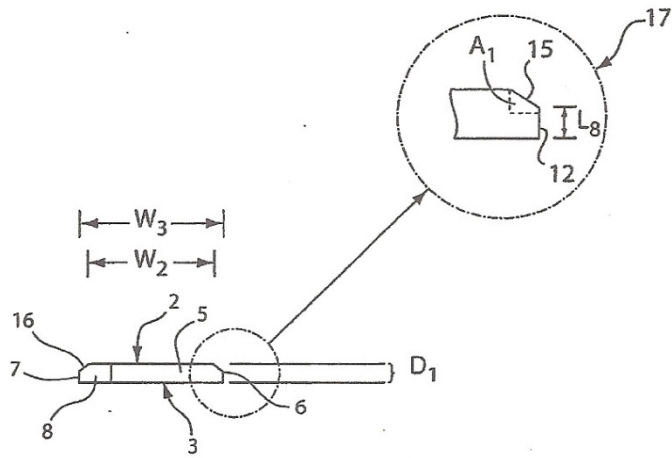


Fig. 8b

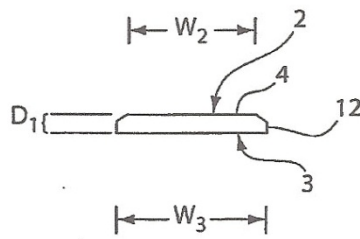


Fig. 8c

Figura 9

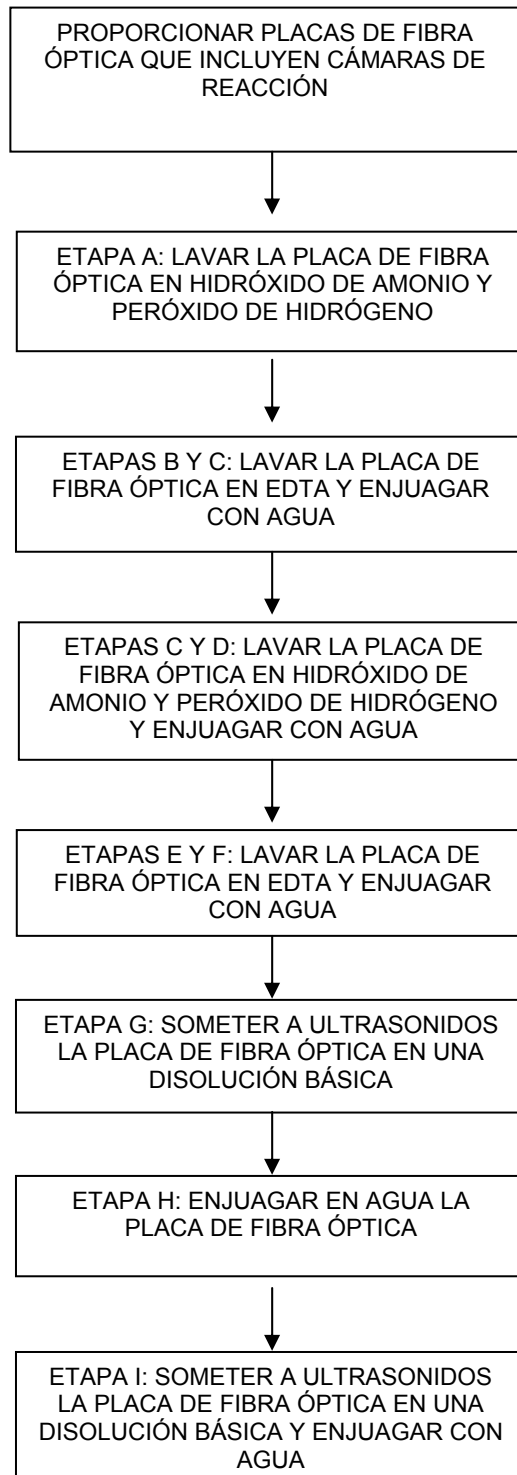
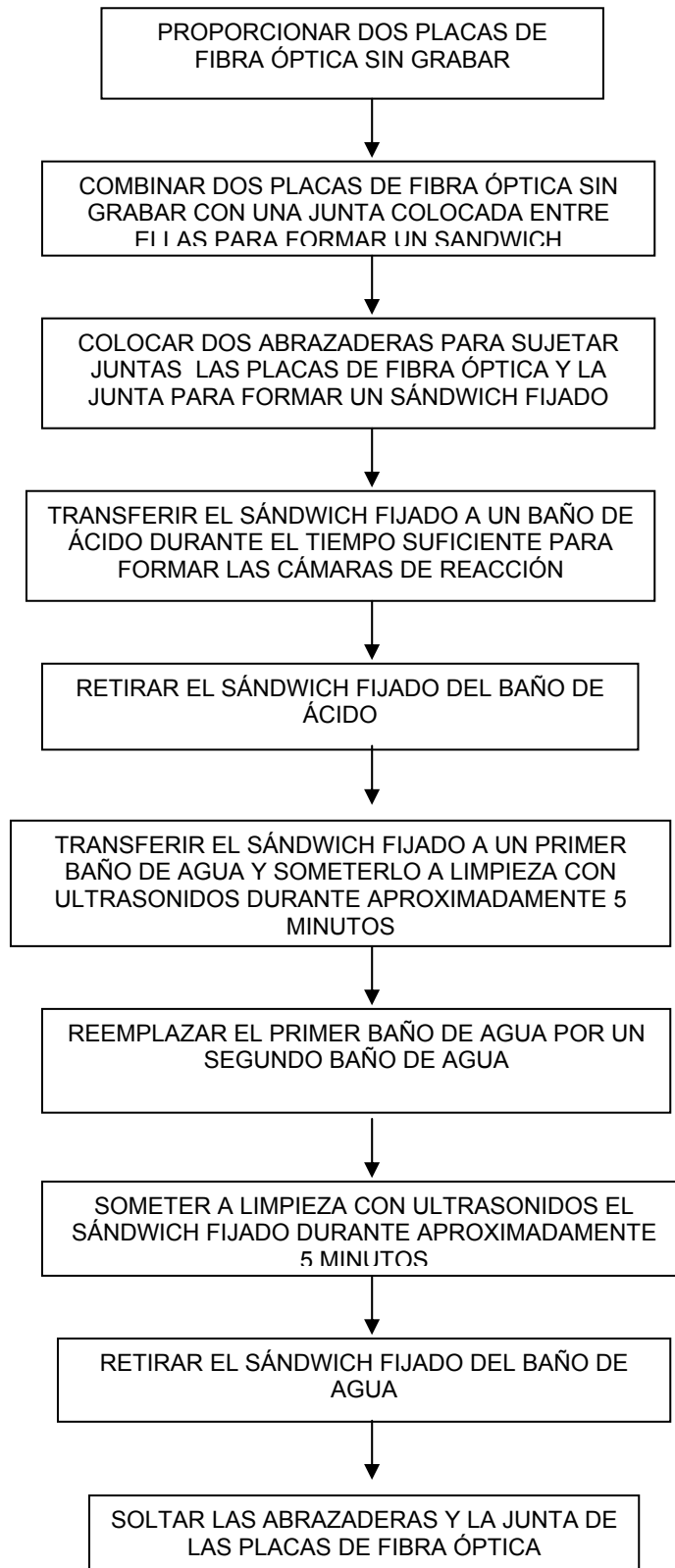


Figura 10



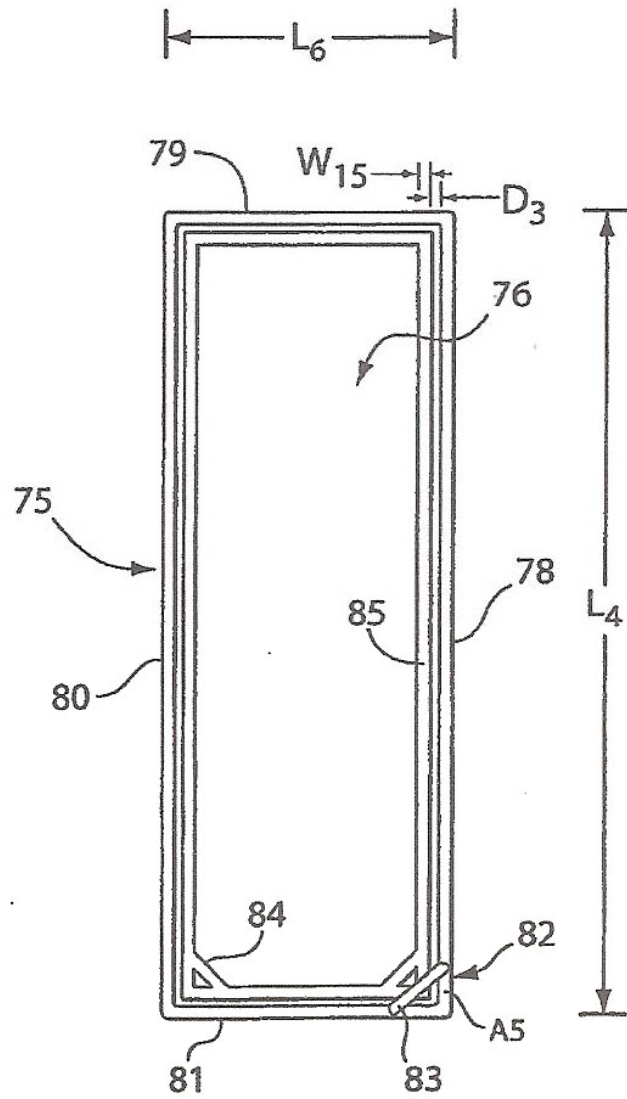


Fig. 11a

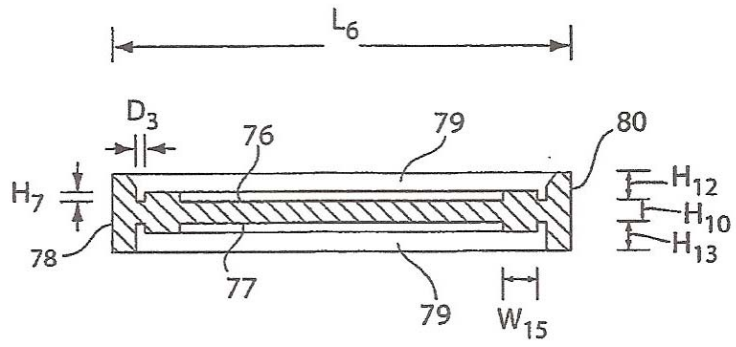


Fig. 11b

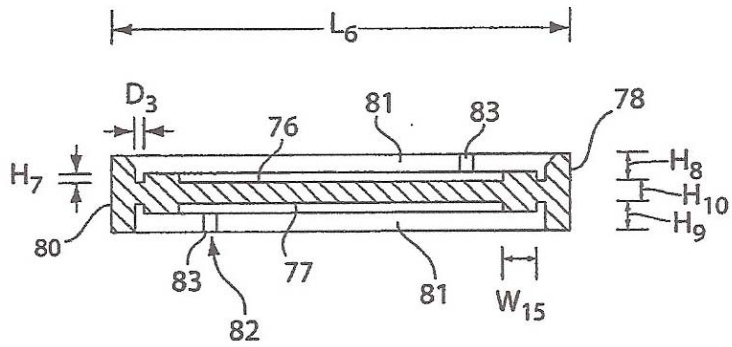


Fig. 11c

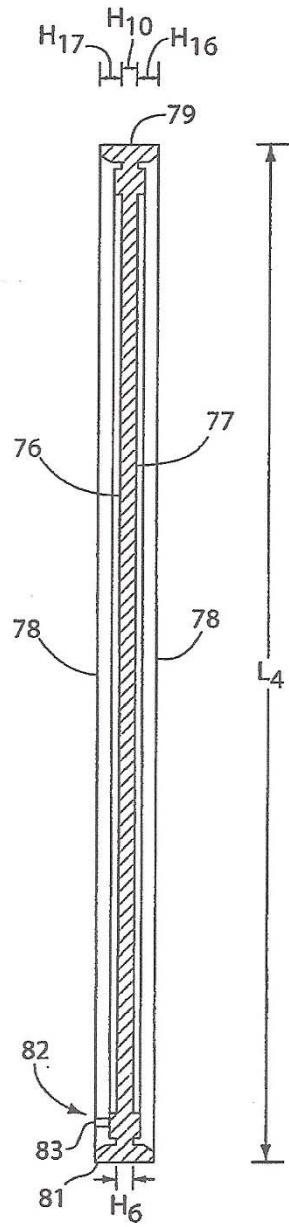


Fig. 11d

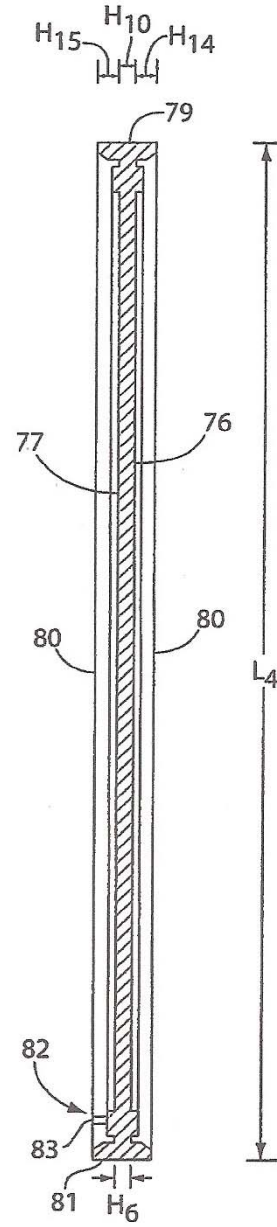


Fig. 11e

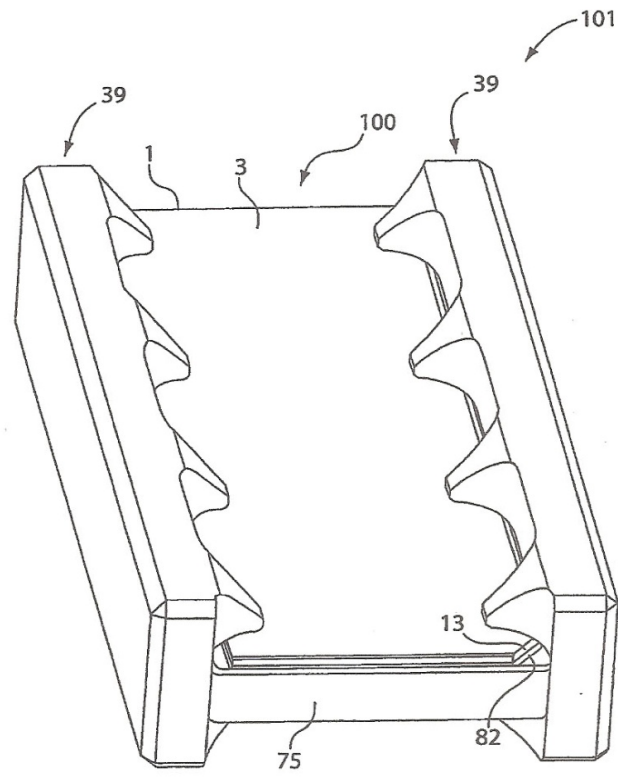


Fig. 12

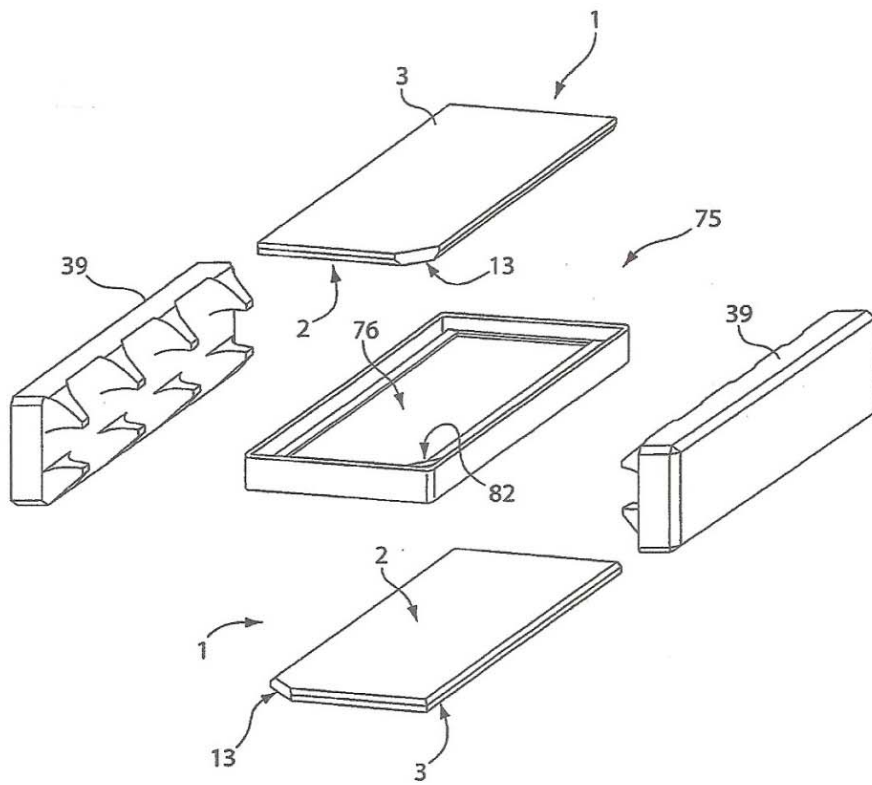


Fig. 13

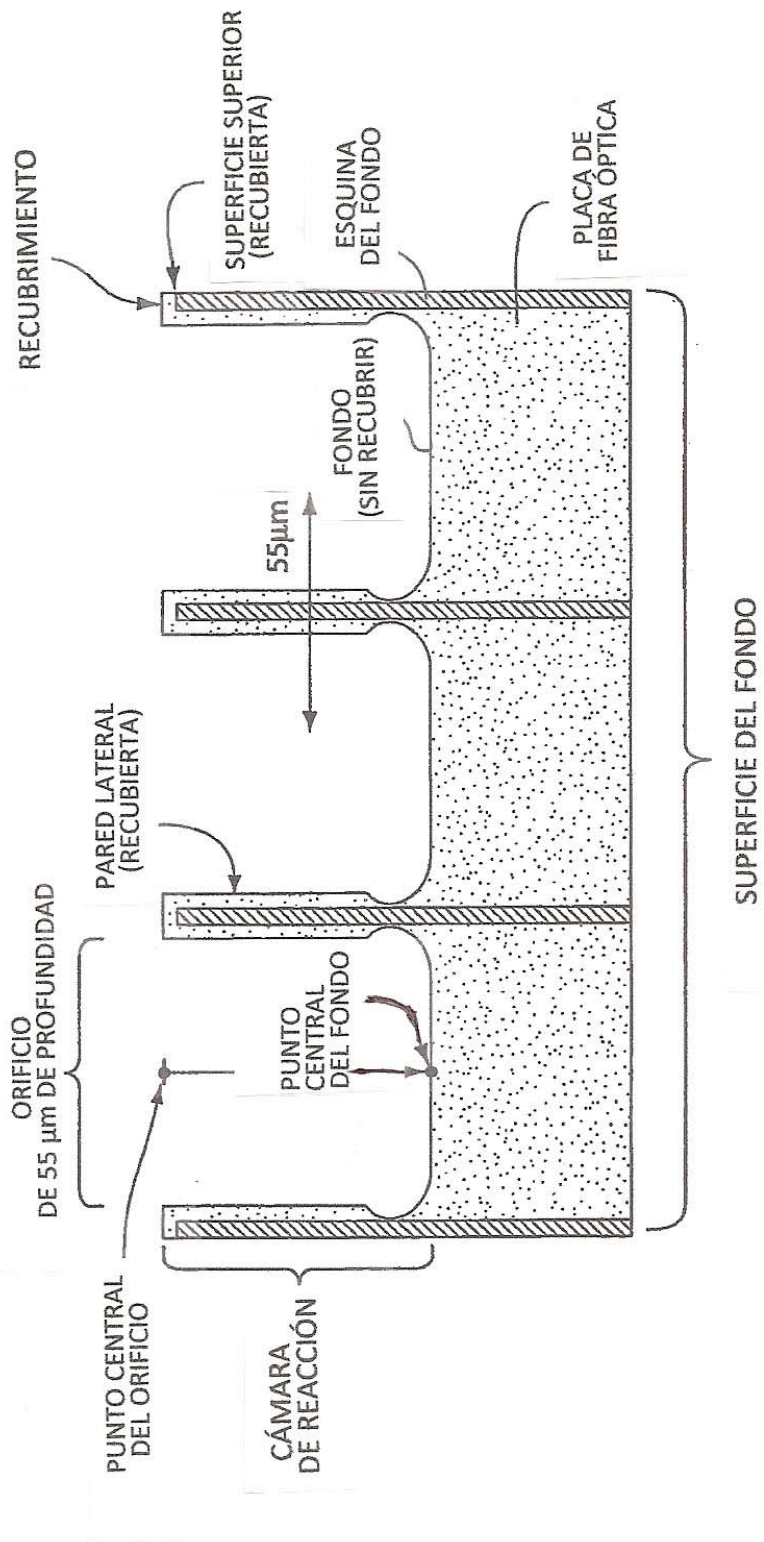


Fig. 14

Figura 15a

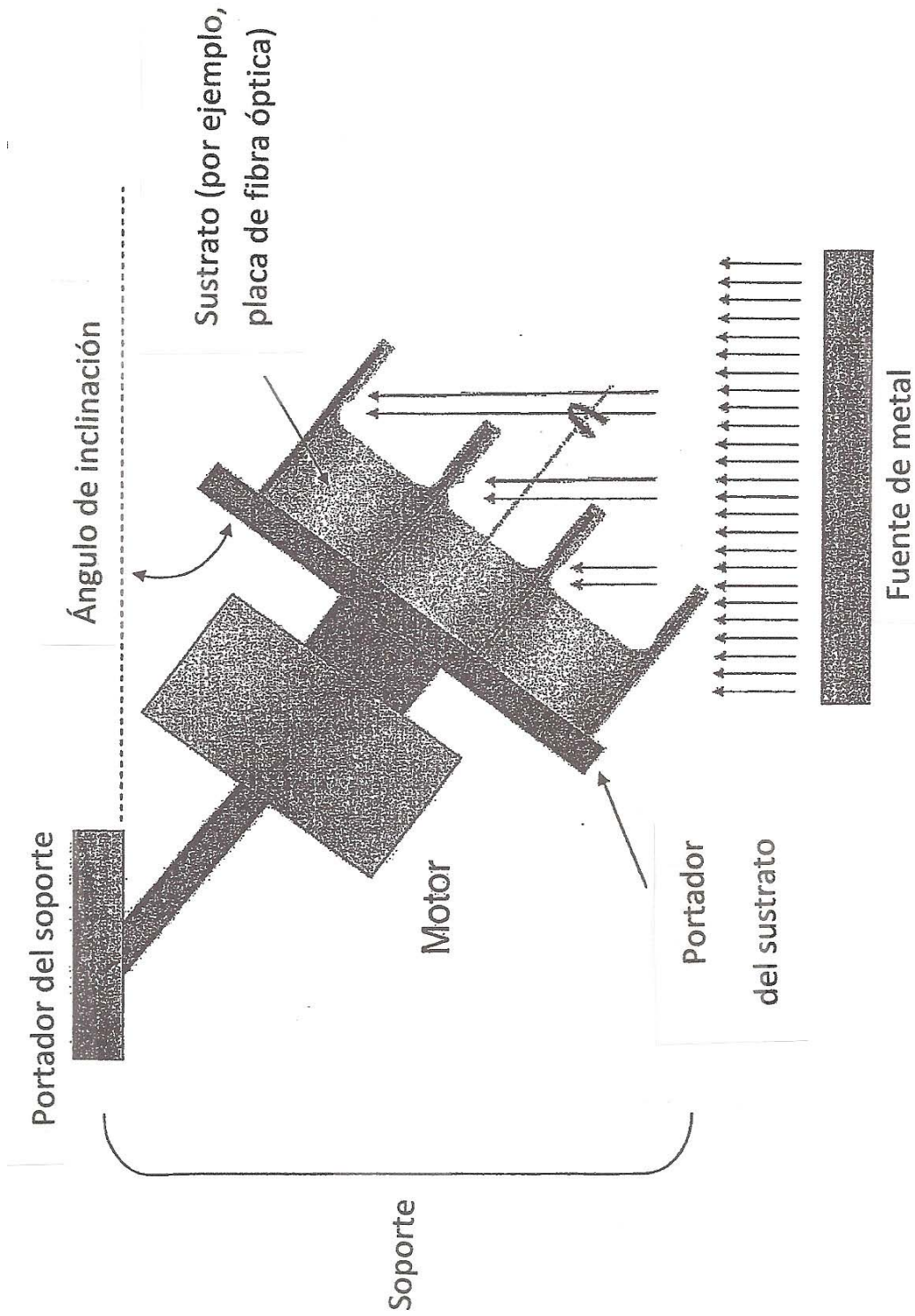
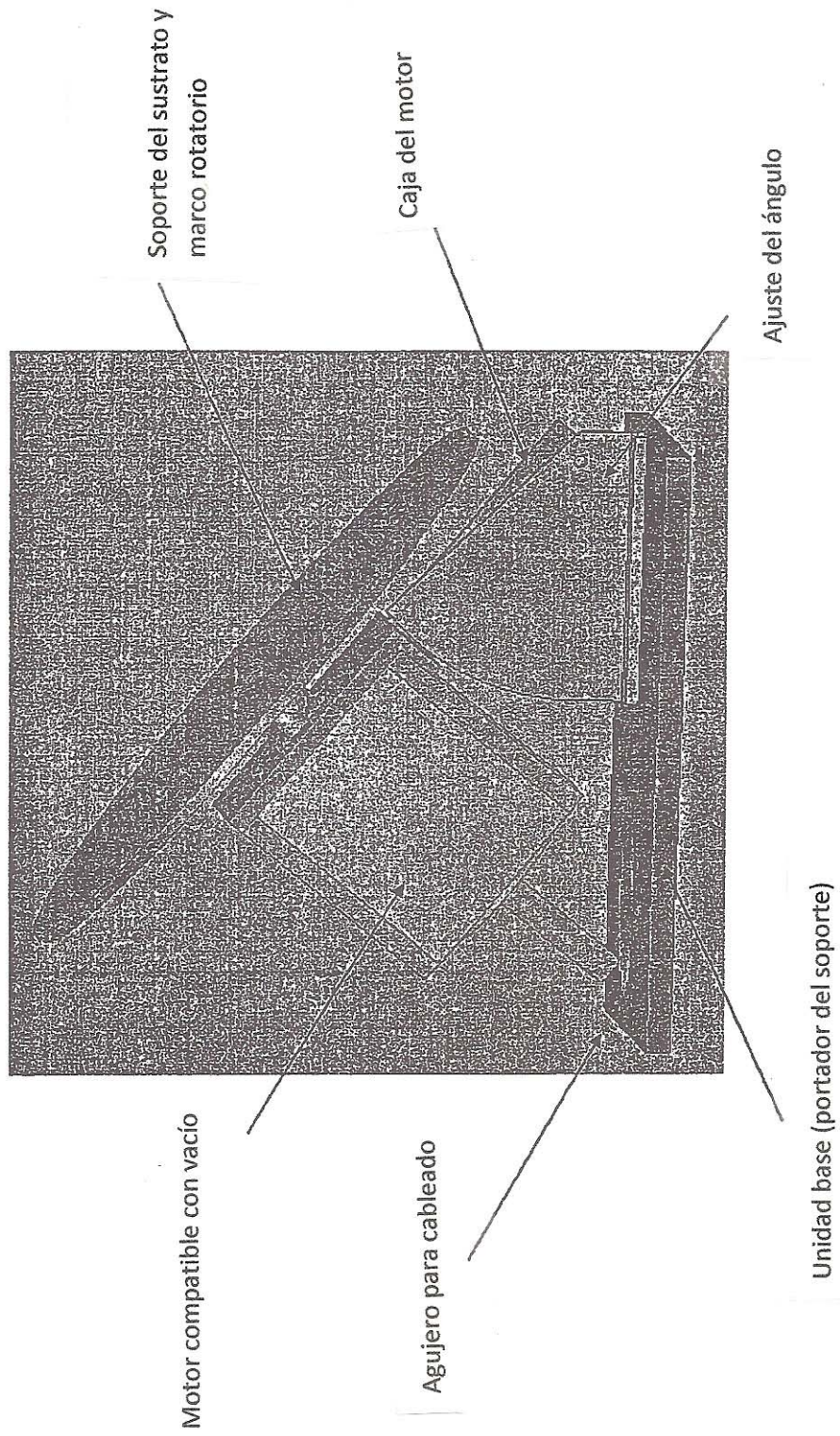


Figura 15b



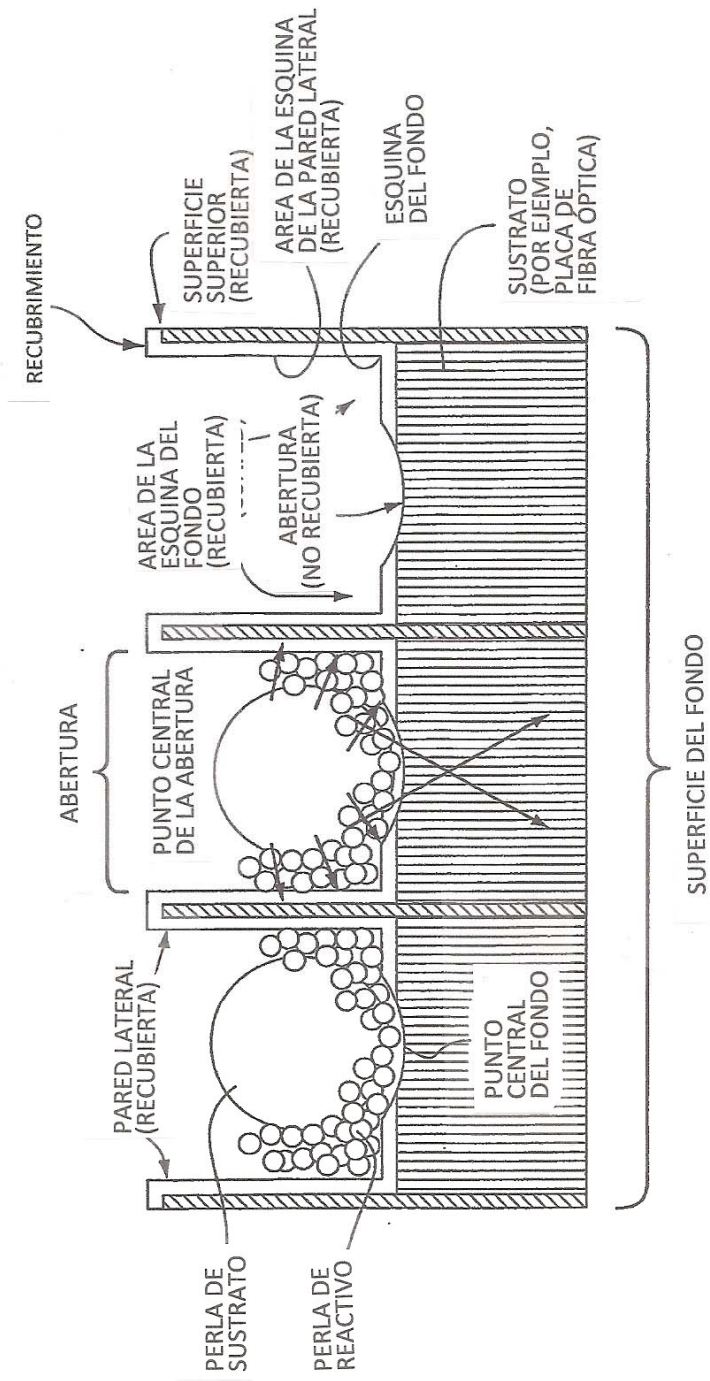


Fig. 16a

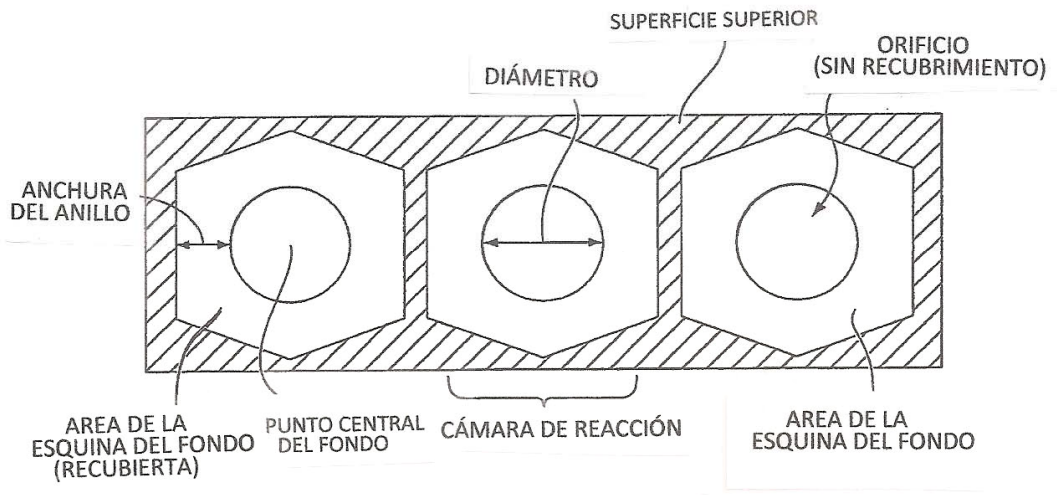


Fig. 16b

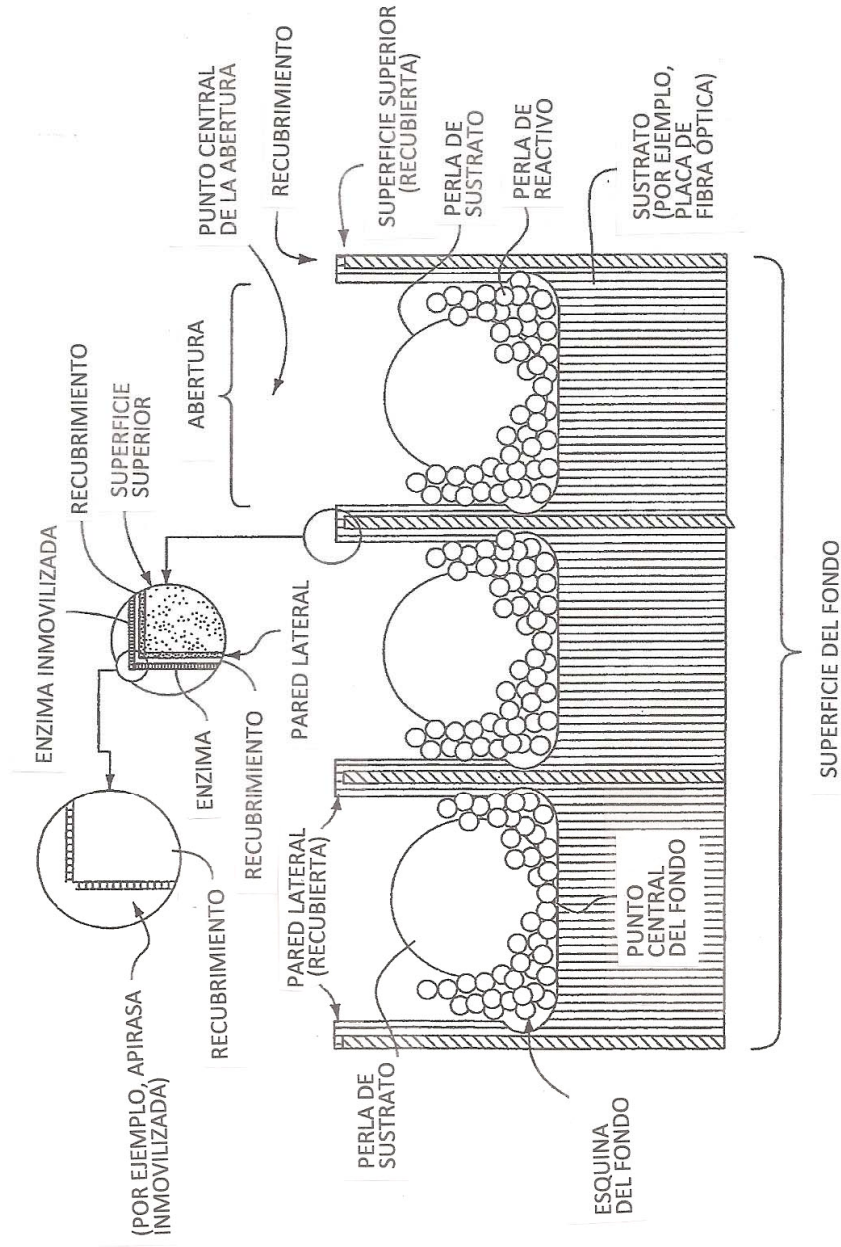


Fig. 17

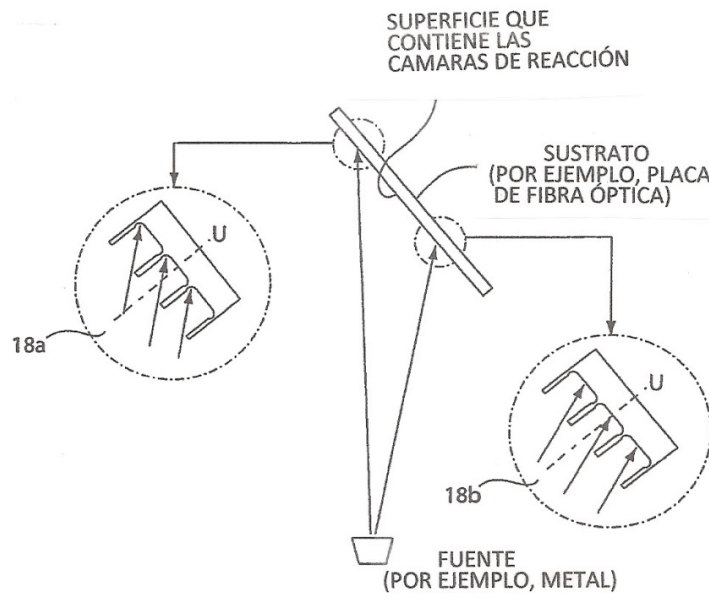


Fig. 18

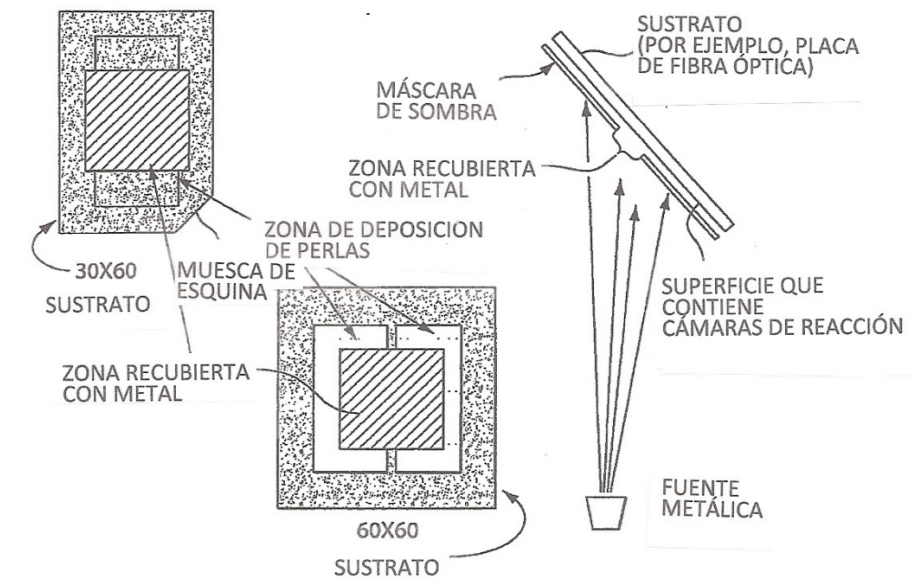


Fig. 19a

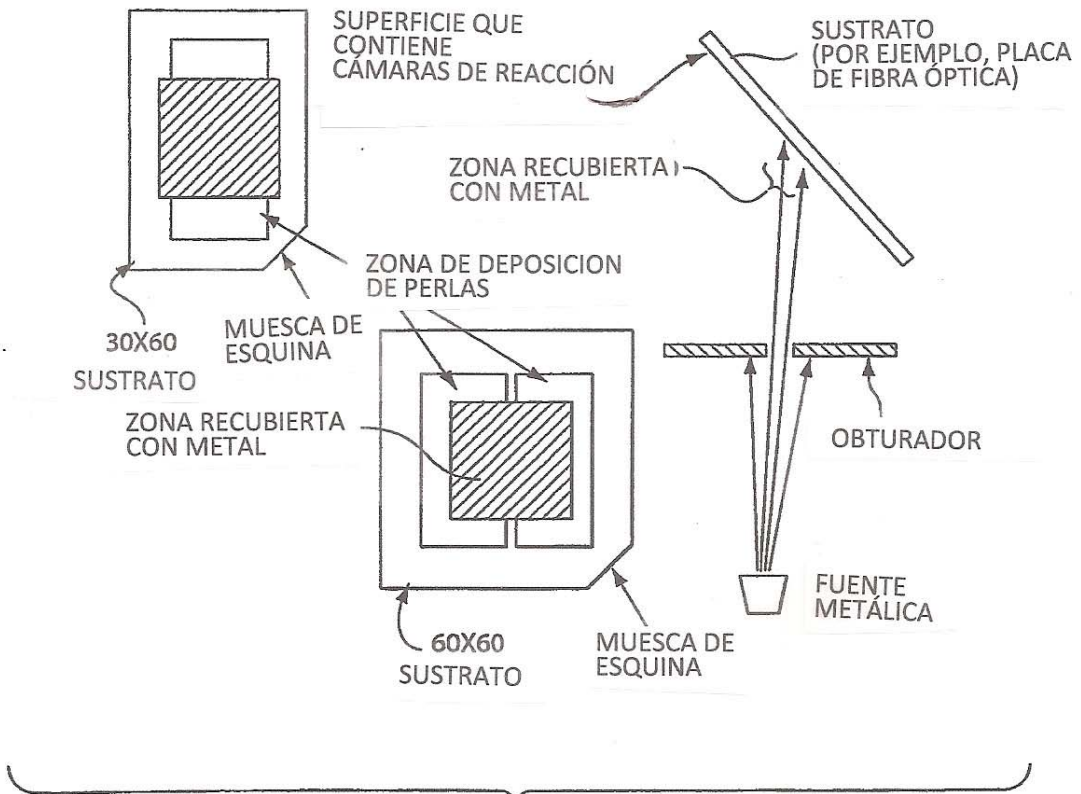


Fig. 19b

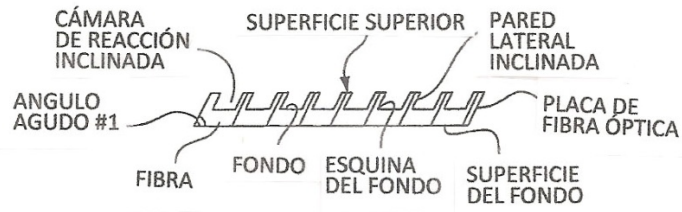


Fig. 20a

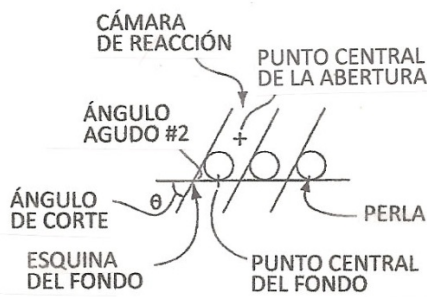


Fig. 20b

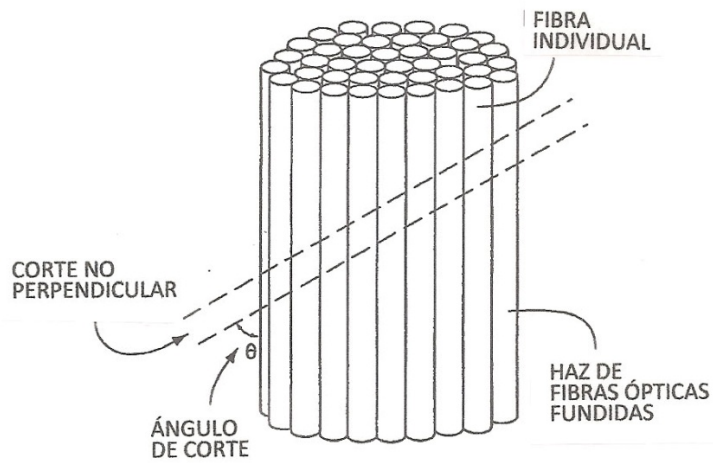


Fig. 20c

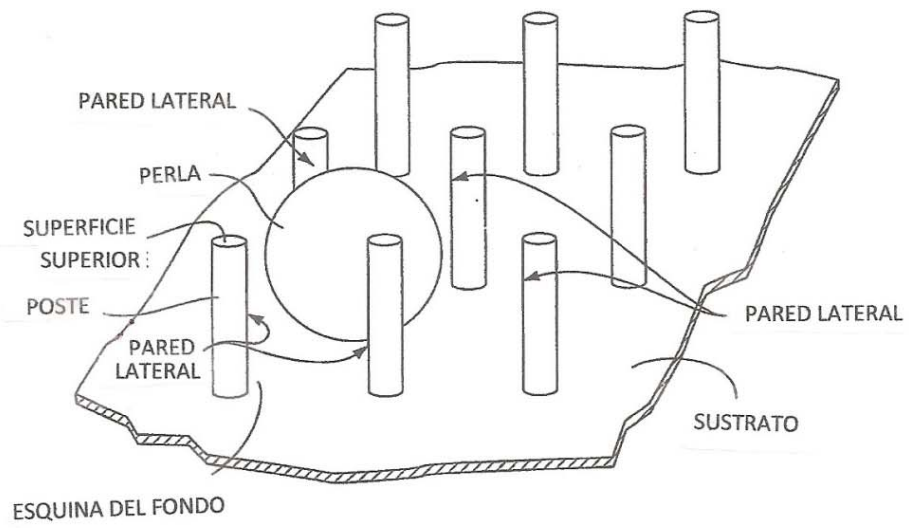


Fig. 21a

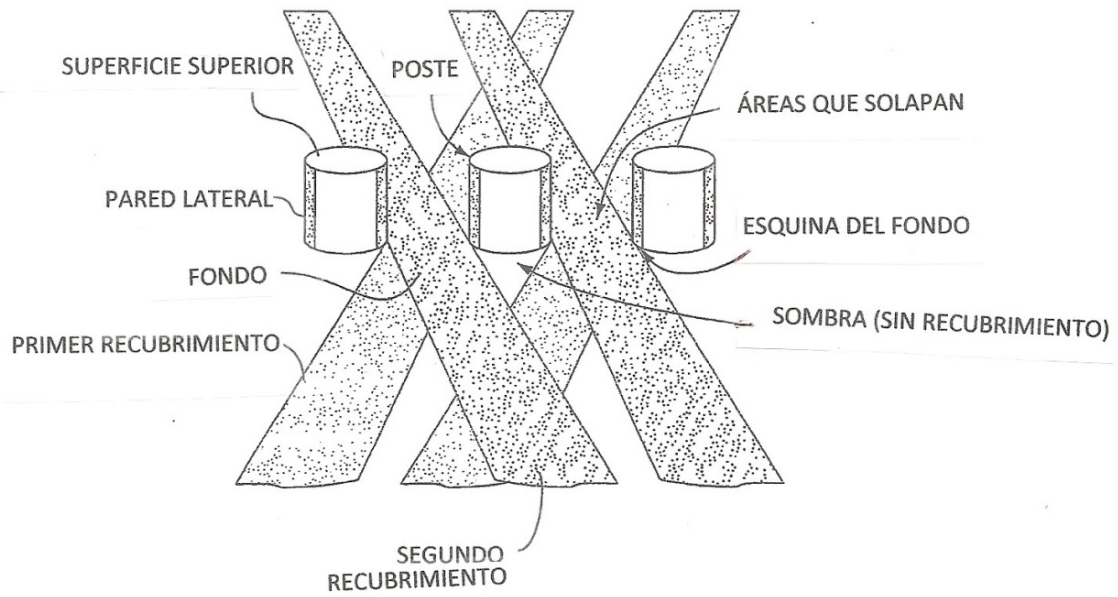


Fig. 21b

Figura 22

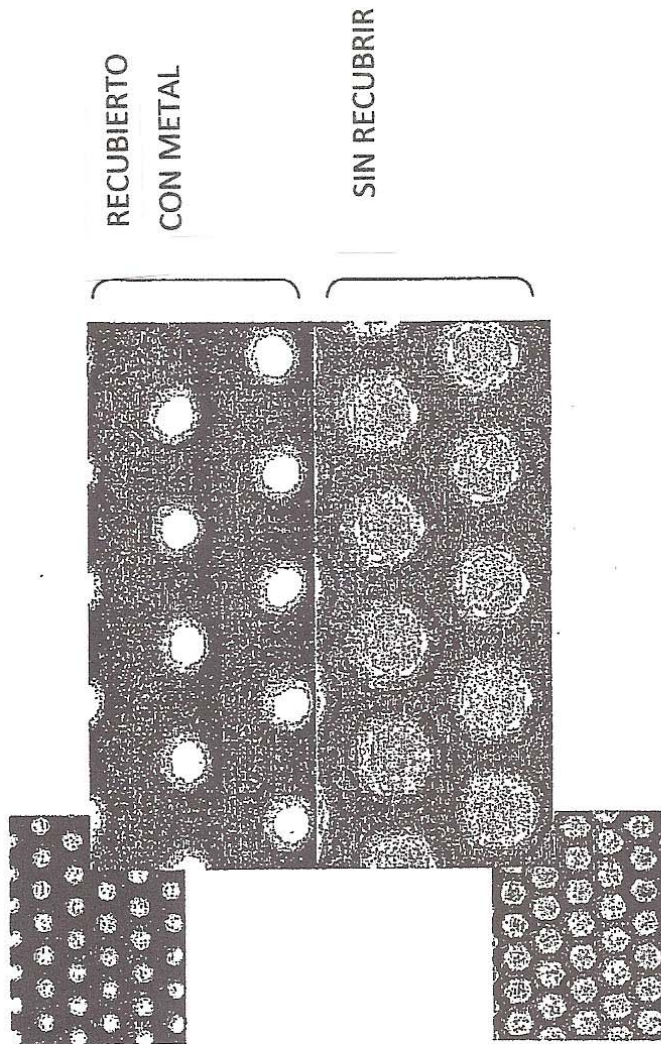


Figura 23

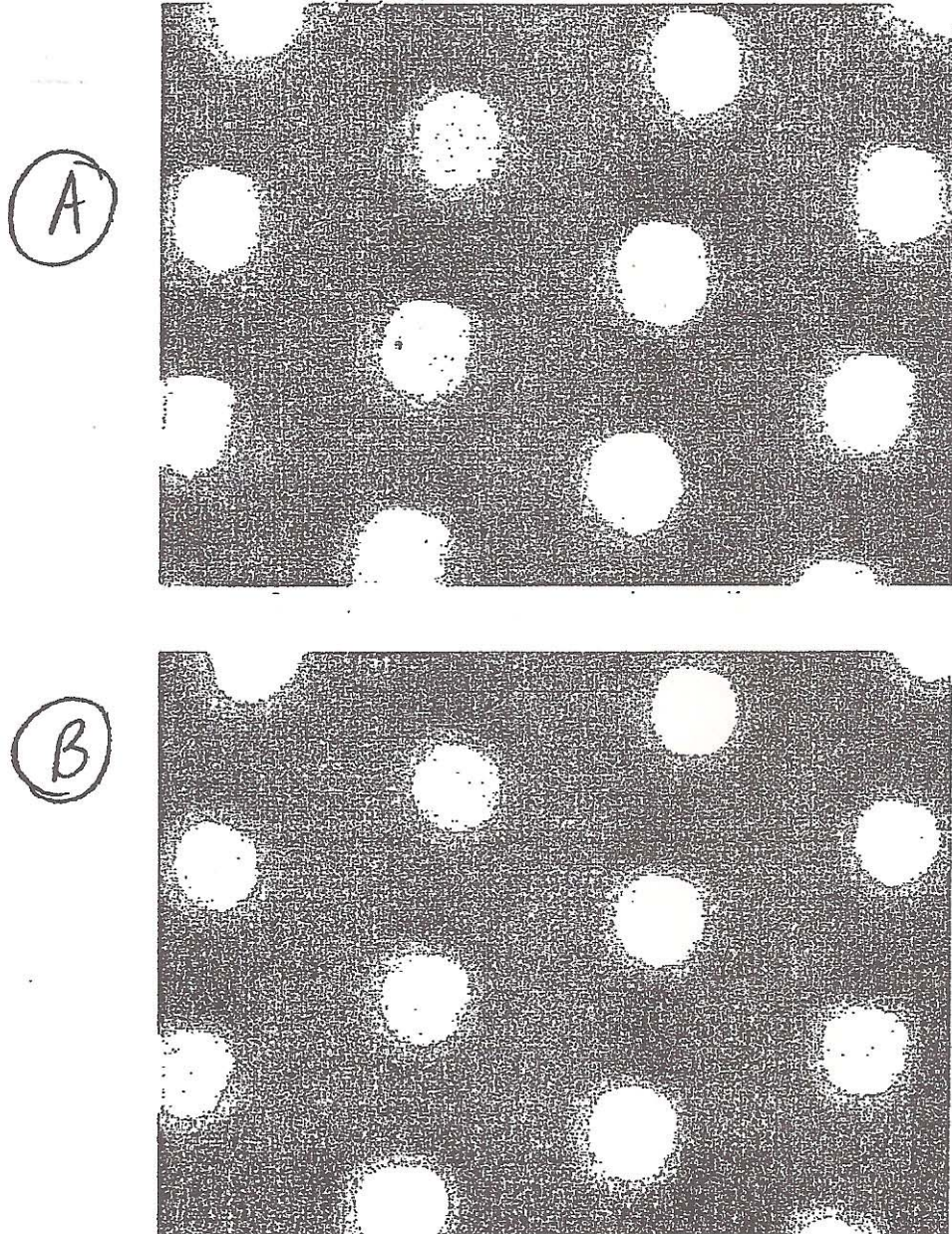


Figura 24

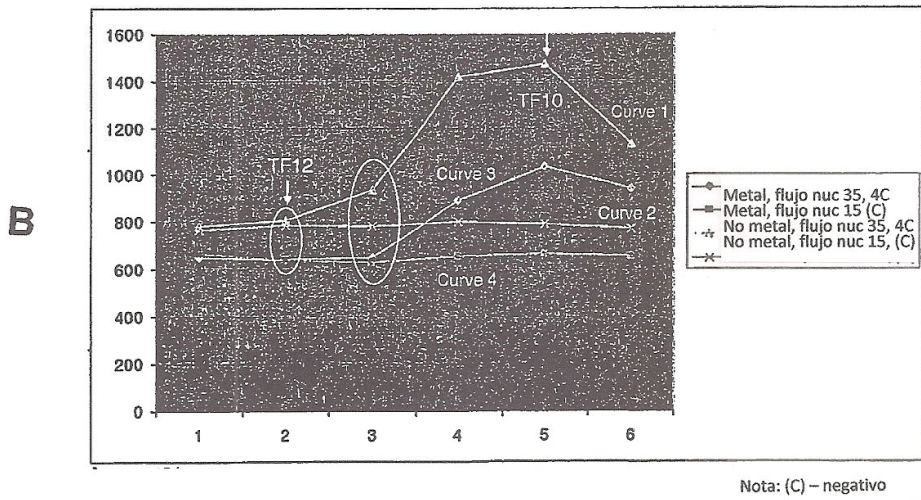
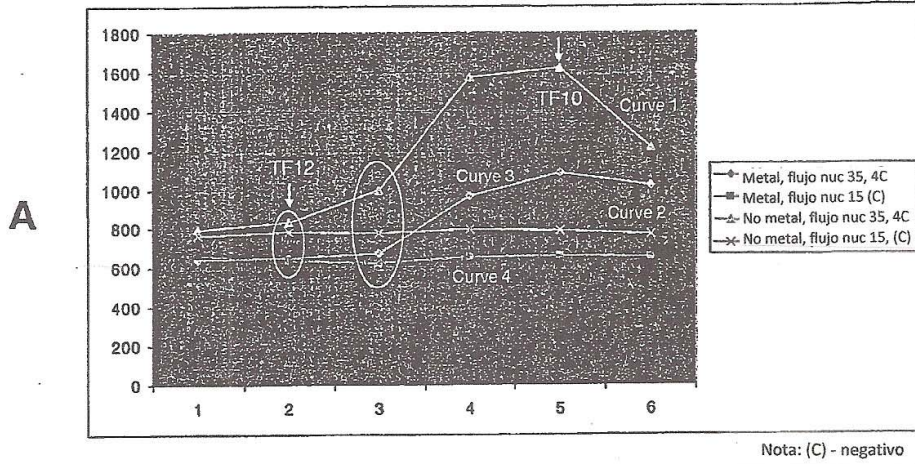


Figura 25a

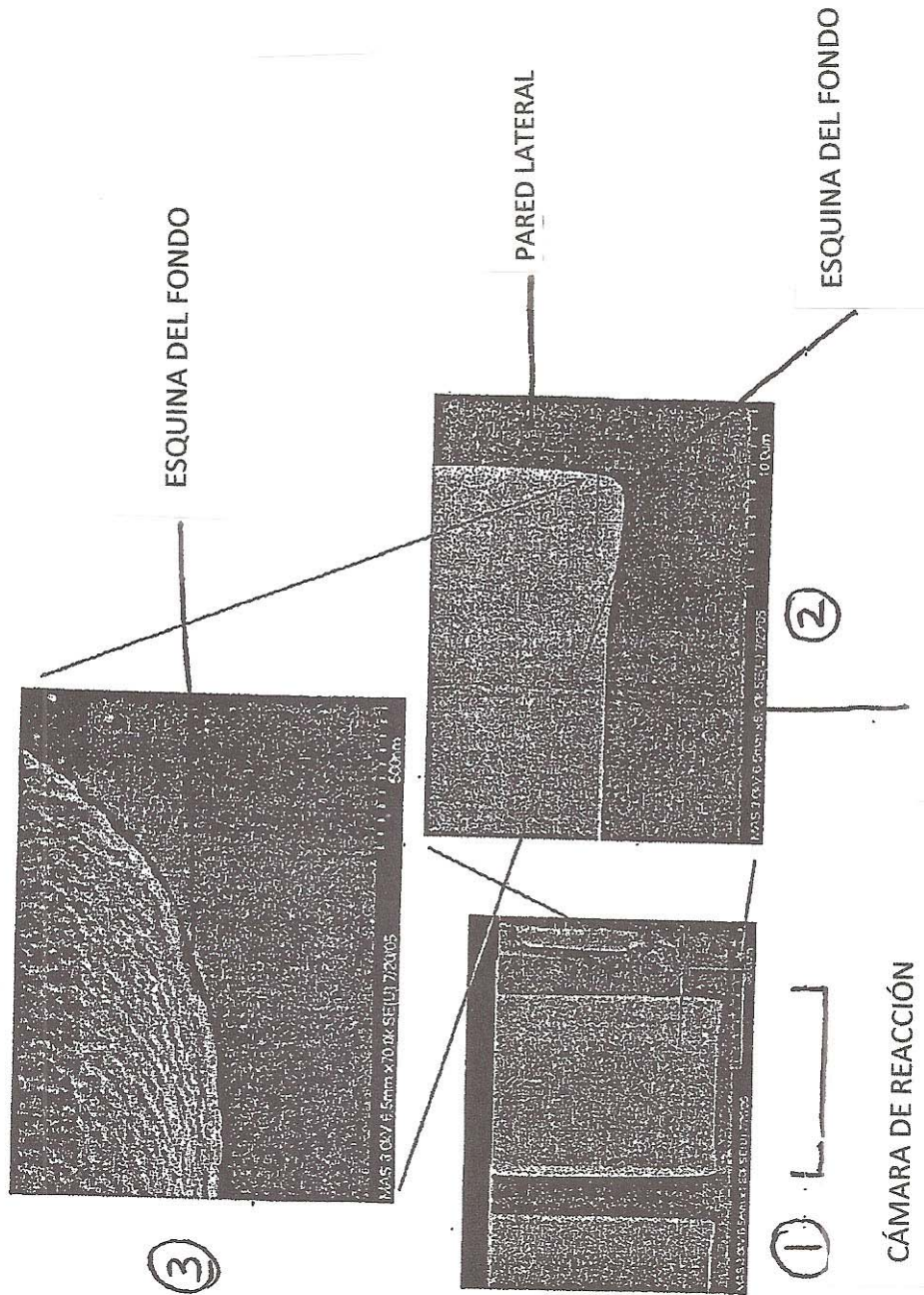
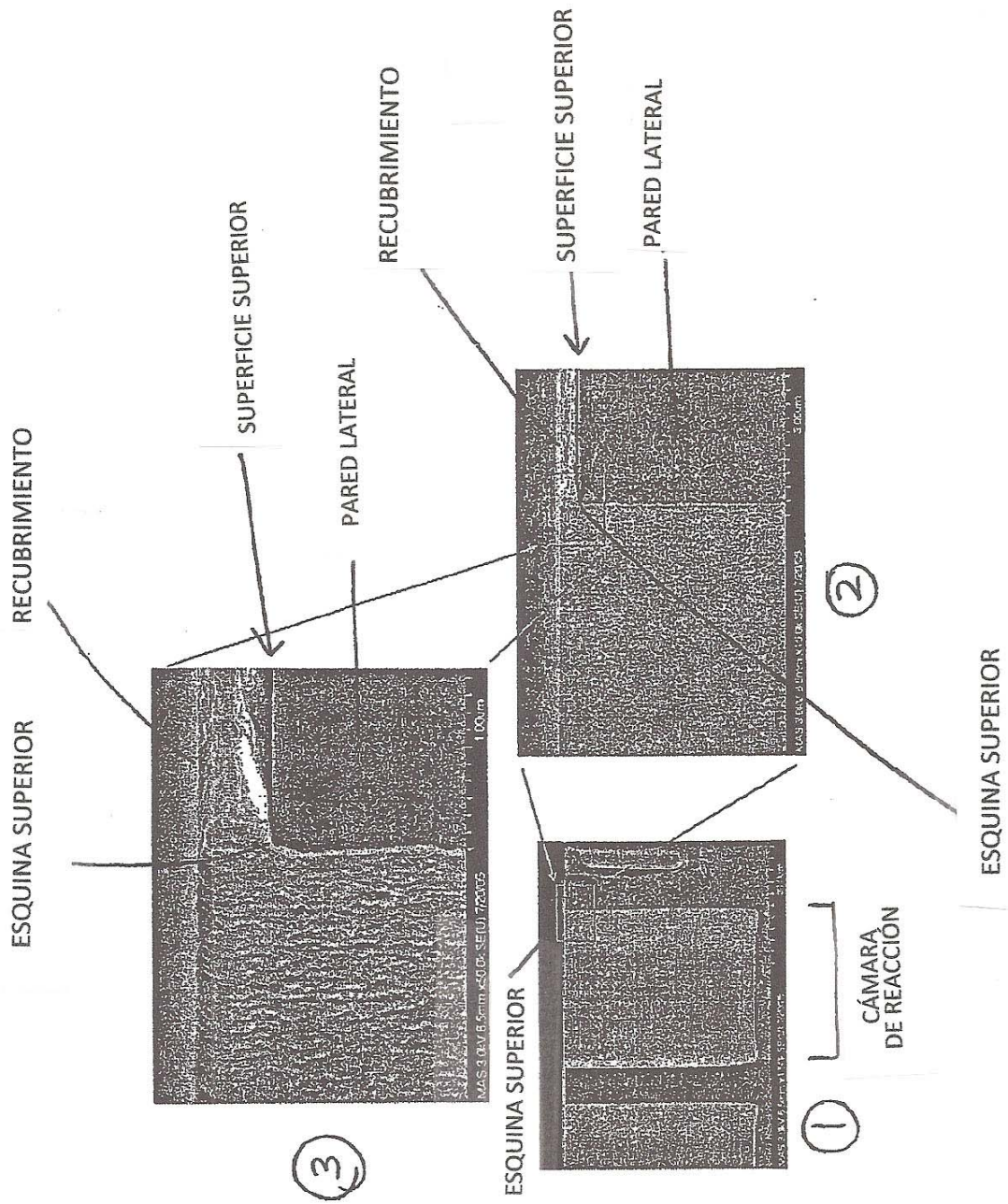


Figura 25b



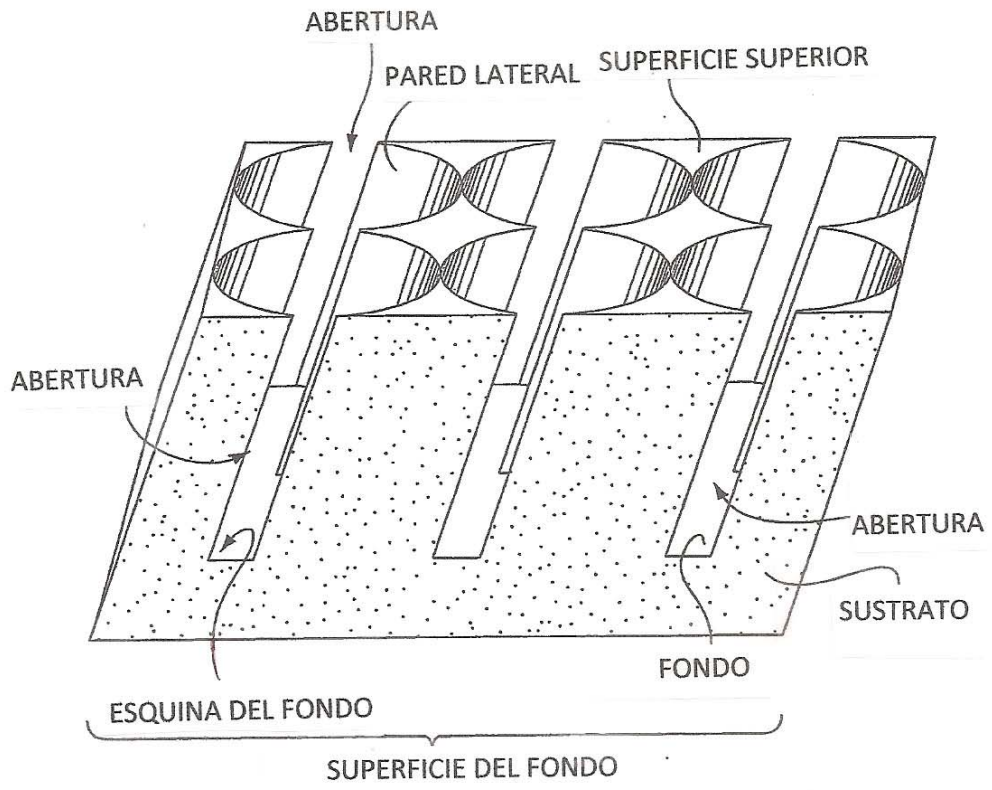


Fig. 26a

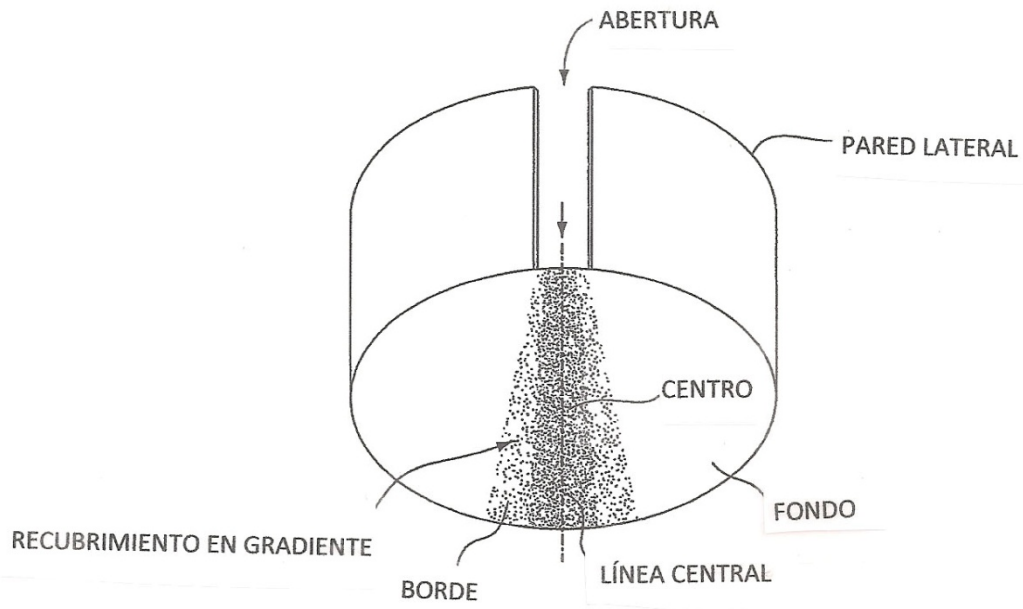


Fig. 26b